



LABQUIZ

NT-proBNP

Breinnatriuretisch peptide (BNP) is een circulerend hormoon dat informatie verschaft over de vullingsdrukken van het hart. BNP kan zodoende in de praktijk worden gebruikt als diagnostische marker voor hartfalen. Maar de interpretatie van de uitslag is niet altijd eenvoudig: het onderwerp van de eerste LabQuiz.

CASUS 1 Een 77-jarige man met blanco voorgeschiedenis wordt in korte tijd benauwd en meldt zich bij de huisarts. Deze vermoedt een decompensatio cordis en schrijft furosemide voor. De man voelt zich hierop beter en wordt doorverwezen voor nader onderzoek van de kortademigheid. Laboratoriumonderzoek laat het volgende zien (referentiewaarde tussen haakjes):

NT-proBNP: 34 pmol/l (< 35; leeftijdsonafhankelijke referentiewaarde bij acuut hartfalen)
D-dimeer: 19.720 µg/l (< 500)

WAT IS UW DIAGNOSE? KIES ÉÉN VAN DE ONDERSTAANDE MOGELIJKHEDEN

- decompensatio cordis
- pneumonie
- longembolie
- exacerbatie COPD

CASUS 2 Een 79-jarige vrouw, bekend wegens een leukemisch mantelcellymfoom, wordt kortademig en krijgt koorts na behandelingen met polychemotherapie in de vorm van R-CHOP (rituximab-cyclofosfamide-doxorubicine-vincristine-prednison). Een dubbelzijdige pneumonie wordt vastgesteld waarvoor een succesvolle behandeling met cefuroxim volgt. In de weken erop blijft patiënte kortademig bij inspanning. Het ecg toont atriumfibrilleren met hoge ventrikel frequentie. Radiologisch onderzoek van de thorax laat accumulatie van pleurvocht en toegenomen interstitiële tekening zien. Laboratoriumonderzoek laat het volgende zien (referentiewaarde tussen haakjes):

NT-proBNP: 1656 pmol/l (< 35; leeftijdsonafhankelijke referentiewaarde bij acuut hartfalen)

WAT IS UW DIAGNOSE? KIES ÉÉN VAN DE ONDERSTAANDE MOGELIJKHEDEN

- decompensatio cordis
- complicatie van voorafgaande pneumonie
- longinfiltratie van mantelcellymfoom
- longembolie

[▶ Antwoorden en uitleg elders in dit nummer](#)

ANTWOORDEN OP DE LABQUIZ

De diagnostische waarde van NT-proBNP bij hartfalen

André P. van Rossum, L. Tom Vlasveld en Lianne S.M. Boesten

ANTWOORD CASUS 1: LONGEMBOLIE

Patiënt A is een man van 77 jaar met blanco voorgeschiedenis. Hij was in korte tijd benauwd geworden zonder voorafgaande klachten van pijn op de borst of palpitations. Hierop had hij zijn huisarts gebeld, die hem op vermoeden van een decompensatio cordis furosemide voorschreef. De dagen daarna voelde hij zich duidelijk beter. Hij werd verwezen naar de Eerste Harthulp voor nader onderzoek van de kortademigheid. Bij navraag was hij minder benauwd geworden. Hij had geen last gehad van dikke enkels, nachtelijke dyspneu of nycturie.

Bij lichamenlijk onderzoek werd op dat moment een niet-kortademige man gezien met als bloeddruk 180/100 mmHg en als pols 110/min, regulair en eequaal, en zonder verhoging van de centraalveneuze druk. Onderzoek van hart en longen gaf geen afwijkingen, de lever was bij palpatie niet vergroot en er was geen oedeem aan de benen. Het ecg toonde een atriale extrasystole en sinustachycardie (110/min) met een komvormige ST-depressie in afleidingen V₅ en V₆ als enige verdere afwijkingen. De thoraxfoto toonde een COPD-beeld zonder infiltraten of overvulling. Bij laboratoriumonderzoek (referentiewaarde tussen haakjes) waren de uitslagen van natrium en kalium niet-afwijkend, de concentratie creatinine was met 132 µmol/l verhoogd (65-115) met een geschatte glomerulaire filtratiesnelheid van 46 ml/min/1,73m² (> 60 ml/min/1,73m²; 'modification of diet in renal disease'(MDRD)-formule). Het NT-proBNP was 34 pmol/l. De D-dimeeruitslag was 19.720 µg/l (< 500). De ventilatie-perfusiescan van de longen toonde sterke aanwijzingen voor longembolieën beiderzijds.

Patiënt presenteerde zich dus met kortademigheid die door de huisarts geïnterpreteerd werd als een symptoom van een decompensatio cordis. Op grond van het ontbreken van tekenen van decompensatio cordis bij lichamenlijk onderzoek en gesteund door een niet-afwijkende uitslag van NT-proBNP, werd een D-dimeertest gedaan bij een wells-score < 3 (de wells-score geeft een a-priorikans op diepe veneuze trombose op grond van factoren als immobiliteit, lokale drukpijn en zwelling van de kuit). De hoge D-dimeeruitslag gaf aanleiding tot het verrichten van een ventilatie-perfusiescan van de long, waarbij dubbelzijdige longembolieën werden aangetoond.

ANTWOORD CASUS 2: DECOMPENSATIO CORDIS

Patiënte B is een 79-jarige vrouw die sinds 4 jaar bekend was met een leukemisch mantelcellymfoom, stadium 4 met lokalisatie in het beenmerg. Zij werd behandeld met polychemotherapie in de vorm van cyclofosfamide, doxorubicine, vincristine en prednison in combinatie met rituximab (R-CHOP). Hierop was een goede remissie. Vier jaar later was er een recidief van het lymfoom waarvoor behandeling volgde met CVP-kuren bestaande uit cyclofosfamide, vincristine en prednison, echter zonder effect. Wegens het uitblijven van respons werd toen opnieuw gestart met R-CHOP-kuren. Voor de start van chemotherapie was de cumulatieve dosis doxorubicine 400 mg/m². 'Multiple-uptake gated acquisition'(MUGA)-scintigrafie en echografie toonden een ongestoorde ejectiefraction van 58%. Na de tweede R-CHOP-kuur werd patiënte opgenomen met kortademigheid en koorts op basis van een dubbelzijdige pneumonie, die met succes werd behandeld met cefuroxim. De weken daarop was zij toenemend kortademig bij inspanning. Zij had geen palpitations of pijn de borst. Zij had een nycturie van 2-3 maal per nacht. Bij lichamenlijk onderzoek had zij een bloeddruk van 140/70 mmHg; de pols was aanvankelijk regulair en eequaal, de centraal veneuze druk was niet verhoogd. Bij onderzoek van de longen werden beiderzijds crepitations gehoord. Er was geen perifeer oedeem. Het ecg toonde daags na opname atriumfibrilleren met hoge ventrikelfrequentie. Bij radiologisch onderzoek van de thorax werd pleuravocht met toegenomen interstitiële tekening gezien. Bij laboratoriumonderzoek bleek patiënte anemisch (Hb: 5,9 mmol (7,5-10)) met 70,4/nl circulerende mantelcellen. Als oorzaak van de kortade-

Ziekenhuis Bronovo, Den Haag.

Klinisch Chemisch en Hematologisch

Laboratorium:

dr. A.P. van Rossum, klinisch chemicus.

Afd. Interne Geneeskunde.

dr. L.T. Vlasveld, internist-hematoloog.

IJsselland Ziekenhuis, Capelle a/d IJssel.

Algemeen Klinisch Laboratorium.

Dr. L.S.M. Boesten, klinisch chemicus.

Contactpersoon: dr. A.P. van Rossum

(apvrossum@bronovo.nl).

migheid en de gevonden afwijkingen op de thoraxfoto ging men differentiaaldiagnostisch uit van een complicatie van de voorafgaande infectie, een infiltratie door het leukemisch mantelcellymfoom of een decompensatio cordis mede als gevolg van de anemie. De NT-proBNP-uitslag was 1656 pmol/l, de ejectionfractie bepaald met de MUGA-scan was met 33% duidelijk verlaagd en echocardiografie toonde een verminderde wandbeweging van beide ventrikels met een maximale ejectionfractie van

40%. De diagnose luidde 'decompensatio cordis op basis van een doxorubicine-geïnduceerde cardiomyopathie'. Patiënte werd behandeld met digoxine, een ACE-remmer en diuretica, maar zonder evidente verbetering van de klachten.

➤ **Voor verdieping en achtergronden, zie www.ntvg.nl, zoeken op A2885**

De diagnostische waarde van NT-proBNP bij hartfalen

André P. van Rossum, L. Tom Vlasveld en Lianne S.M. Boesten

ACHTERGROND

Breinnatriuretisch peptide (BNP) is een circulerend hormoon dat informatie verschaft over de vullingsdrukken van het hart. BNP kan zodoende in de praktijk worden gebruikt als diagnostische marker voor hartfalen.

BNP wordt geproduceerd als het prohormoon proBNP door de cardiale ventrikels in reactie op volume-expansie. Het prohormoon wordt vervolgens gesplitst in het biologisch actieve BNP en het inactieve N-terminaal proBNP (NT-proBNP). BNP heeft diuretische, natriuretische en hypotensieve effecten. Deze regelmechanismen hebben als primaire doel overbelasting van de pompfunctie van het hart te voorkomen. Zowel BNP als NT-proBNP kunnen in het laboratorium worden gemeten. In deze verdieping zal met name worden ingegaan op NT-proBNP.

BEPALING

De bepaling van circulerend NT-proBNP gebeurt via immunoassays. Dit zijn methoden waarbij antilichamen worden gebruikt als detectiereagens voor de te meten stof. In de NT-proBNP-immunoassay gaat het NT-proBNP een binding aan met antilichamen, waardoor een zogenaamd sandwich-complex wordt gevormd (figuur). Het eerste antilichaam is vastgekoppeld aan een drager. Het te bepalen monster wordt geïncubeerd op de drager en aanwezig NT-proBNP hecht aan het antilichaam. Vervolgens wordt het zogenaamde detectieantilichaam toegevoegd, waaraan een chemoluminescerend (lichtgevend) reagens is gekoppeld. Als dat detectieantilichaam blijft zitten heeft het kennelijk NT-proBNP gevonden. Zodoende kan de hoeveelheid NT-proBNP-antilichaamcomplex worden gekwantificeerd.

Ziekenhuis Bronovo, Den Haag.
 Klinisch Chemisch en Hematologisch
 Laboratorium: dr. A.P. van Rossum,
 klinisch chemicus.
 Afd. Interne Geneeskunde: dr. L.T. Vlasveld,
 internist-hematoloog.
 IJsselland Ziekenhuis, Capelle a/d IJssel,
 Algemeen Klinisch Laboratorium.
 Dr. L.S.M. Boesten, klinisch chemicus.
 Contactpersoon: dr. A.P. van Rossum
 (apvrossum@bronovo.nl).

NT-PROBNP IN DE DIAGNOSTIEK VAN HARTFALEN

Ten behoeve van de diagnostiek naar hartfalen moet een NT-proBNP-uitslag altijd beoordeeld worden in het licht van de klinische bevindingen en de eventuele medische geschiedenis van de patiënt.

1e lijn In toenemende mate wordt de NT-proBNP gebruikt in de 1e lijn. Bij een vermoeden van hartfalen op klinische gronden kan men NT-proBNP gebruiken als hulpmiddel ter uitsluiting van de ziekte. In de 1e lijn heeft de NT-proBNP-bepaling een hoge negatief-voorspellende waarde (88-98%), dat wil zeggen dat een negatieve uitslag met grote zekerheid aangeeft dat er geen hartfalen is. De positief-voorspellende waarde is echter veel lager (32-70%, zie verder).¹⁻³ Een verhoogde NT-proBNP-concentratie is te gebruiken als indicatie voor aanvullend echocardiografisch onderzoek of voor doorverwijzen naar de cardioloog.

2e lijn De bepaling is met name gevalideerd voor de vraagstelling: 'cardiale of niet-cardiale dyspneu?' bij patiënten met acute dyspneu op de Spoedeisende Hulp. Uit meerdere studies is gebleken dat NT-proBNP een hoge sensitiviteit (90-97%) en een hoge negatief-voorspellende waarde heeft. De concentratie NT-proBNP in het referentiewaardengebied sluit hartfalen dan zo goed als uit.

HOE SPECIFIEK IS DE NT-PROBNP VOOR DE DIAGNOSE 'HARTFALEN'?

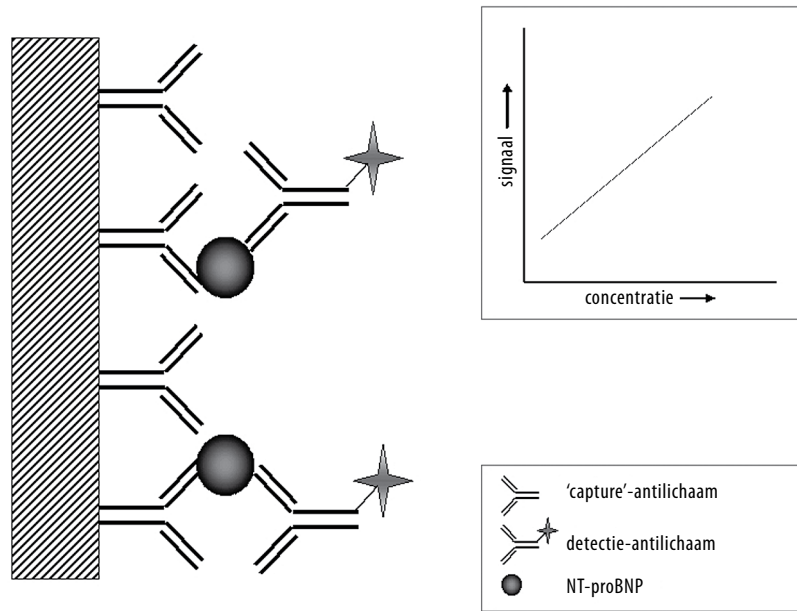
NT-proBNP is niet specifiek voor hartfalen en kan ook verhoogd zijn bij onder andere de volgende condities: nierinsufficiëntie, boezemfibrilleren, myocarditis, myocardinfarct, hypertensie, linkerventrikelhypertrofie, aortaklepstenose, pulmonale embolieën, overvullingsstoelstanden zoals bij primair hyperaldosteronisme, syndroom van Cushing en levercirrose met ascites.⁴

CORRELEERT DE NT-PROBNP-CONCENTRATIE MET ERNST VAN DE ZIEKTE?

Verschillende studies hebben aangetoond dat er een correlatie bestaat tussen de ernst van het hartfalen en de mate van NT-proBNP-verhoging.

KAN NT-PROBNP GEBRUIKT WORDEN IN DE MONITORING VAN ACUUT HARTFALEN?

De plasmaconcentraties van NT-proBNP nemen af bij effectieve behandeling van hartfalen. Omdat de halfwaardetijd van BNP kort is (18-22 min), bestaat theoretisch de potentie dat seriële BNP metingen van waarde zijn in de monitoring van acuut hartfalen. Diverse studies



FIGUUR Schematische weergave van de chemiluminescentie-immunoassay voor de bepaling van N-terminaal pro-breinnatriuretisch peptide (NT-proBNP). Links een drager met daarop antilichamen tegen NT-proBNP ('capture'-antilichamen). Bij incubatie met het monster blijven de daarin aanwezige NT-proBNP-moleculen aan de antilichamen hangen. Bij daaropvolgende incubatie met de detectieantilichamen (met chemiluminescentie) zullen deze blijven hangen aan de eerder gekoppelde NT-proBNP-moleculen. In de inzet rechts boven is te zien dat de hoeveelheid luminescentiesignaal evenredig is met de hoeveelheid NT-proBNP in het monster.

tonen echter controversiële resultaten.⁵ Zodoende is er momenteel onvoldoende bewijs voor het nut van seriële BNP metingen in de monitoring van acuut hartfalen.

HEEFT NT-PROBNP EEN PROGNOSTISCHE WAARDE VOOR CHRONISCH HARTFALEN?

Voor patiënten met chronisch hartfalen is NT-proBNP een waardevolle prognostische marker gebleken.⁶⁻⁹ Indien bij patiënten met chronisch hartfalen de plasmaconcentratie NT-proBNP hoog blijft is dit prognostisch ongunstig.

KAN NT-PROBNP GEBRUIKT WORDEN TER DIFFERENTIËRING VAN DE OORZAAK VAN HARTFALEN?

Bij diastolisch hartfalen is, net als bij systolisch hartfalen, de NT-proBNP-concentratie verhoogd, maar wel in mindere mate. Op basis van de plasmaconcentratie kan echter niet gedifferentieerd worden tussen systolische en diastolische dysfunctie.

KAN NT-PROBNP GEBRUIKT WORDEN OM DE UITKOMST TE VOORSPELLEN BIJ PATIËNTEN MET EEN ACUUT CORONAIR SYNDROOM?

Verhoogde NT-proBNP-concentraties zijn geassocieerd met een toegenomen mortaliteit bij patiënten met acuut coronair syndroom (ACS).¹⁰ Ook al kan het vervolgen van NT-proBNP bij ACS een complete risico-analyse geven

van de patiënt, dit zal pas een meerwaarde hebben als er een bewezen voordeel is van therapeutische interventies gericht op het verlagen van de plasmaconcentratie NT-proBNP. Om deze reden is het niet geïndiceerd NT-proBNP te meten bij een verdenking op ACS.

REFERENTIEWAARDEN, BESLISGRENZEN EN TESTEIGENSCHAPPEN

Voor BNP en NT-proBNP gelden andere referentiewaarden. Daarnaast zijn uitslagen van BNP en NT-proBNP afhankelijk zijn van de gebruikte assay, waardoor er ver-

TABEL 1 Referentiewaarden van NT-proBNP bij verdenking op acuut hartfalen^{11,12}

	acuut hartfalen		
	niet waarschijnlijk	matig waarschijnlijk	waarschijnlijk
naar leeftijd			
< 50 jaar	< 35 pmol/l	35-212 pmol/l	> 212 pmol/l
50-75 jaar	< 53 pmol/l		> 53 pmol/l
> 75 jaar	< 106 pmol/l		> 106 pmol/l
	< 212 pmol/l		> 212 pmol/l

NT-proBNP = N-terminaal pro-breinnatriuretisch peptide.

schillende referentiewaarden bestaan voor verschillende assays. Beide bepalingen worden uitgedrukt in pmol/l dan wel pg/ml (tabel 1-3).

Naast de leeftijd van de patiënt, dient men rekening te houden met het geslacht en het gewicht: de NT-proBNP-concentratie is hoger bij vrouwen en is lager bij obesitas. Gezien de plasmahalfwaardetijd van BNP (18-22 min) is de gemeten plasmaconcentratie een goede maat voor de actuele cardiale status. De plasmahalfwaardetijd van NT-proBNP is 1-2 h.¹⁴

KOSTEN

Het CTG-tarief: meting van NT-proBNP is een relatief dure laboratoriumbepaling van € 17,36. Ter vergelijking, een natriumbepaling kost € 1,47.

WANNEER IS EEN NT-PROBNP-UITSLAG KLINISCH SIGNIFICANT VERSCHILLEND TEN OPZICHTE VAN DE VORIGE UITSLAG?

Op basis van de biologische en analytische variatie kan met een betrouwbaarheid van 95% bepaald worden of 2 resultaten klinisch significant van elkaar verschillen (zogenaamd kritisch verschil). In het geval van NT-proBNP geldt dat wanneer 2 uitslagen minimaal 50% van elkaar verschillen, er pas gesproken mag worden van een klinisch significant verschil (analytische variatie = 5%, biologische variatie = 17,2%). Ter vergelijking, het kritisch verschil voor natrium in serum is 4,6%.

BEREKENING VAN KLINISCH SIGNIFICANTE VERSCHILLEN

De vraag of 2 resultaten klinisch significant van elkaar verschillen kan worden beantwoord middels een formule die dit verschil met een betrouwbaarheid van 95% bepaalt op basis van de biologische en analytische variatie. Er is een kritisch verschil als:

$$\text{procentueel verschil tussen 2 waarden} > 2,8 \times \sqrt{(VC_A^2 + VC_B^2)},$$

waarbij geldt: VC_A = analytische variatiecoëfficiënt, en VC_B = intra-individuele biologische variatiecoëfficiënt.

Op basis van de biologische en analytische variatie wordt zodoende met een betrouwbaarheid van 95% bepaald of 2

TABEL 2 Referentiewaarden van NT-proBNP bij verdenking op chronisch hartfalen³

leeftijd	afkapwaarde
≤ 75 jaar	< 15 pmol/l
> 75 jaar	< 53 pmol/l

NT-proBNP = N-terminaal pro-breinnatriuretisch peptide.

TABEL 3 Conversiefactoren voor BNP en NT-proBNP

	SI-eenheid	conversie van SI-eenheid naar massa-eenheid	conversie van massa-eenheid naar SI-eenheid	massa-eenheid
BNP	pmol/l	x 3,460	x 0,289	pg/ml
NT-proBNP	pmol/l	x 8,474	x 0,118	pg/ml

BNP = breinnatriuretisch peptide; NT-proBNP = N-terminaal pro-BNP.

resultaten klinisch significant van elkaar verschillen. Met andere woorden, pas als het verschil tussen 2 metingen groter is dan het berekende verschil, is er sprake van een veranderde klinische situatie bij de patiënt.

Voorbeeld Voor de beantwoording van de vraag of een uitslag van 350 pmol/l significant verschillend is van 250 pmol/l wordt gebruik gemaakt van de volgende gegevens (gebaseerd op de NT-proBNP-bepaling van Roche Diagnostics): $2,8 \times \sqrt{(5^2 + 17,2^2)} = 2,8 \times 17,7 = 50\%$; waarbij $VC_A = 5\%$ en $VC_B = 17,2\%$.¹⁵

Uit deze berekening blijkt dat er minimaal een verschil van 50% tussen 2 bepalingen moet zijn, om te kunnen spreken van een klinisch significant verschil. Het percentage stijging tussen tijdstip A en B is 40% $((350-250)/250 \times 100\%)$. De toename van 40% is echter kleiner dan de berekende 50% en daarmee kan geconcludeerd worden dat de twee uitslagen niet klinisch significant verschillend zijn. Nota bene: de VC_A varieert afhankelijk van de gebruikte assay.

VALKUILEN

Zoals al eerder vermeld, dient men rekening te houden met een verschil in resultaten bij gebruik van verschillende assays. Het is dus belangrijk altijd de resultaten te vergelijken met de referentiewaarden die door het eigen laboratorium zijn vastgesteld.

Aangezien BNP en NT-proBNP worden gemeten middels immunoassays kunnen antilichamen van de patiënt zelf potentieel interfereren met de antilichamen in de assay. Interferentie kan leiden tot onjuiste resultaten. Bij een vermoeden van interferentie dient contact met het laboratorium te worden opgenomen.

Interfererende antilichamen kunnen onder andere worden gezien bij patiënten met een auto-immuunziekte, patiënten behandeld met 'biologicals' (medicamenten gebaseerd op antilichamen) en patiënten met huisdieren (antilichamen tegen het huisdier).

➤ Meer op www.ntvg.nl/klinischepraktijk

LITERATUUR

- 1 Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, et al. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet*. 1997;350:1349-53.
- 2 Landray MJ, Lehman R, Arnold I. Measuring brain natriuretic peptide in suspected left ventricular systolic dysfunction in general practice: cross-sectional study. *BMJ*. 2000;320:985-6.
- 3 Fuat A, Murphy JJ, Hungin APS, et al. The diagnostic accuracy and utility of B-type natriuretic peptide test in a community population of patients with suspected heart failure. *Br J Gen Pract*. 2006;56:327-33.
- 4 McCullough PA, Omland T, Maisel AS. B-type natriuretic peptides: a diagnostic breakthrough for clinicians. *Rev Cardiovasc Med*. 2003;4:72-80.
- 5 Nohria A, Mielniczuk LM, Stevenson LW. Evaluation and monitoring of patients with acute heart failure syndromes. *Am J Cardiol*. 2005;96:32G-40G.
- 6 Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:161-7.
- 7 McCullough PA, Nowak RM, McCord J, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) multinational study. *Circulation*. 2002;106:416-22.
- 8 McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet*. 1998;351:9-13.
- 9 Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, et al. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet*. 1997;350:1349-53.
- 10 De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2001;345:1014-21.
- 11 Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients. The International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J*. 2006;27:330-7.
- 12 Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, et al. The N-Terminal Pro-BNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study. *Am J Cardiol*. 2005;95:948-54.
- 13 Svedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). The task force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2005;26:1115-1140.
- 14 Voors AA, Kirkels JH. *Leerboek Hartfalen*. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2007.
- 15 Ricós C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:491-500.