

## Comparaison des taux de BNP et NT-proBNP chez des patients insuffisants rénaux pour prévenir l'insuffisance cardiaque

C. Le Goff<sup>1</sup>, J.-F. Kaux<sup>2</sup>, C. Bouy<sup>3</sup>, A. Da Silua<sup>4</sup>, J.-P. Chapelle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de Biologie Clinique, Service de Chimie Médicale, Université de Liège, CHU, Sart Tilman, Belgique.

<sup>2</sup> Département des Sciences de la Motricité, Service de Médecine de l'Appareil Locomoteur, Université de Liège, CHU, Sart Tilman, Belgique.

<sup>3</sup> Département de Médecine Interne, Service de Néphrologie, Université de Liège, CHU, Sart Tilman, Belgique.

<sup>4</sup> Département de Pharmacie, Université de Coimbra, Portugal.

### Résumé

*Introduction* : Le but de notre est était de comparer les performances du BNP et du NT-proBNP dans le diagnostic d'insuffisance cardiaque dans une population de patients atteints d'insuffisance rénale (créatinine plasmatique > 1,5mg/dl).

*Patients et méthodes* : Quatre-vingt dix-huit patients furent inclus dans notre étude prospective. Le dosage du BNP et du NT-proBNP a été réalisé respectivement par une technique d'immunofluorescence (Biosite®) et par une technique d'électro-chemiluminescence (Roche Diagnostic®).

*Résultats et discussion* : Les taux de BNP et NT-proBNP sont corrélés chez les CRI et NON CRI. Les deux marqueurs sont utiles pour mettre en évidence des patients CRI suspectés d'insuffisance cardiaque. Cependant, chez ceux-ci, une limite de décision plus haute devrait être envisagée pour augmenter la valeur prédictive positive de ces marqueurs.

### Comparison of BNP and NT-proBNP performances for assessing heart failure in a population of patients with high incidence of renal insufficiency

#### Abstract

*Background*: The aim of the study is to compare the performances of BNP and NT-proBNP for diagnosing heart failure (HF) in a population of patients with high incidence of chronic renal insufficiency (CRI, plasma creatinine > 1.5 mg/dl).

*Patients and methods*: Ninety-eight patients were included in this study. BNP and NT-proBNP determinations were performed by an immunofluorescent assay (Biosite®) and by an electrochemi-luminescence sandwich immunoassay (Roche Diagnostic®), respectively.

*Results and discussion*: BNP and NT-proBNP level are correlated in CRI and non CRI. Both assays are useful to rule out CRI pts suspected of HF. However, in renal failure pts, higher decision limits should be used for improving the positive predictive value of the assays.

#### Abréviations :

CRI : insuffisants rénaux chroniques  
NON CRI : non insuffisants rénaux chroniques  
CRF : Chronic Renal Failure (=CRI)  
NON CRF : (= NON CRI)

### INTRODUCTION

La distinction rapide et sûre entre (IC) et autres causes de dyspnée constitue actuellement un vrai défi, en particulier aux urgences [1,2]. Le dosage des peptides natriurétiques a probablement, de nombreuses applications. Actuellement, l'application validée est le diagnostic étiologique de la dyspnée aiguë [3]. La dyspnée est le symptôme le plus fréquemment rencontré et le plus souvent révélateur de l'IC.

### OBJET DE L'ÉTUDE

Le but de cette étude est de comparer les performances de BNP (Biosite®) et de NT-proBNP (Roche®) pour le diagnostic d'IC dans une population de patients avec une haute incidence d'insuffisance rénale chronique (CRI,

créatine plasmatique > 1,5 mg/dl).

Les différences entre les deux peptides (BNP et NT-proBNP) sont liées à leur physiopathologie et à leurs méthodes de dosage. Le BNP a une demi-vie très courte, d'environ 20 minutes. La demi-vie du NT-proBNP est plus longue que celle du BNP aux alentours de 90 à 120 minutes [4]. Le NT-proBNP semble plus stable dans le temps que le BNP [5], mais est probablement plus dépendant du débit de filtration rénal [6]. Son taux sérique étant plus important que celui du BNP l'imprécision dans sa mesure sera moindre. La différence entre les demi-vies plasmatiques du BNP et du NT-proBNP explique que leurs concentrations ne puissent être équivalentes, même si pour chaque molécule de peptide de type BNP créée et sécrétée, un peptide NT-proBNP est créé. Les taux ne sont donc pas comparables.

Les dosages du BNP et de NT-proBNP se font par méthode « sandwich », au moyen de deux anticorps dirigés contre deux épitopes.

Les variations liées aux techniques de dosage, qui peuvent aussi correspondre à des variations physiologiques des deux peptides, ont été évaluées par des dosages répétés sur des volontaires sains pendant huit semaines. La variation intra-individuelle pour les différentes méthodes de dosage du BNP était de 40 à 60 % et de 33 % pour le dosage du NT-proBNP. La variation inter-individuelle était équivalente pour les deux peptides, estimée à pratiquement 40 % [7]. Il est recommandé d'utiliser une seule et même méthode de dosage pour suivre un patient.

Un élément important dans le choix de l'utilisation d'un peptide par rapport à l'autre, est l'existence d'un consensus international sur les seuils susceptibles d'être proposés pour une méthode de dosage et une application donnée [8]. La différence de demi-vie est aussi un élément important dans le choix entre les deux peptides.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

Cette étude prospective a été menée pour montrer l'importance des différences cliniques et analytiques entre les dosages de BNP (Triage<sup>®</sup>) et du NT-proBNP (Roche<sup>®</sup>). La précision des dosages des deux peptides doit être comparée avec le diagnostic final. Il doit exister une corrélation entre les résultats analytiques. Cette étude a inclus 98 patients (47 hommes (âge moyen 76 ± 25 ans) et 51 femmes (âge moyen 65 ± 38 ans) du Centre Hospitalier Universitaire de Liège. La population de patients a été divisée en deux groupes selon leur taux de créatinine plasmatique : un groupe de 43 patients sans insuffisance rénale et un groupe de 55 patients avec une insuffisance rénale (8,6 mg/dl). Le diagnostic d'insuffisance rénale a été posé grâce au dosage de l'urée et la créatinine. Dans ces groupes, nous avons fait des sous-groupes en fonction du statut cardiaque des patients établi par un cardiologue sur base de l'examen clinique, des antécédents, de l'électrocardiogramme et d'une radiographie thoracique. Dans le premier groupe, nous avons 35 patients sans insuffisance cardiaque (IC) et 8 avec IC. Dans le deuxième groupe, nous avons 32 patients IC et 23 sans IC. Le BNP a été dosé au moyen d'une technique par immunofluorescence ou « méthode froide » (Triage BNP). Cette technique permet d'obtenir le dosage plasmatique de BNP en 15 minutes. Deux cent cinquante microlitres de plasma ou de sang veineux périphérique sur trihydrate d'éthylènediamine-tétracétique trisodique (EDTA) sont requis. Le système Triage comprend deux composants de base : les dispositifs de diagnostic et le Triage MeterPlus. Les dispositifs de diagnostic sont des cartouches à usage individuel destinées à effectuer des dosages de diagnostic spécifiques à partir d'échantillons de patients. Le Triage MeterPlus est un fluorimètre portable qui lit et interprète les informations à partir d'un dispositif de diagnostic et fournit les résultats au format papier et électronique. Le Triage MeterPlus détecte le BNP marqué et lié dans chaque zone de dosage en excitant le marqueur avec un laser et en détectant le signal fluorescent. La quantité de signal fluorescent peut être mesurée de façon précise, permettant l'évaluation quantitative du BNP. L'appareil de mesure enregistre les informations provenant de la Reagent Code Chip pour créer une courbe précise d'étalonnage permettant de déterminer la concentration du BNP.

Durant l'incubation, l'échantillon du patient continue de s'écouler dans le dispositif de diagnostic. Le traitement de l'échantillon commence immédiatement après l'inoculation, que le dispositif soit ou non placé dans l'appareil de mesure. Celui-ci contrôle le dispositif pour évaluer sa progression en lisant une zone à l'extrémité de la voie de dosage. Quand l'appareil de mesure détecte que toutes les zones de dosage ont été suffisamment incubées et lavées, il mesure systématiquement la fluorescence aux zones de contrôle et de dosage. L'appareil de mesure analyse le signal provenant de chaque zone de test pour établir si le résultat de BNP doit être rapporté.

Des contrôles de réactifs incorporés assurent que le dispositif de test a fonctionné convenablement et que la procédure a été effectuée correctement. Le test contient tous les réactifs nécessaires à la quantification du BNP.

du plasma et du sang total anticoagulés par l'EDTA. Il contient des anticorps mono-clonaux et polyclonaux de souris dirigés contre le BNP, marqués par teinture fluorescente et immobilisés en phase solide, et des stabilisateurs. Le dosage de BNP doit être réalisé au maximum dans les 4 heures qui suivent le prélèvement. Si le test ne peut pas être effectué dans les 4 heures, on doit séparer le plasma et le conserver à -20 °C jusqu'à réalisation du test. La sensibilité du BNP à différentes protéases nécessite la prise de précautions au niveau pré-analytique : il est recommandé d'utiliser des tubes en polypropylène ou en verre silicone [9]. La plage de mesure du test est comprise entre 5 pg/ml et 5 000 pg/ml avec un coefficient de variation de la mesure de 10-13 % [10]. Le dosage est linéaire dans la plage mesurable du test. La limite de la sensibilité analytique est inférieure à 5 pg/ml (intervalle de confiance de 95 % 0,2-4,8 pg/ml). La spécificité est de 98 %, en utilisant une valeur seuil de 100 pg/ml. Dans les études initiales, le Triage BNP Test a fourni une précision de diagnostic de 98 % par rapport à toutes les autres conclusions cliniques concernant des patients avec ou sans antécédents de maladie et ont corrigé 96 % des diagnostics incorrects de patients suspectés d'avoir une IC [11].

Le dosage du NT-proBNP a été effectué par une technique par électrochimiluminescence sur automate Modular E de Roche. Cette technique utilise deux anticorps polyclonaux : un anticorps biotinylé (dirigé contre la séquence des acides aminés 1 à 21) et un anticorps marqué au ruthénium (dirigé contre la séquence des acides aminés 39 à 50). Le temps d'analyse est de 18 minutes. Vingt micro-litres de plasma (EDTA ou héparine) ou sérum sont requis pour l'analyse. Le dosage de NT-proBNP se fait par méthode « sandwich » :

-1<sup>re</sup> incubation : Une prise d'essai de l'antigène dans 20 microlitres d'échantillon est mise en présence de l'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP spécifique marqué à la biotine et d'un anticorps polyclonal anti-NT-proBNP spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un « sandwich ».

- 2<sup>e</sup> incubation : Les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

-Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage d'un liquide de lavage (CleanCell). L'adjonction de tripropylamine (TPA) contenu dans le réactif Procell, réduit le Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>+</sup> en Ru(bpy)<sub>2</sub><sup>-</sup> et la différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui sera mesurée par un photomultiplicateur

- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration mémorisée dans le code-barres du réactif.

Le test NT-proBNP a été standardisé par pesée de NT-proBNP synthétique pur dans une matrice de sérum humain. Une calibration doit être effectuée par lot, en utilisant du réactif frais (ayant été enregistré depuis au maximum 24 heures par l'appareil). Le domaine de mesure est de : 5-35 000 pg/ml. Les valeurs de référence varient en fonction de l'âge et du sexe des patients. Au CHU de Liège, les valeurs normales attendues chez les femmes sont : < 153 pg/ml (< 50 ans) ; < 334 pg/ml (50-75 ans) et < 450 pg/ml (> 75 ans). Les valeurs normales attendues chez les hommes sont : < 88 pg/ml (< 50 ans) ; < 227 pg/ml (50-75 ans) ; < 450 pg/ml (>75 ans).

Sur le plan analytique, les avantages du dosage du NT-proBNP sont nombreux :

- le NT-proBNP peut être prélevé sur plusieurs types d'échantillons : plasma EDTA, plasma hépariné ou sérum ;
- le NT-proBNP a une longue stabilité (après centrifugation, 3 jours à une température entre 20-25 °C et 2-8 °C, 12 mois à -20°C)[5];
- la demi-vie du NT-proBNP est de 5 à 6 fois plus longue que celle du BNP (90-120 minutes versus 20 minutes) ;
- les taux bas de NT-proBNP ont une très forte valeur prédictive négative d'insuffisance cardiaque chez un patient dys-pnéique et il y a de ce fait un faible risque d'erreur de diagnostic. La reproductibilité a été déterminée selon un protocole du National Committee for Clinical Laboratory Standards. Les résultats suivants ont été obtenus : C.V. (coefficient de variation) intra-série : 0,8-3,0 % et C.V. inter-série : 2,2-5,8 %. La sensibilité est de 5 pg/ml tandis que la sensibilité fonctionnelle est < 50 pg/ml. Le pourcentage de réactions croisées avec le BNP l'ANP et le CNP est < 0,001 % [12], La méthode de dosage est très importante pour pouvoir interpréter les résultats de BNP et de NT-proBNP En effet, es taux mesurés selon différentes méthodes ne sont pas identiques. Il est donc recommandé d'utiliser une seule et même méthode de dosage pour pouvoir suivre un patient.

Le dosage du BNP (Triage, *Biosite*) est positif si le résultat est supérieur à 100 pg/ml. Le dosage du NT-proBNP (Modular E, *Roche*) est positif si le résultat obtenu est supérieur à 125 pg/ml pour les patients âgés de moins de 75 ans ou, supérieur à 450 pg/ml pour les patients âgés de plus de 75 ans.

## RÉSULTATS

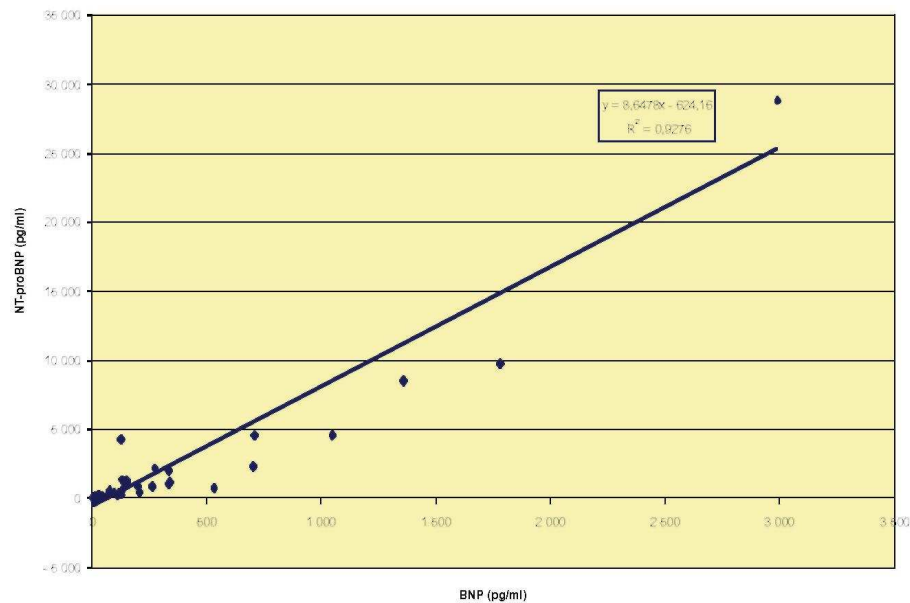
Tout d'abord, il existe une corrélation entre BNP et NT-proBNP dans le groupe de patient insuffisants rénaux qu'ils soient atteints ou non, d'insuffisance cardiaque.

Parmi les patients non CRI, la valeur moyenne obtenue pour le dosage du BNP est de 347 pg/ml et pour le dosage du NT-proBNP est de 2 375 pg/ml. Le rapport moyen entre ces deux marqueurs est de 8,65.

Chez les insuffisants rénaux, la valeur moyenne obtenue pour le BNP est de 1 109 pg/ml et de 16 374 pg/ml pour le NT-proBNP. Le rapport moyen entre ces deux marqueurs est de 14,76. Nous observons une meilleure corrélation entre les deux marqueurs chez les patients non CRI ( $R^2 = 0,93$ ) (figure 1) alors que dans le groupe des CRI, nous trouvons une corrélation de 0,86 ( $R^2 = 0,86$ ) (figure 2).

Le dosage du BNP (Triage, *Biosite*) est positif si le résultat est supérieur à 100 pg/ml. Le dosage du NT-proBNP (Modular E, *Roche*) est positif si le résultat obtenu est supérieur à 125 pg/ml pour les patients âgés de moins de 75 ans ou, supérieur à 450 pg/ml pour les patients âgés de plus de 75 ans. Pour BNP, la sensibilité pour mettre le diagnostic d'une insuffisance cardiaque est de 92 % alors qu'elle est de 98 % pour le NT-proBNP. La valeur prédictive négative est de 90 % pour le BNP et de 94 % pour le NT-proBNP. La spécificité est étonnamment basse, avec 43 % pour le BNP et 31 % pour NT-proBNP et donc une valeur prédictive quelque peu décevante avec 49 % pour BNP et 52 % pour NT-proBNP.

**Figure 1 :** Corrélation NT-proBNP et BNP pour des patients non CRF ( $n = 43$ ).



## CONCLUSIONS

Tout d'abord, nous notons que l'augmentation de l'un des deux peptides s'accompagne presque toujours (87 %) d'une augmentation du second. En effet, nous relevons des cas où le BNP est négatif et le NT-proBNP positif, ce que nous pourrions expliquer par l'insuffisance rénale modérée ou terminale présente dans ces cas. Comme nous avons pu le lire dans la littérature, le NT-proBNP s'élimine uniquement par voie rénale contrairement au BNP qui est éliminé activement par deux mécanismes principaux : la fixation sur des récepteurs spécifiques et la dégradation par une endopeptidase neutre associée aux membranes cellulaires. Pour les patients chez qui nous observons une augmentation de BNP et du NT-proBNP nous remarquons que le taux de BNP est toujours plus bas que le taux du NT-proBNP. Nous observons parfois des différences pouvant aller jusqu'à un facteur 10, ce que nous expliquerions également par la différence de voie d'élimination.

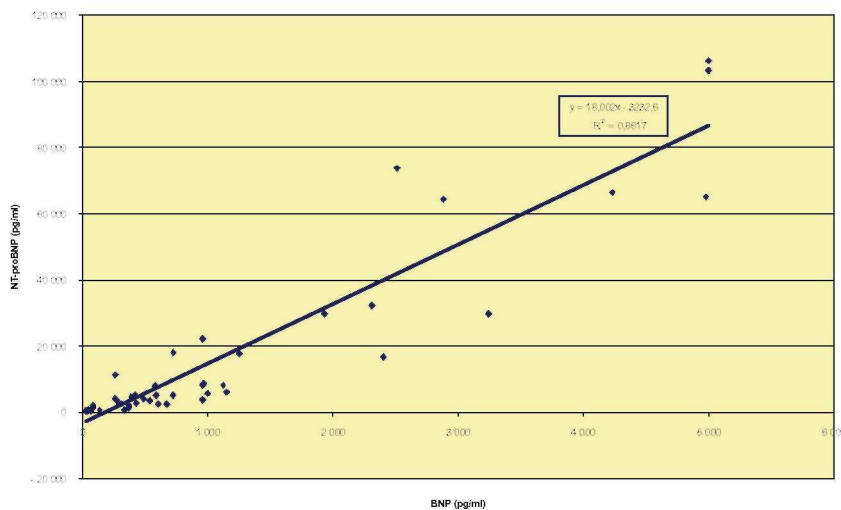
Sur la totalité de nos patients, 10 % sont dyspnéiques avec des taux de BNP et de NT-proBNP supérieures à la valeur seuil. Parmi ceux-ci, notons un cas de dyspnée chez une patiente présentant une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique mais avec une bonne fonction d'éjection (mesurée à 72 %). Ces taux de BNP et de NT-proBNP sont, respectivement, de 710 pg/ml et 4 516 pg/ml. Vu la valeur du BNP et du NT-proBNP la clinique correspondante devrait être une insuffisance cardiaque, or ici, nous sommes parmi une dyspnée d'origine pulmonaire stricte.

Du point de vue de l'âge, le BNP et le NT-proBNP augmentent de façon progressive du fait du vieillissement « physiologique », de l'augmentation de l'incidence de l'IC et des autres pathologies comme l'hypertension artérielle, l'insuffisance rénale et l'insuffisance respiratoire. Nous constatons aussi que les taux de BNP et du NT-proBNP sont un peu plus élevés chez les femmes que chez l'homme.

Il faut aussi noter que dans les cas d'hypertrophie ventriculaire, de cardiomyopathie, de fibrillation auriculaire, d'infarctus et de syndrome coronarien aigu, les taux des deux peptides sont élevés. Les valeurs de BNP et de NT-proBNP doivent être interpréter dans le contexte clinique de chaque patient afin d'éviter des erreurs de diagnostic.

Nous concluons en notant que BNP et NT-proBNP sont corrélés que les patients soient insuffisant rénaux ou non. On remarque cependant une plus grande augmentation des taux avec le NT-proBNP chez les insuffisants rénaux. Les deux marqueurs sont utiles dans les diagnostics d'insuffisance cardiaque chez les nsuffisants rénaux. Néanmoins, chez ces patients, les limites de décisions devraient être revue de façon à augmenter la valeur prédictive positive de ces deux marqueurs.

**Figure 2** : Corrélation NT-proBNP et BNP pour des patients CRF (n = 55).



## Références.

- 1 Maisel AM, 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: 161-167
- 2 McCullough PA, Nowak RM, McCord J, et Al. B-type Natriuretic Peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of failure: analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Circulation* 2002; 106: 416-422
- 3 Graine H, Lefèvre G. Contexte médico-économique de l'utilisation des facteurs natriurétiques. *Spectra Biologie* 2005; 148: 35-38(14)
- 4 Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl Med* 1998; 339: 321-328
- 5 Yeo KT J, Wu A HB, Apple FS. Multicenter evaluation of the Roche Nt-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay. *Clinica Chimica Acta* 2003; 338: 107-115
- 6 McCullough PA, Sandberg KR. B-type natriuretic peptide and renal disease. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 355-358

- 7 Wu AH, Smith A, Wieczorek S, Mather JF et AI. Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implication for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 628-631
- 8 Cowie MR, Jourdain P, Maisel A. Clinical applications of B-type natriuretic peptide (BNP) testing. *Eur Heart J* 2003; 24: 1710-1718
- 9 Shimizu H, Aono K, Masuta K, et AI. Stability of brain natriuretic peptide BNP in human blood samples. *Clin Chim Acta* 1999; 285: 169-172
- 10 Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, et AI. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet* 1997; 350: 1349-1353
- 11 Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, et AI. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol* 2001 ; 37: 379-385
- 12 Bruwnesh A. N-terminal proBNP : a novel approach for the management of heart failure. *Roche Diagnosis* 2002, Sweden