



Specificity of B-Type Natriuretic Peptide Assays: Cross-Reactivity with Different BNP, NT-proBNP, and proBNP Peptides

Amy K. Saenger,¹ Olaia Rodriguez-Fraga,² Ranka Ler,³ Jordi Ordonez-Llanos,⁴ Allan S. Jaffe,⁵
Jens Peter Goetze,⁶ and Fred S. Apple^{1,7*}

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: A.K. Saenger, *Clinical Chemistry*, AACC; F.S. Apple, *Clinical Chemistry*, AACC.

Consultant or Advisory Role: A.K. Saenger, Roche Diagnostics; A.S. Jaffe, Beckman Coulter, Alere, Abbott, Roche, ET Healthcare, Siemens, Diadexus, Lpath, Nterogenix, and Novartis; F.S. Apple, Philips Healthcare Incubator, Metanomics Health, and HyTest.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: IFCC committee and the Minneapolis Medical Research Foundation.

Expert Testimony: None declared.

Patents: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, and final approval of manuscript.

译: 王楠 校对: 奚苏静

BNP检测系统的特异性——与不同BNP, NT-proBNP和proBNP肽段间的交叉反应

1. 简介

BNP 和 NT-proBNP 作为标志物已经被收录于各临床指南,并在心衰诊疗领域被广泛应用。当心肌壁压力升高时,proBNP 会合成释放并裂解为 BNP(1-32) 和 NT-proBNP(1-76)。而 BNP 则会在一些受体或酶的作用下进一步被截断。在心衰患者血浆中,存在多种 proBNP 的派生物,如截断的 3-32、4-32、5-32 BNP 及糖基化的 NT-proBNP (以上 proBNP 相关多肽统称为 NPs),仅有少量的完整 1-32 BNP 分子存在于外周循环中。

正如我们第三期精品文章解读中所提到的,不同的 BNP 检测系统使用的抗体和校准品不同,导致了检测结果

的差异,即使是以 Roche 抗体为主的 NT-proBNP 不同检测平台测试不同样本类型,也依然存在差异。因此,在未来如何推进 NPs 检测的标准化,依然是重点研究方向之一。早期的研究已经指出 ProBNP 和 NT-proBNP 的糖基化会影响到商业化试剂盒的定量检测,因此研究不同商业化试剂对于不同糖基化和非糖基化 NPs 的交叉反应,对于未来实现 NPs 检测标准化具有重要意义。此外,随着一些心衰新药的上市,如 ARNI 等,均会对体内 NPs 的浓度产生影响,因此如何确保试剂盒能最可靠的检出 NPs 至关重要。

本研究旨在对不同 BNP、NT-proBNP 和 proBNP 试剂对于糖基化和非糖基化 NPs 的特异性进行深入的系统研究。

2. 实验材料与方法：

2.1 血浆样本：样本的处理及保存请参考原文。当试剂准备齐全后，在混合血浆中添加蛋白酶抑制剂。对血浆进行BNP、proBNP和NT-proBNP的基线浓度测试后，分别人工添加100 ng/L BNP、300 ng/L proBNP和450 ng/L NT-proBNP，并使用所有试剂重新进行测定，以计算交叉反应率。

2.2 BNP、NT-proBNP和proBNP*。

2.3 NPs 免疫分析系统*：5种BNP商品化试剂盒，

见Table 1；10种商品化NT-proBNP试剂盒，见Table 2；3种科研用proBNP试剂盒，分别为Bio-rad、Goetze和Biosite (Alere)，其中Biosite试剂使用HyTest提供的糖基化proBNP进行校准。

2.4 统计学方法*：每个样本重复测量两次；BNP、proBNP或NT-proBNP的添加回收率计算方法为：测定浓度除以添加前样本的基线浓度乘以100%。非特异偏差的标准为交叉反应率20%。

* 详细信息请参见原文

Supplemental Table 1: Analytical Characteristics of BNP Assays

Manufacturer	Platform	Capture Antibody	Detection Antibody	Standard Material	CV (Conc)	Limit of Detection
Abbott	Architect	NH2 terminus and part of the ring structure (Scios), murine monoclonal Ab, aa 5-13	COOH terminus, murine monoclonal Ab, aa 26-32	Synthetic BNP 32	4.1% (92 ng/L)	≤10 ng/L
Abbott POC	i-STAT	NH2 terminus and part of the ring structure (Scios), murine monoclonal Ab, aa 5-13	COOH terminus, murine monoclonal Ab, aa 26-32	Synthetic BNP 32	9.0% (126 ng/L)	15 ng/L
Alere	Triage	NH2 terminus and part of the ring structure (Scios), murine monoclonal Ab, aa 5-13	BNP (Biosite), murine Omniclonal Ab, epitope not characterized	Recombinant BNP	4.1% (77 ng/L)	5 ng/L
Beckman Coulter	Access 2	BNP (Biosite), murine Omniclonal Ab, epitope not characterized	NH2 terminus and part of the ring structure (Scios), murine monoclonal Ab, aa 5-13	Recombinant BNP	6.7% (1344 ng/L)	<1 ng/L
Siemens	Advia Centaur	COOH terminus (BC-203) (Shionogi), murine monoclonal Ab, aa 27-32	Ring structure (KY-hBNP II) (Shionogi), murine monoclonal Ab	Synthetic BNP	9.9% (29 ng/L)	<2 ng/L

Reference adapted from: <http://www.ifcc.org/media/276711/IFCC%20NP%20Assay%20Table%20November%202014.pdf>

Supplemental Table 2: Analytical Characteristics of NT-proBNP Assays

Manufacturer	Platform	Capture Antibody	Detection Antibody	Standard Material	% CV (Conc)	Limit of Detection
bioMérieux	VIDAS	Murine monoclonal Ab, aa 27-31	Central molecule, polyclonal sheep Ab, aa 42-46	Synthetic NT-proBNP 1-76	3.8% (117 ng/L)	20 ng/L
Mitsubishi Chemical	PATHFAST	NH2 terminus polyclonal sheep Ab, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep Ab, aa 39-50	Synthetic NT-proBNP 1-76	4.7% (101 ng/L)	15 ng/L
Ortho Clinical Diagnostics	Vitros Eci	NH2 terminus polyclonal sheep Ab, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep Ab, aa 39-50	Synthetic NT-proBNP 1-76	1.8% (80 ng/L)	5 ng/L
Response Biomedical	RAMP	Murine monoclonal Ab, aa 27-21	Central molecule, polyclonal sheep Ab, aa 39-50	Synthetic NT-proBNP 1-76	12.1% (113 ng/L)	35 ng/L
Roche	Elecsys	Murine monoclonal Ab, aa 27-31	Central molecule, monoclonal sheep Ab, aa 42-46	Synthetic NT-proBNP 1-76	3.2% (175 ng/L)	5 ng/L
Siemens (Dade Behring)	Stratus CS	NH2 terminus monoclonal sheep Ab, aa 22-28	Central molecule, monoclonal sheep Ab, aa 42-46	Synthetic NT-proBNP 1-76	5.1% (153 ng/L)	15 ng/L
Siemens (Dade Behring)	Dimension	NH2 terminus monoclonal sheep Ab, aa 22-28	Central molecule, monoclonal sheep Ab, aa 42-46	Synthetic NT-proBNP 1-76	5.7% (159 ng/L)	10 ng/L
Siemens (DPC)	Immulinite 2000	NH2 terminus polyclonal sheep Ab, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep Ab, aa 39-50	Synthetic NT-proBNP 1-76	4.4% (146 ng/L)	10 ng/L
Siemens (DPC)	Immulinite 2500	NH2 terminus polyclonal sheep Ab, aa 1-21	Central molecule, polyclonal sheep Ab, aa 39-50	Synthetic NT-proBNP 1-76	4.4% (146 ng/L)	10 ng/L

Reference adapted from: <http://www.ifcc.org/media/276711/IFCC%20NP%20Assay%20Table%20November%202014.pdf>

3. 结果分析：

BNP 试剂与 BNP、proBNP 和 NT-proBNP 的交叉反应如 Fig 1 所示。西门子与贝克曼试剂与 3-32BNP 存在显著的交叉反应，分别为 28% 和 20%。所有 BNP 试剂均与 1-32BNP 存在显著交叉反应 (90%-178%)。西门子、贝克曼和雅培 i-STAT BNP 试剂与 HyTest 糖基化和非糖基

化 proBNP 的交叉反应率类似，而 Alere 和雅培 Architect 试剂对糖基化和非糖基化的 proBNP 的交叉反应却存在显著差异，分别为 2 倍和 7 倍。所有试剂均与 Scios 糖基化 proBNP 存在显著 (20%) 交叉反应。此外，所有试剂与 NT-proBNP 均无交叉反应。

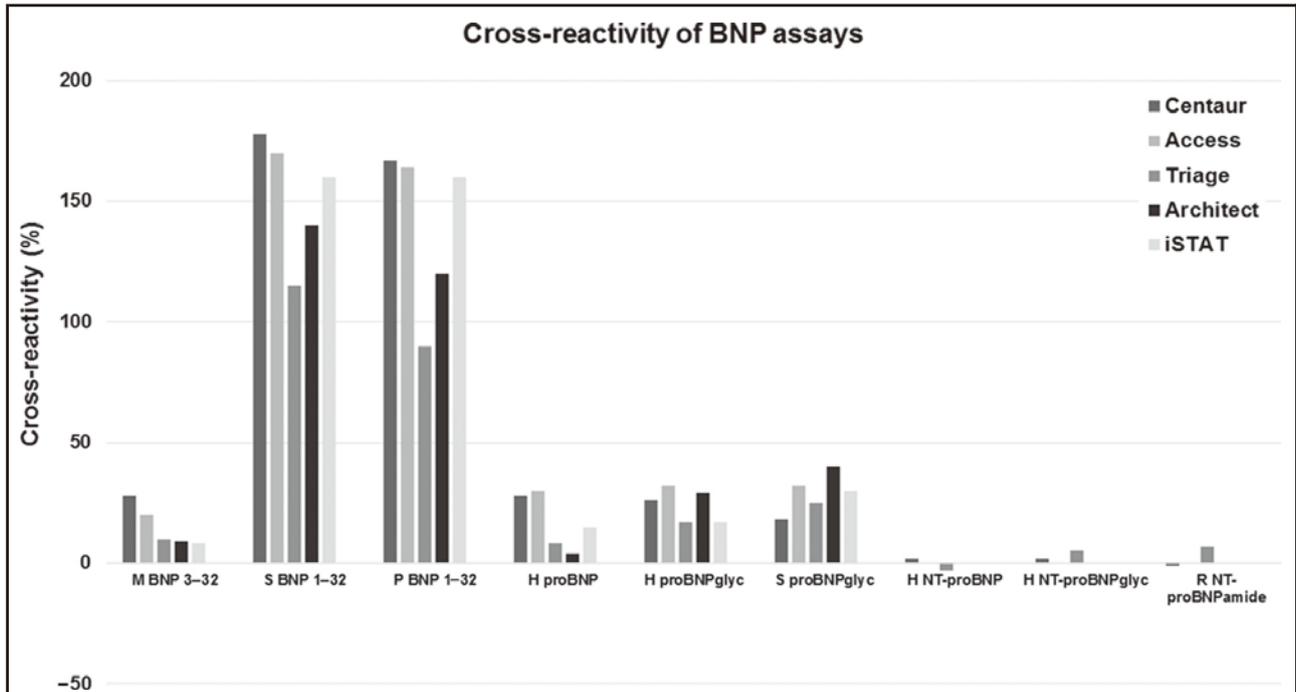


Fig. 1. Cross-reactivity of BNP assays.

Five commercial BNP immunoassays and cross-reactivity (%) with BNP peptides (Mayo, M BNP 3-32; Scios, S BNP 1-32; Peptide Institute, P BNP 1-32), proBNP peptides (HyTest nonglycosylated proBNP, H proBNP; HyTest glycosylated proBNP, H proBNPglyc; Scios glycosylated proBNP, S proBNPglyc), and NT-proBNP peptides (HyTest nonglycosylated NT-proBNP, H NT-proBNP; HyTest glycosylated NT-proBNP, H NT-proBNPglyc; Roche nonglycosylated amidated NT-proBNP, R NT-proBNPamide).

NT-proBNP 试剂与 BNP、proBNP 和 NT-proBNP 的交叉反应分别如 Fig 2、3 和 4 所示。所有试剂均与 BNP 存在极小的交叉反应，其中 RAMP 试剂与合成的 1-32BNP 的交叉反应为 -15%。罗氏和梅里埃采用了相似的抗体组合，但是对于 NT-proBNP 的交叉反应却不相同。其中，对 HyTest 非糖基化 NT-proBNP 的交叉反应率分别为 72% 和 218%；对 Roche NT-proBNP 的交叉反应率分别为 47% 和 161%。对于 Pathfast 和 Vitros NT-proBNP 试剂

以及 Dimension 和 Stratus NT-proBNP 试剂，虽然这两对试剂使用了完全相同的抗体，但是却对 HyTest 和 Roche 的 NT-proBNP 呈现出不同的交叉反应。所有 NT-proBNP 试剂均与 HyTest 和 Scios 的糖基化 proBNP 无交叉反应。所有 NT-proBNP 试剂均与重组人 proBNP 存在显著交叉反应，其中罗氏和西门子的试剂的交叉反应率最低。

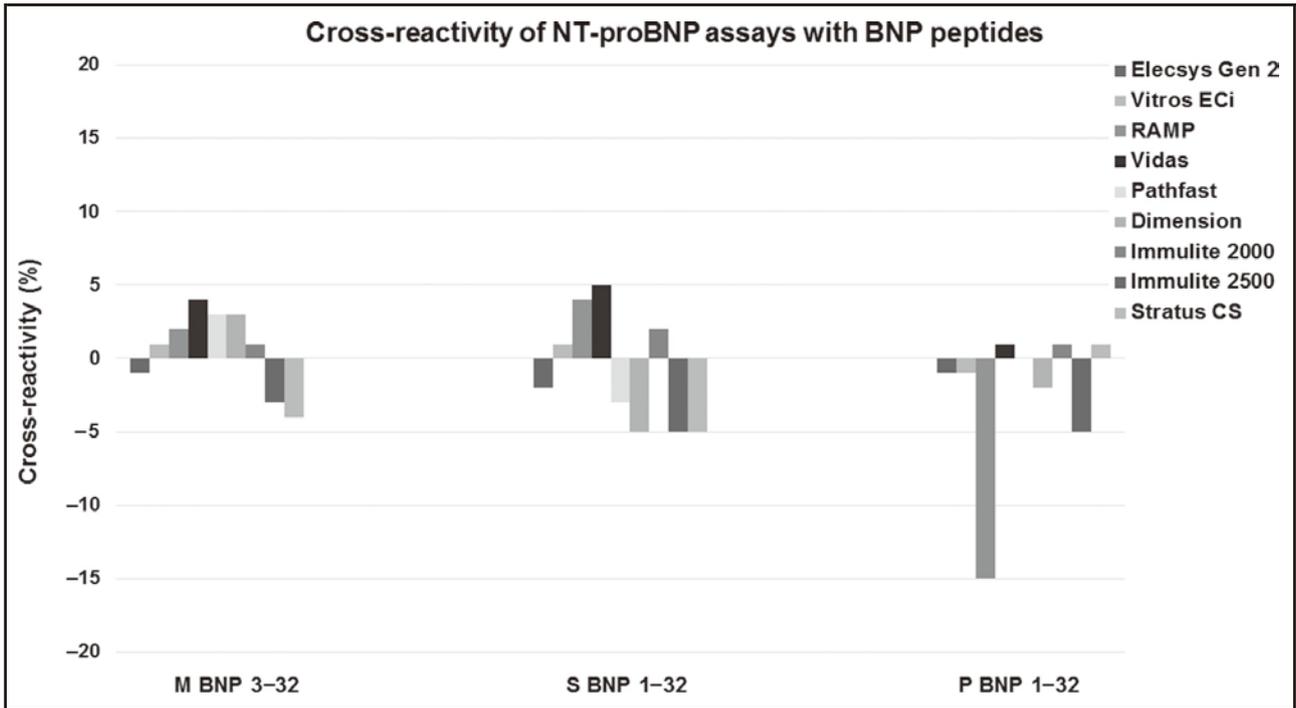


Fig. 2. Cross-reactivity of NT-proBNP assays with BNP peptides.

Nine commercial NT-proBNP immunoassays and cross-reactivity (%) with BNP peptides (Mayo, M BNP 3-32; Scios, S BNP 1-32; Peptide Institute, P BNP 1-32).

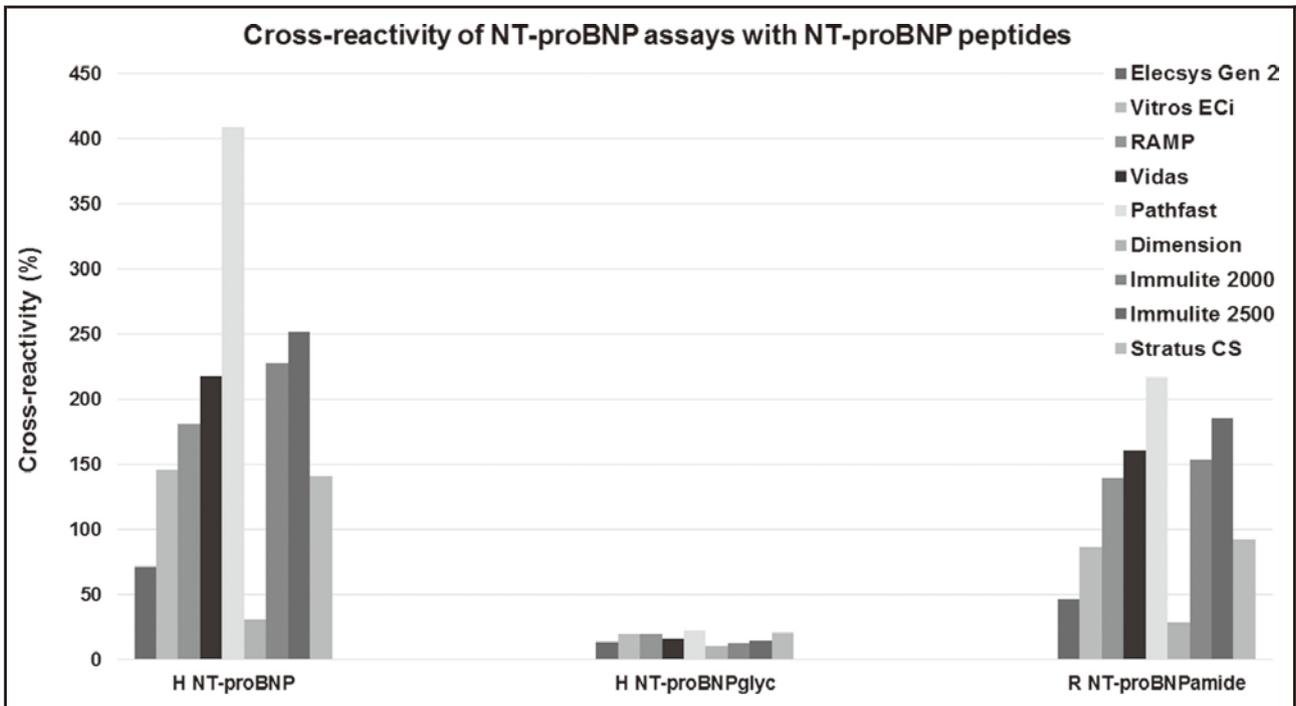


Fig. 3. Cross-reactivity of NT-proBNP assays with NT-proBNP peptides.

Nine commercial NT-proBNP immunoassays and cross-reactivity (%) with NT-proBNP peptides (HyTest nonglycosylated NT-proBNP, H NT-proBNP; HyTest glycosylated NT-proBNP, H NT-proBNPglyc; Roche nonglycosylated amidated NT-proBNP, R NT-proBNPamide).

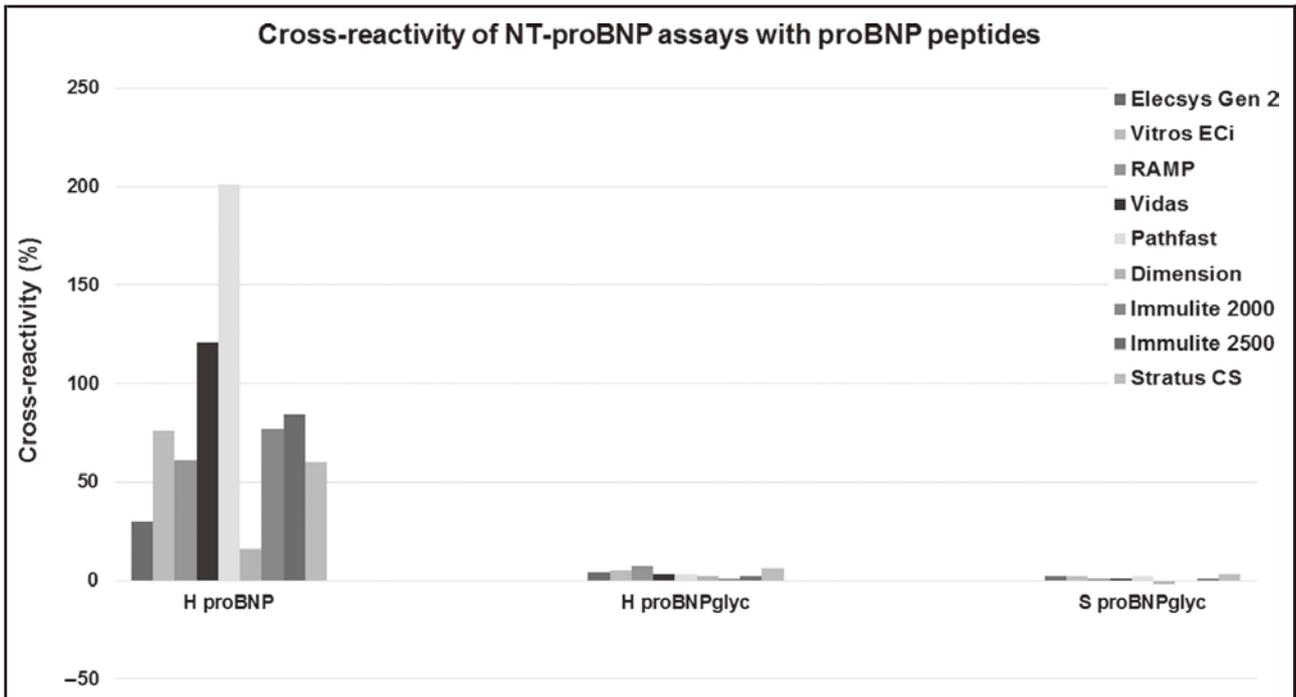


Fig. 4. Cross-reactivity of NT-proBNP assays with proBNP peptides.

Nine commercial NT-proBNP immunoassays and cross-reactivity (%) with proBNP peptides (HyTest nonglycosylated proBNP, H proBNP; HyTest glycosylated proBNP, H proBNPglyc; Scios glycosylated proBNP, S proBNPglyc).

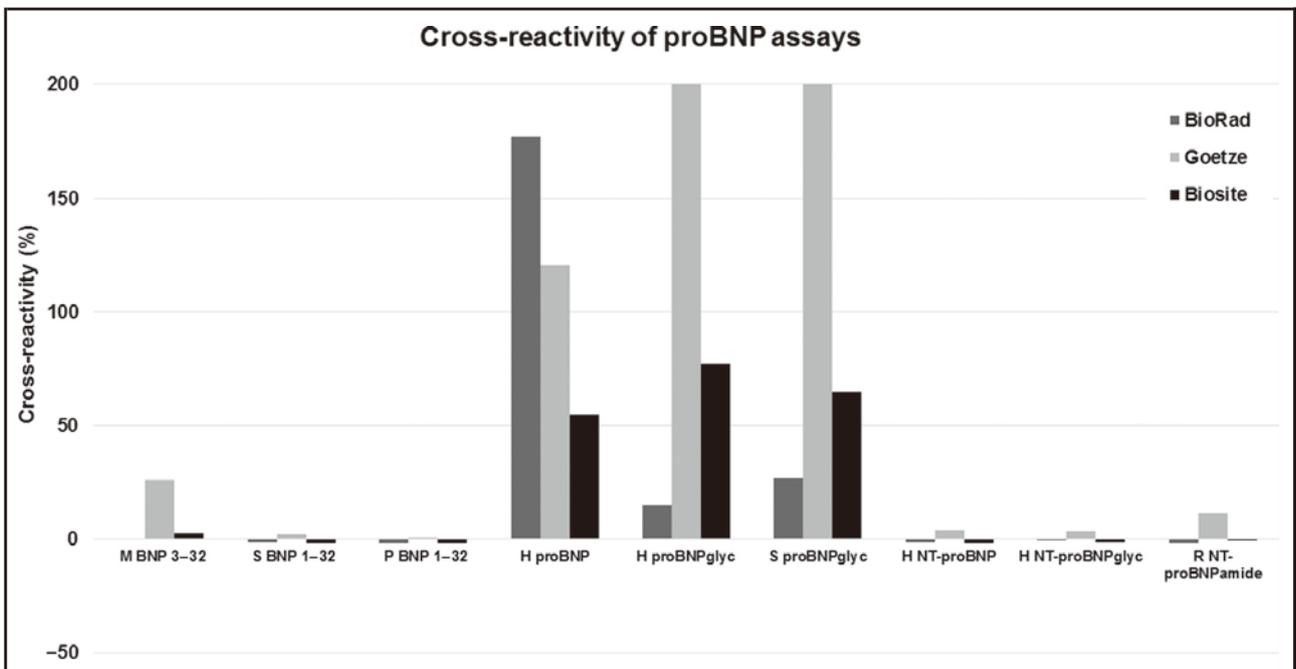


Fig. 5. Cross-reactivity of proBNP assays.

Three research-use-only proBNP immunoassays and cross-reactivity (%) with BNP peptides (Mayo, M BNP 3-32; Scios, S BNP 1-32; Peptide Institute, P BNP 1-32), proBNP peptides (HyTest nonglycosylated proBNP, H proBNP; HyTest glycosylated proBNP, H proBNPglyc; Scios glycosylated proBNP, S proBNPglyc), and NT-proBNP peptides (HyTest nonglycosylated NT-proBNP, H NT-proBNP; HyTest glycosylated NT-proBNP, H NT-proBNPglyc; Roche nonglycosylated amidated NT-proBNP, R NT-proBNPamide).

ProBNP 试剂与 BNP、proBNP 和 NT-proBNP 的交叉反应如 Fig 5 所示。结果显示, 仅 Goetze 与所有 BNP 肽段存在交叉反应。其中与 3-32 BNP 的交叉反应率高达 26%。Biosite proBNP 试剂 (可识别糖基化与非糖基化 proBNP, 有糖基化 proBNP 校准) 对于 3 种不同的 proBNP 呈现出相似的交叉反应。不同 proBNP 试剂在识别糖基化 proBNP 时出现了显著差异, 其中 Goetze 试剂交叉反应性最高 (324%-426%), 而 Biorad 试剂对于糖基化 proBNP 的交叉反应性最低 (15%-27%)。此外, 所有 proBNP 试剂均与 NT-proBNP 无显著交叉反应。

4. 启示与讨论 :

本研究证实 BNP 和 NT-proBNP 试剂均与 proBNP 存在显著交叉反应。本文独特性在于系统地确认了 : (a) BNP 试剂与 NT-proBNP 无交叉反应 ; (b) NT-proBNP 试剂不会识别 BNP 以及糖基化 proBNP 派生的相关多肽 (心衰患者中主要的存在形式) ; (c) proBNP 试剂对于不同形式的 proBNP 抗原均具有高度特异性, 这可能有助于阐明 1-108 proBNP 的外周处理过程, 尤其针对心衰及糖尿病这种糖基化程度高度差异的个体。

利钠肽在体内释放、降解、清除的病理生理学机制极为复杂。外周循环中 NPs 存在的多样化给定量检测带来了极大的挑战。不同商品化试剂盒之间对于 NPs 存在不同程度的交叉反应, 进而导致了试剂间显著的系统差异。

所有 BNP 试剂均与 proBNP 存在交叉反应, 因为 proBNP 的 C 末端即为完整的 1-32 BNP。另外, 已经有研究证实, 体内主要的 BNP 形式并非 1-32 BNP, 而是 3-32 BNP。因此, BNP 试剂实际上检测的是外周循环中 proBNP、完整 BNP 和截断 BNP 的总和。BNP 检测试剂间的检测结果存在一定差异, 即使使用相同抗体组合的试剂之间也有存在差异, 这提示可能有其他干扰因素影响了 BNP 的测定结果。

之前我们假设, NPs 试剂间的系统差异主要归结于对于糖基化 / 非糖基化 proBNP 交叉反应的差异。ProBNP 在翻译后修饰过程中, Thr36、Ser37、Ser44、Thr48、Ser52、Thr58 和 Thr71 均可能被糖基化, 其中 Thr71 是 proBNP 进一步降解为 NT-proBNP 的关键糖基化位点 (该位点的糖基化会抑制 proBNP 的进一步降解)。因此, 外周

循环中 proBNP 主要形式为 Thr71 糖基化形式, 而 NT-proBNP 则为 Thr71 非糖基化形式。通过结果分析发现, 所有 NT-proBNP 试剂均无法识别糖基化 proBNP 相关多肽, 因为 O- 多糖会封闭抗体的识别位点。而 Bio-Rad 和 Goetze 的 proBNP 则可以识别糖基化 proBNP, 同时由于 Bio-Rad 试剂识别的是 proBNP 特异性位点, 因此与 BNP 和 NT-proBNP 无交叉反应。且由于 Bio-Rad 可以识别糖基化 proBNP, 因此该试剂的检测结果可能会反映出外周循环中真实的 proBNP 含量。关于 proBNP 试剂与糖基化 / 非糖基化 proBNP 检测关系的临床关联性则有待深入研究。

不同个体的糖基化程度会对检测结果产生重要影响。之前的研究显示, 罗氏 Elecsys Gen I 试剂 (检测抗体位点位于 39-50aa), 很难检出糖基化 NT-proBNP。该结论在本研究中得到了进一步证实。在去糖基化后, 检测结果显著升高, 提示罗氏试剂仅能检出真实 NT-proBNP 浓度的 20%。而罗氏 Elecsys Gen II 试剂依然使用了糖基化区域的抗体 (42-46aa)。同时, 几乎所有临床使用的 NT-proBNP 试剂均使用了 Roche I 或 II 抗体。本研究结果显示, 该试剂仅与糖基化 NT-proBNP 存在微弱反应。由于不同心衰患者的糖基化程度存在差异, 因此目前的商品化 NT-proBNP 试剂的检测结果均不同程度的低于“真实”结果。对呼吸困难患者进行去糖基化 NT-proBNP 检测, 可以显著提高诊断和预后的准确性, 这也提示关于 NT-proBNP 试剂的抗体位点选择仍有待进一步提高, 以最大程度避免糖基化影响。

试剂间校准方法的差异也是造成检测结果差异的一个重要原因。因此, 推进检测标准化的一个潜在策略即使用统一的可以等摩尔代表所有外泌前体分子的体外生产的肽段作为通用校准品, 以避免内源性分子带来的干扰和交叉反应。然而, 使用内源性 proBNP 相关多肽对试剂进行校准时也存在一些问题, 因为心血管疾病个体和非心血管疾病个体间的完整 proBNP 和 proBNP 片段也存在差异, 而且关于通用校准品应使用糖基化肽段还是非糖基化肽段仍然没有明确定论。

总之, 尽管目前 NPs 检测缺乏标准, 但临床指南中仍然建议使用统一的参考值。为了更好管理心衰疾病, NPs 检测标准化进程必将在机遇与挑战中逐步实现。