

Valutazione delle caratteristiche analitiche di un nuovo metodo di dosaggio del BNP

Silvia Masotti^{1,2}, Maria Franzini^{1,2}, Concetta Prontera¹, Simona Storti¹, Alessandro Vannucci¹, Elena Giannelli¹, Maristella Maltinti¹, Gian Carlo Zucchelli³, Claudio Passino^{1,2}, Michele Emdin¹, Aldo Clerico^{1,2}.

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio della Fondazione Toscana "G. Monasterio", Pisa

²Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

³QualiMedLab srl, Pisa

RIASSUNTO

Recenti studi hanno dimostrato che sussistono tuttora marcate differenze nelle prestazioni analitiche e nei valori misurati tra i metodi di dosaggio del BNP. Il principale scopo del presente studio è quello di valutare le caratteristiche analitiche ed i risultati ottenuti misurando il BNP con un nuovo metodo che utilizza la piattaforma AIA 2000 Tosoh Bioscience in campioni di plasma di soggetti normali e di pazienti con malattie cardiovascolari. Il nuovo metodo per la misura del BNP valutato in questo lavoro, denominato ST AIA-PACK BNP (Tosoh Corporation Tokio, Japan), è un test immunoenzimatico di tipo sandwich a due siti. Il metodo utilizza, una combinazione di due anticorpi monoclonali e una rilevazione di tipo fluorescente. Il limite del bianco (LoB) e di rivelazione (LoD) del metodo AIA per il BNP sono stati determinati in accordo con il protocollo CLSI EPI17-A; i valori di LoB e LoD sono risultati rispettivamente 2,6 ng/L e 5,4 ng/L. La riproducibilità del metodo è stata valutata in accordo con il protocollo CLSI EP5-A2 misurando 3 campioni di plasma in EDTA con concentrazione di BNP di 8,70 ng/L, 21,72 ng/L e 38,72 ng/L, ottenendo CV che variavano rispettivamente dal 19,4% al 5,0%. Il profilo di imprecisione tra saggi ($n=30$) è stato calcolato prendendo in considerazione i valori di 9 campioni di plasma in EDTA con concentrazioni di BNP da 5 ng/L a 778 ng/L, raccolti da individui sani e pazienti con scompenso cardiaco. Il limite di quantificazione (LoQ) calcolato con questo profilo di imprecisione a livello del CV di 20% e 10% è risultato corrispondere, rispettivamente, a valori di BNP di 9 e 30 ng/L. Sono stati analizzati 133 campioni di plasma in EDTA di soggetti sani e pazienti con malattie cardiache riscontrando un'ottima correlazione tra i risultati ottenuti con il metodo AIA Tosoh e quello TRIAGE Beckman Coulter per il BNP. Tuttavia, il metodo AIA presenta un bias negativo (sottostima) medio di $-40,0\% \pm 8,8\%$ (media \pm ds, $p < 0,0001$) rispetto al metodo TRIAGE. Inoltre, tra i valori dei peptidi BNP e NT-proBNP, misurati rispettivamente con i metodi AIA Tosoh e ECLIA (Roche Diagnostics) è stata trovata una correlazione significativa, anche se inferiore a quella presente tra i due metodi di misura del BNP. Il nuovo metodo per la piattaforma AIA (Tosoh Bioscience) presenta riproducibilità e sensibilità analitica in linea con i più diffusi metodi automatizzati, reperibili in commercio per il dosaggio del BNP. In particolare il cut-off, attualmente raccomandato dalle linee guida internazionali per i metodi di dosaggio del BNP (100 ng/L) risulta misurabile con una imprecisione inferiore al 5%. Da un punto di vista strettamente clinico, questi dati dovrebbero suggerire prudenza ai clinici nel confrontare tra loro i risultati di dosaggi provenienti da laboratori diversi, che potrebbero utilizzare differenti metodi per la misura del BNP.

Parole Chiave: BNP; NT-proBNP; Peptidi natriuretici; Metodi immunometrici; Controllo di Qualità

ABSTRACT

Evaluation of the analytical characteristics of a new method for determination of BNP.

Recent studies demonstrated that there are marked differences in analytical performances and results obtained with different methods for BNP assay. The aim of this study is to evaluate the analytic performance and results obtained with a novel BNP assay using the platform AIA 2000 Tosoh Bioscience. The novel method for BNP tested in the present study, named ST AIA-PACK BNP, is a two-site immunoenzymometric assay. The BNP assay uses a combination of two monoclonal antibodies and a fluorescent detection. The limits of blank (LoB) and detection (LoD) for BNP assay were determined according to the CLSI EP17-A protocol. As a result, the calculated LoB and LoD values were 2.6 ng/L and 5.4 ng/L, respectively. The assay reproducibility was evaluated in accordance with the CLSI EP5-A2 protocol by repeatedly measuring 3 different EDTA plasma samples for consecutive 20 working days, containing on average 8.70 ng/L, 21.72 ng/L, and 38.72 ng/L of BNP, respectively; CV values between 19.4% and 5.0% were obtained. The between-runs imprecision profile was performed by repeatedly measuring in 20 different runs 9 EDTA blood sample, with concentration from 5 ng/L to 778 ng/L, collected from healthy subjects and patients with cardiac disease. The calculated limits of quantitation (LoQ) at 20% CV and 10% CV were 9 and 30 ng/L of BNP, respectively. The results obtained with the new BNP Tosoh method was compared with those found with the TRIAGE Beckman-Coulter. A very close linear regression was found when the BNP values were measured with Tosoh and Beckman-Coulter methods in 133 EDTA plasma samples of healthy subjects and cardiac patients. However the Tosoh method showed on average a significant negative bias (i.e., underestimation) of BNP values compared to Beckman-Coulter of $-40.0\% \pm 8.8\%$ (mean \pm SD, $p < 0.0001$). A significant correlation was also found between the BNP and NT-proBNP values, respectively measured with AIA Tosoh and ECLIA Roche methods, although weaker than that obtained comparing the two BNP assays. These data suggest that the ST AIA-PACK BNP assay has reproducibility and analytic sensitivity similar to the common automated methods commercially available at present time. In particular, the AIA method measures the

recommended cut-off (i.e., 100 ng/L) by international guidelines with an imprecision less than 5%. These data also suggest that clinicians should be careful when comparing results from different laboratories, which use different BNP assays.

Key-words: BNP; NT-proBNP; Natriuretics peptides; Immunometric assays; Quality control

INTRODUZIONE

Il *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) fa parte della famiglia dei peptidi natriuretici cardiaci che costituiscono una complessa famiglia di ormoni peptidici prodotti e secreti dai cardiomiociti che compongono il tessuto miocardico¹⁻³. Il BNP è prodotto mediante il taglio enzimatico di un peptide più grande (pro-BNP) che dà origine ad una porzione COOH-terminale che è il peptide biologicamente attivo (cioè l'ormone BNP) e una parte N-terminale che costituisce il peptide inattivo NT-proBNP¹⁻³.

Il BNP (come anche il peptide NT-proBNP) è attualmente considerato un valido marcatore di funzione miocardica¹⁻⁴. Recenti linee guida internazionali raccomandano il dosaggio del BNP per la diagnosi, la stratificazione del rischio ed il monitoraggio dei pazienti con scompenso cardiaco acuto o cronico⁴⁻⁸.

Recentemente lo studio CardioOrmoCheck, basato sui risultati di un programma di valutazione esterna di qualità a cui hanno partecipato più di 100 laboratori italiani, ha dimostrato che sussistono tuttora marcate differenze nelle prestazioni analitiche e nei valori misurati tra i metodi di dosaggio del BNP^{9,10}. In particolare, questo studio ha dimostrato che esiste una differenza sistematica in media di più di due volte tra il metodo TRIAGE (Beckman Coulter, Cassina de Pecchi, MI) ed il metodo ADVIA Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Tarrytown, NY, USA) che sono i due più diffusi metodi di dosaggio del BNP in Italia^{9,10}. Tali differenze sistematiche sono dovute in gran parte ai differenti anticorpi utilizzati nei metodi immunometrici per il dosaggio del BNP.

È stato recentemente introdotto nel mercato un nuovo metodo di dosaggio del BNP (ST AIA-PACK BNP) che utilizza la piattaforma AIA (Tosoh Bioscience, Torino) Il principale scopo del presente studio è quello di valutare le caratteristiche analitiche ed i risultati ottenuti misurando il BNP in campioni di plasma di soggetti normali e di pazienti con malattie cardiovascolari. Inoltre, un altro scopo dello studio è confrontare questi risultati con quelli forniti dal metodo più diffusi in Europa e negli USA rispettivamente per il dosaggio del BNP e NT-proBNP, cioè il metodo di dosaggio BNP TRIAGE Biosite Beckman Coulter ed il metodo ECLIA di dosaggio del peptide NT-proBNP (Roche Diagnostics, Monza, MB)

MATERIALI E METODI

Metodi analitici

Il nuovo metodo per la misura del BNP valutato in questo lavoro, denominato ST AIA-PACK BNP (Tosoh Corporation, Tokio, Japan), è un test immunoenzimatico di tipo *sandwich* a due siti. Il metodo utilizza, una combinazione di due anticorpi monoclonali e una rilevazione di tipo fluorescente. La misura del BNP è stata eseguita usando

la piattaforma AIA-2000 in accordo con le raccomandazioni fornite dalla ditta.

Il BNP presente nel campione si lega all'anticorpo di cattura immobilizzato su sferette magnetiche e quindi ad un secondo anticorpo marcato con un enzima, anch'esso presente nella coppetta di reazione. In ogni coppetta di reazione sono presenti anche sferette magnetiche liofilizzate, alle quali è legato l'anticorpo monoclonale murino anti-BNP e un secondo anticorpo monoclonale murino anti-BNP coniugato con fosfatasi alcalina bovina. Le sferette magnetiche sono lavate per rimuovere gli anticorpi monoclonali marcati non legati e quindi incubate con il substrato fluorogenico, 4-metil-umbelliferil-fosfato. La quantità di anticorpo marcato che si lega alle sferette risulta direttamente proporzionale alla concentrazione del BNP presente nel campione. In base alla curva di calibrazione si calcola la concentrazione della BNP presente nel campione in esame.

I kit utilizzati in questo studio sono stati gentilmente forniti da Tosoh Europe N.V. (Tessenderlo, Belgium); per lo studio sono stati utilizzati due diversi lotti di reagenti (C31C201, C41C203) e di calibratori.

La concentrazione plasmatica del peptide NT-proBNP è stata misurata usando il metodo ECLIA eseguito sulla piattaforma automatizzata Cobas e411 (proBNP II, code 04842464 190, Roche Diagnostics, Monza, MB) seguendo le istruzioni del fornitore. Questo metodo di nuova generazione utilizza anticorpi monoclonali invece di quelli policlonali della precedente generazione. Le caratteristiche analitiche di questo nuovo metodo sono state recentemente valutate nel nostro laboratorio¹¹.

Inoltre, la concentrazione plasmatica del BNP è stata misurata con il metodo TRIAGE Biosite Beckman Coulter, utilizzando la piattaforma automatizzata UniCell DxI 800, secondo le istruzioni del fornitore (Beckman Coulter, Cassina de Pecchi, MI). Le caratteristiche analitiche di questo metodo sono state valutate precedentemente nel nostro laboratorio¹².

Campioni

Il prelievo di sangue è stato eseguito tra le 8 e le 9, su pazienti in posizione supina, a riposo per almeno 20 minuti e dopo una notte di digiuno. I campioni di sangue (8–10 mL) sono stati raccolti in tubi di polipropilene, contenenti aprotinina (500 kIU/mL di plasma) ed EDTA (1 mg/mL di plasma) e posti in bagno di ghiaccio. Subito dopo il prelievo, i campioni sono stati rapidamente centrifugati a 3000xg per 15 min a 4°C ed il plasma è stato analizzato con lo strumento AIA-2000. Se non è stato possibile eseguire la misura entro un'ora dal prelievo, il campione di plasma è stato conservato, aliquotato in provette di polipropilene, a -20°C fino al momento della misura.

I pazienti con malattie cardiache sono stati arruolati

presso l'unità di medicina cardiovascolare della Fondazione Toscana "G. Monasterio" (Pisa). Nei soggetti definiti sani, la presenza di patologie cardiache o sistemiche, acute o croniche, è stata esclusa tramite valutazione della storia clinica, esami accurati, ECG, *imaging* e test di laboratorio. Tutti i soggetti sani arruolati hanno negato il consumo di farmaci nelle due settimane precedenti al prelievo ed hanno fornito il loro consenso informato per partecipare allo studio.

Analisi Statistica

Le analisi statistiche standard sono state eseguite su Macintosh Dual 2.3 GHz PowerPC G5 con il programma Stat-View 5.0.1 (1992-98, SAS Institute Inc., SSA Campus Drive, Cary, NC, USA). I test parametrici sono state effettuate su dati trasformati logaritmici, perché i valori dei peptidi BNP e NT-proBNP non presentano una distribuzione normale, ma approssimativamente una distribuzione logaritmica normale. In alternativa, sono stati usati test non parametrici.

RISULTATI

Valutazione della sensibilità e riproducibilità analitica

Il limite del bianco (LoB) e di rivelazione (LoD) del metodo ST AIA-PACK BNP sono stati determinati in accordo con il protocollo CLSI EPI17-A¹³. Il calibratore 1 del metodo testato, che non contiene BNP (bianco del metodo), è stato misurato 60 volte in tre differenti sedute analitiche utilizzando due lotti differenti di reagenti. È stato quindi calcolato il CV% del segnale fluorescente (espresso come RLU), che ha mostrato un valore medio di 0,879 RLU ed una deviazione standard (DS) di 0,127 RLU, corrispondenti ad un errore del 14,5%. Il valore di fluorescenza, rappresentato dalla somma tra il valore medio delle misurazioni replicate del calibratore 1 e la DS delle stesse moltiplicata per 1,645 è stato interpolato sulla curva di calibrazione, ottenendo la concentrazione di BNP che corrisponde al valore della LoB. Analogamente il LoD è stato calcolato secondo la formula: $LoD = LoB + 1.645 \times DS$, ove la DS è stata calcolata sulla misura, replicata in 30 determinazioni differenti e con un CV del 12,2%, di un pool di plasma con una bassa concentrazione di BNP. I valori di LoB e LoD, così calcolati, sono risultati rispettivamente di 2,6 ng/L e 5,4 ng/L.

La riproducibilità del metodo è stata valutata in accordo con il protocollo CLSI EP5-A²¹⁴, misurando per 20 giornate lavorative consecutive 3 campioni di plasma in EDTA con concentrazioni di BNP di 8,70 ng/L (campione A); 21,72 ng/L (campione B) e 38,72 ng/L (campione C), rispettivamente. I risultati sono riportati in tabella 1.

Il profilo di imprecisione tra saggi (n=30) è stato calcolato prendendo in considerazione i valori di 9 campioni di plasma in EDTA con concentrazioni di BNP da 5 ng/L a 778 ng/L, raccolti da individui sani e pazienti con scompenso cardiaco e misurando tali campioni, con due lotti differenti di reagenti durante 30 giorni lavorativi consecutivi (Fig. 1). Il limite di quantificazione (LoQ) a livello del CV di 20% e 10% è risultato corrispondere ad una concentrazione di BNP di 9 e 30 ng/L, rispettivamente (Fig. 1).

Confronto tra i metodi di BNP e NT-proBNP

I risultati ottenuti con il nuovo metodo per la misura del BNP con il sistema AIA 2000 sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo TRIAGE Beckman Coulter (Fig. 2 e 3) e con il metodo ECLIA Roche Diagnostics per la misura del peptide NT-proBNP (Fig. 4).

A tale scopo sono stati analizzati 133 campioni di plasma in EDTA relativi a soggetti sani e pazienti con malattie cardiache riscontrando un'ottima correlazione tra i risultati ottenuti con il metodo AIA Tosoh e quello TRIAGE Beckman Coulter per il BNP (Fig. 2). Tuttavia, il metodo Tosoh presenta un *bias* negativo (sottostima) medio di $-40,0\% \pm 8,8\%$ (media \pm DS; $p < 0,0001$) rispetto al metodo TRIAGE Beckman-Coulter (Fig. 3). Inoltre, non vi è stata trovata una correlazione significativa tra la differenza percentuale e la concentrazione del BNP misurata ($R=0,009$; $p=0,9178$), mentre vi è una stretta correlazione tra la differenza assoluta dei valori misurati tra i due metodi e la con-

Tabella 1

Valutazione della riproducibilità del metodo AIA-Pack per il BNP (Tosoh Bioscience) secondo il protocollo CLSI EP5-A²¹⁴.

Campione	N	Concentrazione media BNP (ng/L)	CV nel saggio (%)	CV Totale (%)
A	20	8.70	11.25	19.36
B	20	21.72	4.27	9.27
C	20	38.72	2.56	4.95

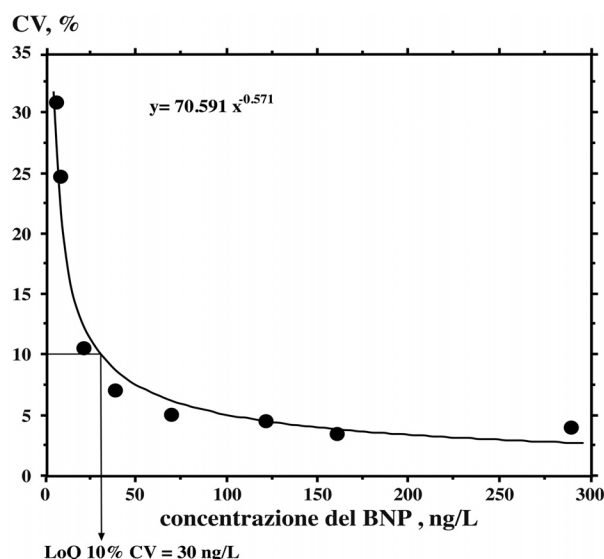


Figura 1

Profilo di imprecisione per il metodo AIA-Pack per la misura del BNP. Il profilo di imprecisione tra saggi è stato ottenuto, misurando per 30 giorni lavorativi consecutivi ed utilizzando due diversi lotti di reagenti e calibratori, 9 campioni di plasma in EDTA raccolti da soggetti sani e pazienti cardiopatici con concentrazioni di BNP da 5 a 778 ng/L. Il limite di quantificazione (LoQ) è stato rispettivamente calcolato per i valori di CV del 10% e del 20% dall'equazione riportata nella figura ottenuta mediante l'analisi di regressione di potenza. In figura è stato riportato solo l'intervallo di concentrazione di BNP tra 5 e 288 ng/L per meglio visualizzare la concentrazione del peptide corrispondente ad un errore del 10% di CV, che è risultata essere di 30 ng/L.

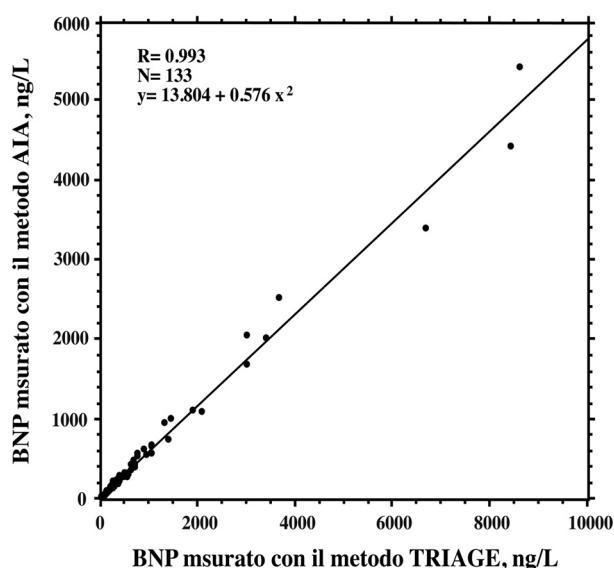


Figura 2
 Analisi di regressione lineare tra i valori di concentrazione del BNP misurata sia con il metodo AIA-Pack Tosoh Bioscience (asse Y), sia con il metodo TRIAGE Beckman Coulter con la piattaforma automatizzata UniCell DxI 800 (asse X). A questo scopo sono stati analizzati 133 campioni di plasma in EDTA raccolti da soggetti sani e pazienti cardiopatici.

centrazione misura del BNP ($R=0,987$; $p<0,0001$). Questi dati indicano che, mentre la differenza assoluta tra i valori di BNP misurati con i due metodi aumenta con la concentrazione, la differenza percentuale è praticamente costante ad ogni valore di BNP misurato. Quindi, è possibile stimare il bias ad ogni concentrazione misurata del BNP con questi due metodi utilizzando la differenza percentuale media (Fig. 4).

Tra i valori dei peptidi BNP e NT-proBNP, misurati rispettivamente con i metodi AIA Tosoh (asse Y) e ECLIA Roche (asse X) è stata trovata una correlazione significativa (Fig. 4), comunque inferiore a quella presente tra i due metodi di misura del BNP (Fig. 2).

DISCUSSIONE

I valori di BNP, ottenuti con il nuovo metodo di dosaggio del BNP sulla piattaforma AIA 2000, presentano una ottima correlazione con quelli osservati nel nostro laboratorio con il metodo TRIAGE sulla piattaforma UniCell DxI 800, che è attualmente il metodo più diffuso in Italia per il dosaggio del BNP^{9,10} (Fig. 2). Tuttavia, i nostri dati dimostrano anche una marcata differenza sistematica, mediamente di quasi due volte, tra questi due metodi di dosaggio del BNP (Figg. 2 e 3). Questi dati sono in pieno accordo con quelli ottenuti recentemente dallo studio CardioOrmoCheck, che è un programma di controllo di qualità esterno a cui partecipano ogni anno più di 100 laboratori italiani. Tali differenze nelle misure ottenute sono di fatto dovute all'utilizzo di anticorpi e materiali di calibrazione che presentano caratteristiche differenti tra i diversi metodi commerciali per il dosaggio del BNP^{9,10,15,16}.

Il nuovo metodo per la piattaforma AIA della ditta Tosoh Bioscience presenta riproducibilità e sensibilità analitica in

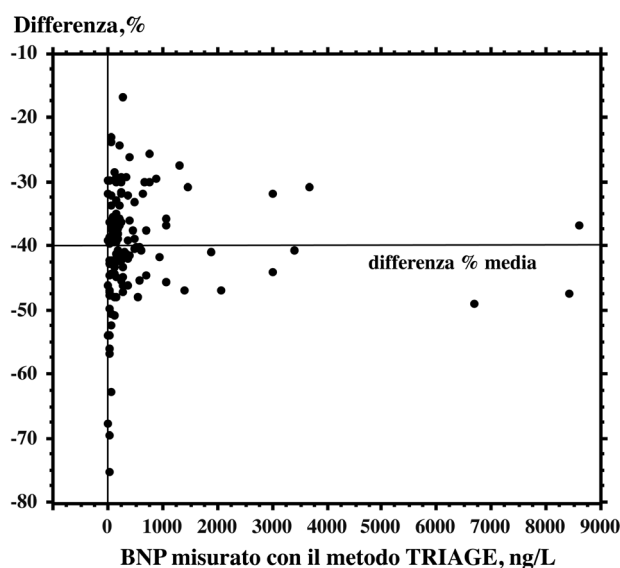


Figura 3
 Relazione tra i valori di differenza percentuale (asse delle Y) tra i metodi AIA Tosoh Bioscience e TRIAGE Beckman-Coulter $[(AIA - TRIAGE)/TRIAGE \times 100]$ e la concentrazione di BNP misurata con il metodo TRIAGE (asse delle X) per gli stessi campioni plasmatici della figura 2. La differenza percentuale media è indicata nelle figura con una retta. Non esiste una correlazione significativa tra i due parametri, differenza percentuale e concentrazione del BNP ($R=0,009$; $p=0,9178$).

linea con i più diffusi metodi automatizzati, reperibili in commercio per il dosaggio del BNP^{9,10,15,17,18}. In particolare il cut-off, attualmente raccomandato dalle linee guida internazionali per i metodi di dosaggio del BNP (100 ng/L)^{5,7} risulta misurabile con una imprecisione inferiore al 5% (Fig. 1 e Tab. 1).

Da un punto di vista strettamente clinico, questi dati dovrebbero suggerire prudenza ai clinici nel confrontare tra loro i risultati di dosaggi provenienti da laboratori diversi, che potrebbero utilizzare differenti metodi per la misura del BNP. Inoltre, questi risultati indicano come non sia ragionevole continuare a suggerire da parte delle società internazionali nelle loro linee guida un valore identico (cioè 100 ng/L) per tutti i metodi di dosaggio del BNP^{5,7}, quando alcuni metodi, assai diffusi, come il metodo AIA analizzato nel presente studio ed il metodo ADVIA Centaur, presentano concentrazioni dell'ormone misurate con una sottostima di circa il 40-50% rispetto al metodo più diffuso^{9,10}.

BIBLIOGRAFIA

1. Clerico A. Pathophysiological and clinical relevance of circulating levels of cardiac natriuretic hormones: Are they merely markers of cardiac disease? *Clin Chem Lab Med* 2002;40:752-60
2. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, et al. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H12-20
3. Clerico A, Vittorini S, Passino C. Measurement of the pro-hormone of brain type natriuretic peptide (proBNP): methodological considerations and pathophysiological relevance. *Clin Chem Lab Med* 2011;4:1949-54

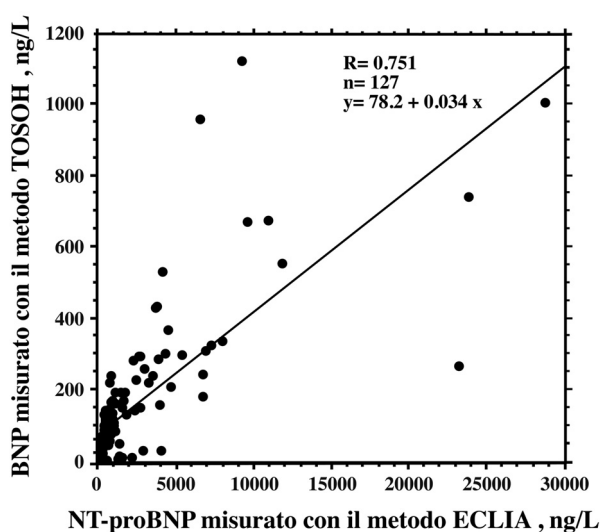


Figura 4

Analisi di regressione lineare tra i valori di concentrazione del BNP, misurata con il metodo AIA-Pack Tosoh Bioscience (asse Y), e del peptide NT-proBNP, determinata con il metodo ECLIA-Roche (asse X). A questo scopo sono stati analizzati 127 campioni di plasma in EDTA raccolti da soggetti sani e pazienti cardiopatici

4. **Tang WH, Francis GS, Morrow DA, et al.** National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practiceNICE guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation* 2007;116:e99-109
5. **Dickestein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al.** The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur J Heart Fail* 2008;10:993-89
6. **Jessup M, Abraham WT, Casey DE, et al.** 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;119:1977-2016
7. NICE, clinical guideline no 108. Chronic heart failure. National clinical guideline for diagnosis and management in primary and secondary care. August 2010, pag.1-222
8. **Clerico A, Fontana M, Zyw L, et al.** Comparison of the Diagnostic Accuracy of Brain Natriuretic Peptide

(BNP) and the N-Terminal Part of the Propeptide of BNP Immunoassays in Chronic and Acute Heart Failure: A Systematic Review. *Clin Chem* 2007;53:813-22

9. **Prontera C, Zaninotto M, Giovannini S, et al.** Proficiency testing project for brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the propeptide of BNP (NT-proBNP) immunoassays: the CardioOrmoCheck study. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:762-8
10. **Clerico A, Zaninotto M, Prontera C, et al.** State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: The CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta* 2012;414:112-9
11. **Prontera C, Zucchelli CG, Vittorini S, et al.** Comparison between analytical performances of polyclonal and monoclonal electrochemiluminescence immunoassays for NT-proBNP. *Clin Chim Acta* 2009;400:70-3
12. **Prontera C, Storti S, Emdin M, et al.** Comparison of a fully automated immunoassay with a point-of-care testing method for B-type natriuretic peptide. *Clin Chem* 2005;51:1274-6
13. CLSI EP17-A protocol. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guidelines. 2004, Vol.24, No.34. Wayne, Pennsylvania
14. CLSI EP5-A2 protocol. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline-Second edition. 2004, Vol.24, No.25. Wayne, Pennsylvania
15. **Clerico A, Prontera C, Emdin M, et al.** Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of plasma BNP and NT-proBNP concentrations. *Clin Chem* 2005;51:445-7
16. **Luckenbill KN, Christenson RH, Jaffe AS, et al.** Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem* 2008;54:619-21
17. **Rawlins ML, Owen WE, Roberts WL.** Performance characteristics of four automated natriuretic peptide assays. *Am J Clin Pathol* 2005;123:439-45
18. **Vittorini S, Prontera T, Zucchelli GC, et al.** Cardiac natriuretic hormones: methodological aspects. *Immuno-Analyse Biol Spec* 2007;22:209-72

Per corrispondenza:

Prof. Aldo Clerico
 Dipartimento di Medicina di Laboratorio,
 Fondazione Regione Toscana "G. Monasterio",
 Via Moruzzi 1, 56126 Pisa
 Tel.: 0585-493569 - Fax: 0585-493601
 e-mail: clerico@ftgm.it