

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 359**

51 Int. Cl.:

G16H 50/20 (2008.01)

G16H 50/30 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014** **E 14183679 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2846285**

54 Título: **Estratificación del riesgo de pacientes sospechosos de IAM**

30 Prioridad:

06.09.2013 GB 201315943

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.11.2019

73 Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
55 Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB

72 Inventor/es:

MCENEANEY, DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 359 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estratificación del riesgo de pacientes sospechosos de IAM

Antecedentes

5 La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en el mundo desarrollado, y casi el 50% de todas las muertes cardiovasculares se debe a una enfermedad arterial coronaria. Esto supone una importante carga económica para el Espacio Económico Europeo. Se ha estimado que las enfermedades cardiovasculares cuestan al Espacio Económico Europeo 169 mil millones de euros al año. El diagnóstico de la enfermedad arterial coronaria aún presenta un desafío para el médico, incluso con las ayudas diagnósticas actualmente disponibles. Los estudios han demostrado que entre el 2 y el 5% de los pacientes con infarto de miocardio (IM) son dados de alta en los servicios de accidentes y urgencias con falta de diagnóstico (Storrow y Gibler, 2000), con tasas tan altas como el 11,1% en algunos casos (Papa *et al.*, 2000).

15 La ayuda diagnóstica más sencilla y económica es el electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones. Los cambios que pueden indicar isquemia o infarto incluyen elevación o depresión del segmento ST, bloqueo de rama izquierda (LBBB), cambios en la onda T y, finalmente, ondas Q patológicas. El ECG inicial, sin embargo, solo produce una sensibilidad de entre el 13 y el 70% para un diagnóstico de IM (Speake y Terry, 2001). El uso del ECG de mapeo de superficie de múltiples derivaciones aumenta la sensibilidad de manera modesta, pero aún sin suficiente valor predictivo negativo para descartar un infarto (Owens *et al.*, 2004; McClelland *et al.*, 2003).

20 Más recientemente, se han evaluado técnicas avanzadas de imagenología en cuanto a su papel en el diagnóstico y la estratificación del riesgo de SCA. La evaluación en el servicio de urgencias con los nuevos protocolos de resonancia magnética cardíaca ponderada en T2 (CMR) puede mejorar la detección de síndromes coronarios agudos, pero, hasta el momento, no puede distinguir de manera fiable el IM evolutivo de la angina sin infarto (Cury *et al.*, 2008). El CMR del servicio de urgencias tampoco está ampliamente disponible, y está contraindicado en algunos pacientes debido a los implantes de metales ferrosos, lo que hace actualmente que esta sea una solución poco práctica para el diagnóstico de SCA.

25 Con referencia a la definición universal de infarto de miocardio, está claro que los ensayos de biomarcadores también son fundamentales ahora para el diagnóstico (Thygesen *et al.*, 2012). La medición de troponina cardíaca actualmente (4ª generación de troponina T cardíaca y la troponina cardíaca I) sigue siendo el ensayo de biomarcadores estándar de oro de la necrosis miocárdica. Los ensayos tienen una especificidad de tejido cercana al 100% y una alta sensibilidad clínica, lo que refleja incluso pequeñas áreas de infarto. Se ha aceptado que los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) con CK-MB normal (el estándar de oro anterior) pueden tener una elevación de troponina que refleje una necrosis miocárdica mínima y, por lo tanto, se clasifican como que han sufrido un infarto de miocardio. Además, la troponina elevada o CK-MB predice futuros eventos cardiovasculares, subrayando el papel de los biomarcadores de la necrosis en el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, el tiempo de muestreo es importante. La cinética de liberación de la troponina después de una lesión miocárdica y su posterior necrosis la convierten en un marcador precoz desfavorable del síndrome coronario agudo, con una sensibilidad máxima alcanzada después de al menos 6 horas. Convencionalmente en el Reino Unido, una muestra de dolor post-torácico de 12 horas se considera aceptable. El desarrollo de ensayos de troponina (hsTn) altamente sensibles ha mejorado la precisión diagnóstica de las mediciones de troponina en la presentación en comparación con los ensayos de troponina estándar (Reichlin *et al.*, 2009). Sin embargo, esta sensibilidad mejorada se combina con una reducción significativa en la especificidad en comparación con los ensayos de troponina estándar, lo que lleva a un mayor número de resultados falsos positivos.

45 Dado que una proporción significativa de pacientes se presentará antes de las 6 horas posteriores a la aparición de los síntomas, ha habido un gran interés en la investigación de los biomarcadores tempranos de la necrosis miocárdica. La proteína de unión a los ácidos grasos del corazón (H-FABP) se ha investigado prospectivamente a este respecto. H-FABP es una proteína pequeña (14-15 kDa) y, como tal, se libera de los miocitos cardíacos mucho más rápido que la troponina. Los niveles detectables se producen de 2 a 3 horas después de la lesión miocárdica y vuelven a la línea de base en el plazo de 12 a 24 horas. En combinación con los análisis de troponina de cuarta generación, se ha demostrado que los niveles de H-FABP mejoran el diagnóstico de síndrome coronario agudo (McCann *et al.*, 2008) y predicen el pronóstico independientemente de la troponina (Killkullen *et al.*, 2007).

50 Sigue habiendo una necesidad clínica de una estrategia para permitir un mejor diagnóstico rápido y la estratificación del riesgo cuando un paciente presenta dolor en el pecho. Un diagnóstico y estratificación de riesgo rápidos y precisos significaría que los pacientes de alto riesgo pueden asignarse a la vía de tratamiento adecuada y los pacientes de bajo riesgo pueden estar seguros de que no han sufrido un IAM y se pueden investigar las causas alternativas de dolor en el pecho. La estrategia actual requiere con frecuencia un monitoreo continuo durante un período de hasta 12 horas desde el ingreso, junto con una muestra de sangre en serie. Este retraso en la confirmación del diagnóstico de IAM no solo aumenta el riesgo de complicaciones, sino que también contribuye a la masificación y a los costes relacionados en el servicio de urgencias. Como se describe en esta memoria, la presente invención permite un método para mejorar el diagnóstico temprano y la estratificación del riesgo de IAM en pacientes que presentan dolor en el pecho.

Referencias

Bathia et al. (2009) *Annals of Clinical Biochemistry*; 46 (6): 464-467.

Cury et al. (2008) *Circulation*; 118 (8): 837-844.

Kilcullen, N, et al. (2007) *Journal of the American College of Cardiology*; 50: 2061-2067.

5 McCann, C, et al. (2008) *European Heart Journal*; 29: 2843-2850.

McClelland et al. (2003) *The American Journal of Cardiology*; 92 (3): 252-257.

Owens et al. (2004) *Journal of Electrocardiology*; 37: 223-232.

Pope et al. (2000) *The New England Journal of Medicine*; 342: 1163-1170.

Reichlin et al. (2009) *The New England Journal of Medicine*; 361 (9): 858-867.

10 Speake y Terry (2001) *Emergency Medical Journal*; 18 (1): 61-62.

Storrow and Gibler (2000) *Annals of Emergency Medicine*; 39 (5): 449-461.

Thygesen et al. (2012) *Nature Reviews Cardiology*; 9: 620-633.

Dinh, W. et al (2011) *BMC Cardiovascular Disorders, BIOMED CENTRAL*, 1471-2261,

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: diagrama de flujo de compendio que muestra un ejemplo de cómo se podría utilizar la invención actual en la sala de urgencias.

Compendio de la invención

20 La presente invención demuestra que una combinación de un ECG, un nivel de troponina cardíaca y un nivel de H-FABP en el ingreso pueden usarse para estratificar el riesgo y ayudar en el diagnóstico de pacientes con dolor en el pecho que se cree que es de naturaleza isquémica.

Descripción detallada

25 El síndrome coronario agudo (ACS, por sus siglas en inglés) se refiere a un conjunto de signos y síntomas, generalmente una combinación de dolor en el pecho y otras características que se interpretan como resultado de una disminución repentina del flujo de sangre al corazón (isquemia cardíaca). Los subtipos de SCA incluyen angina inestable (AU, no asociada con daño del músculo cardíaco) y dos formas de infarto de miocardio (sin elevación de ST y ST) en las que el músculo cardíaco está dañado.

30 El infarto agudo de miocardio (IAM o IM), más comúnmente conocido como ataque al corazón, se refiere a una condición médica que ocurre cuando se interrumpe el suministro de sangre a una parte del corazón, más comúnmente debido a la ruptura de una placa vulnerable. La isquemia resultante (escasez de oxígeno) si no se trata durante un período de tiempo suficiente puede causar daños y/o la muerte al tejido del corazón.

35 La presente invención proporciona un método de estratificación de riesgo de un sujeto que presenta dolor en el pecho que se piensa que es de naturaleza isquémica. El método de la presente invención se basa en el resultado de tres factores determinados al ingreso; electrocardiograma, nivel de troponina cardíaca y nivel de H-FABP. Dependiendo de los resultados de estas tres pruebas, el sujeto puede colocarse en una categoría de riesgo adecuada para un IAM que haya ocurrido recientemente y se puede iniciar la ruta de tratamiento adecuada.

40 En donde el ECG, la troponina cardíaca y el H-FABP son todos negativos, el sujeto puede ser colocado en una categoría de bajo riesgo para un IAM que haya ocurrido recientemente y se pueden investigar otras causas de dolor en el pecho. En donde el ECG y la troponina cardíaca son negativos, pero el H-FABP es positivo, el sujeto puede ser colocado en una categoría de riesgo moderado para un IAM que haya ocurrido recientemente y pueden ser programados para una evaluación adicional. En los casos en donde el ECG es negativo, pero tanto la troponina cardíaca como la H-FABP son positivas, el sujeto puede ser colocado en una categoría de alto riesgo para un IAM que haya ocurrido recientemente y puede ser remitido de inmediato a un cardiólogo para tratamiento o intervención. En donde el ECG es positivo por sí solo o en combinación con un resultado positivo para la troponina cardíaca y/o H-FABP, el sujeto también se coloca en una categoría de alto riesgo para un IAM que haya ocurrido recientemente y puede ser referido de inmediato a un cardiólogo para tratamiento o intervención.

45

El término "H-FABP", como se usa en la presente memoria, se refiere a la proteína de unión a ácidos grasos del corazón, también conocida como proteína de unión a ácidos grasos 3 (FABP-3) y sus fragmentos o péptidos parciales, que en los seres humanos están codificados en la *FABP3* gene. La H-FABP está presente en el miocardio y se cree

que se libera rápidamente en la circulación como resultado de una lesión miocárdica. Numerosos estudios han demostrado que es un marcador temprano para la aparición de IM. Los expertos en la técnica entenderán que H-FABP incorpora cualquier polipéptido variante que comparta las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que los péptidos de H-FABP específicos usados en la presente invención.

5 Los términos 'troponina' (Tn) y 'troponina cardíaca' (cTn) como se usan en la presente invención se refieren a todas las isoformas de troponina que se expresan en las células del corazón, preferiblemente se refieren a troponina T cardíaca o troponina I cardíaca y fragmentos o péptidos parciales de los mismos, lo más preferiblemente se refieren a troponina T cardíaca (cTnT).

10 Los términos "nivel de troponina cardíaca" y "nivel de H-FABP" se refieren a la concentración de cTnT y H-FABP respectivamente, preferiblemente su concentración en una muestra de plasma o suero de un sujeto de la presente invención. Los "valores de referencia" o los "niveles de corte" utilizados en la presente invención son niveles aceptables de cTnT y H-FABP que son indicativos de infarto agudo de miocardio. A efectos de la presente invención, cualquier valor menor que estos niveles de referencia puede denominarse prueba "negativa", mientras que cualquier valor mayor que estos niveles de referencia puede denominarse prueba "positiva". Preferiblemente para cTnT el valor de referencia se basa en el percentil 99 de una población de referencia según lo determinado por el fabricante. En la presente invención, el nivel de corte preferido utilizado para cTnT fue de 0,014 ng/ml y cualquier valor de cTnT por debajo de este valor de referencia indicó que no se había producido un IAM reciente. Los expertos en la materia entenderán que el nivel de corte puede variar según el fabricante del kit utilizado para detectar un biomarcador. Por lo tanto, cualquier nivel de corte recomendado en un ensayo de troponina T de alta sensibilidad puede incluirse en el alcance de la presente invención. Mientras que cTnT es la troponina cardíaca preferida de la invención, cualquier troponina cardíaca que podría ser un indicador de daño tisular también puede usarse, como la troponina I cardíaca. En donde la troponina cardíaca es troponina I cardíaca (cTnI), el valor de corte preferido para descartar un infarto de miocardio se basa en el percentil 99 de una población de referencia según lo determinado por el fabricante del ensayo, y un valor cTnI menor que este valor de referencia se considera un resultado negativo e indica que no se ha producido un IAM reciente. Preferiblemente para H-FABP el valor de referencia se basa en el percentil 95 de una población de referencia según lo determinado por el fabricante. A efectos de la presente invención, el valor de referencia para H-FABP fue de 2,5 ng/ml. Cualquier valor H-FABP por debajo de este valor se considera un resultado negativo e indica que no se ha producido un IAM reciente. Los expertos en la materia reconocerán que también podrían usarse valores de corte de H-FABP alternativos recomendados para descartar el infarto agudo de miocardio.

30 En el contexto de la presente invención, la expresión ECG "positivo" o "anormal" se refiere a cualquier lectura de ECG que tenga características o características de ECG que se asocien comúnmente con un infarto agudo de miocardio. Estos pueden incluir, por ejemplo, la elevación del segmento ST o el nuevo inicio del bloqueo de rama izquierda o la depresión del segmento ST o la inversión de la onda T. Un ECG "negativo" o "normal" al que se hace referencia en esta memoria indica una lectura de ECG sin estas características o características enumeradas anteriormente. El ECG es preferiblemente un ECG estándar de 12 derivaciones, pero cualquier variación adecuada conocida por los expertos en la técnica puede usarse para interpretar la actividad eléctrica del corazón. El ECG puede ser un ECG paramédico tomado en ruta al hospital o centro médico o un ECG del servicio de urgencias.

40 El término "descartar" como se usa en esta memoria se refiere a excluir un diagnóstico de infarto de miocardio en un sujeto que presenta dolor en el pecho. Cualquier paciente en quien IAM no pueda ser descartado por la combinación de la presente invención puede ser admitido y acelerado para pruebas o tratamientos adicionales, mientras que aquellos descartados pueden ser evaluados por causas alternativas de dolor en el pecho.

45 Un "sujeto" o "paciente" de la presente invención es un animal, más preferiblemente un mamífero, incluso más preferiblemente un ser humano. El sujeto es más preferiblemente alguien que se presenta en un servicio de urgencias con dolor en el pecho, pero puede referirse a cualquier caso de SCA sospechoso, supuesto o posible en donde los síntomas están presentes, pero no se ha establecido un diagnóstico. La muestra de dichos sujetos de la presente invención puede seleccionarse de un fluido corporal, células separadas o muestra de tejido. Más preferiblemente, la muestra es un fluido corporal, incluso más preferiblemente la muestra es suero o plasma. En una realización preferida de la presente invención, las determinaciones in vitro de H-FABP y troponina cardíaca se llevan a cabo mediante inmunoensayo usando cualquier medio conocido en la técnica. En otra realización preferida, el inmunoensayo se incorpora en un dispositivo analizador automatizado.

50 Un aspecto adicional de la presente invención fue el nuevo hallazgo de que las mediciones de H-FABP a las 3 horas posteriores al ingreso se correlacionaron en gran medida con las mediciones de troponina a las 12 horas. Esto podría ser aplicable para pacientes que se presentan inusualmente pronto y tienen resultados negativos para ECG, troponina y H-FABP en el ingreso. En estos pacientes se podría evitar la necesidad de largas esperas en las mediciones de troponina en serie y permitir un diagnóstico más rápido.

55 Si bien la presente invención proporciona un método novedoso para la estratificación del riesgo de los pacientes con dolor en el pecho y puede ayudar a un diagnóstico más rápido y eficaz del infarto agudo de miocardio, se entenderá que la evaluación clínica por parte de los médicos que lo atienden también formará una parte importante del diagnóstico y la iniciación del tratamiento y gestión médicos efectivos y adecuados. Como tal, la presente invención podría incorporarse en algoritmos de riesgo utilizados actualmente tales como trombólisis en infarto de miocardio

(TIMI) o registro global de eventos coronarios agudos (GRACE). Se prevé que, en el futuro, el método de estratificación de riesgo proporcionado por la presente invención pueda realizarse mediante un dispositivo de punto de atención que procese rápidamente los resultados de las mediciones de ECG, H-FABP y troponina cardíaca y ofrezca al médico una salida del riesgo simple y precisa.

5 Métodos

Reclutamiento de pacientes

Los pacientes que acudieron al servicio de accidentes y urgencias del Craigavon Area Hospital, Irlanda del Norte, con dolor en el pecho de presunto origen isquémico, se inscribieron desde octubre de 2009 hasta finales de octubre de 2011. Desde mayo de 2010 hasta junio de 2011, los pacientes que se presentaron en el Daisy Hill Hospital, Newry., Irlanda del Norte también fueron reclutados. En total se reclutaron 609 pacientes. Los pacientes se excluyeron del análisis final por los siguientes motivos: reclutamiento por duplicado, reclutados más de 12 horas después del inicio de los síntomas, retirada del consentimiento, terapia anticoagulante crónica, muestras de suero/plasma inutilizables y sincronización incorrecta de la muestra. Esto resultó en una cohorte general de 548 pacientes, 534 reclutados de Craigavon Area Hospital y 14 de Daisy Hill Hospital, Newry elegibles para el análisis final (figura 1). De estos pacientes, 155 (28,3%) tuvieron un diagnóstico final adjudicado de IM, 86 (15,7%) de SCA y 307 (56,0%) de dolor en el pecho no isquémico. De los pacientes diagnosticados con IM, 70 (45,1%) se clasificaron como STEMI, y los 85 IM (54,8%) restantes se clasificaron como NSTEMI. Los pacientes con un diagnóstico final de IM tenían más probabilidades de ser mayores, hombres, tener una mayor presión arterial sistólica (PA) y ser fumadores actuales. Los pacientes con infarto de miocardio también tuvieron más probabilidades de presentarse más temprano después de la aparición de los síntomas, lo que dio lugar a un inicio más corto de los síntomas al primer momento de extracción de sangre (235 minutos frente a 290 minutos de dolor en el pecho no isquémico frente a 323 minutos ACS, $p < 0,001$). Los pacientes que se presentaron temprano y tuvieron un síntoma de inicio de la primera extracción de sangre de menos de 360 minutos fueron más propensos a tener una elevación del segmento ST en un ECG inicial y un diagnóstico definitivo de IM. A la mayoría de los pacientes se les tomó la primera muestra de sangre menos de 360 minutos después del inicio de los síntomas ($n = 359$, 66%, 215min de media, SD 79).

Toma de muestras y preparación

La venesección exigida por el protocolo se produjo al ingreso y, a continuación, a las 1, 2, 3, 6, 12 y 24 horas. Se permitió un margen de 10 minutos a cada lado de los tiempos de muestra a 1, 2, 3 y 6 horas y 30 minutos a cada lado de los tiempos de muestra a las 12 y 24 horas. En cada extracción de sangre, se recogieron aproximadamente 20 ml de sangre en tubos de gel separador de suero de 2 x 4 ml, tubo de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de 1 x 4 ml, tubo de citrato de sodio de 1 x 2,7 ml y tubo separador de gel de heparina de litio de 1 x 3 ml (todos Vacutainer® Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 3.500 rpm durante 5 minutos y, posteriormente, se transfirieron en alícuotas de 500 μ l en tubos criogénicos de 2 ml (Sarstedt Ltd, Leicester, Reino Unido) y se congelaron a -80 °C.

35 Análisis de ECG

Los inventores realizaron un análisis de ECG cegado de 12 derivaciones. Se analizó el ECG inicial de presentación. Se observó la presencia de las siguientes características de ECG en cada derivación:

- Elevación del segmento ST de 1 mm en el punto J
- Elevación del segmento ST de 2 mm en el punto J
- 40 • Depresión del segmento ST de 0,5mm 80ms después del punto J
- Ondas Q de $\geq 0,03$ ms de ancho y $\geq 25\%$ del tamaño de la siguiente onda R
- Inversión en onda T de al menos 1 mm.
- Bloqueo de rama izquierda
- Bloqueo de rama derecha
- 45 • Fibrilación atrial
- Ritmo acelerado
- Presencia de hipertrofia ventricular izquierda (criterios de Cornell, (183)).

Análisis de biomarcadores

Antes del análisis, las partes alícuotas se descongelaron en un rodillo mecanizado durante al menos 20 minutos a

temperatura ambiente. Una vez realizado el análisis de biomarcadores, se descartó cualquier parte residual de la muestra. El análisis de biomarcadores solo se realizó en muestras que se han sometido a 1 ciclo de congelación y descongelación. La concentración de H-FABP se midió utilizando un biochip cardíaco según las instrucciones de uso del fabricante (Randox Laboratories, Crumlin, Irlanda del Norte). Este es un método disponible comercialmente en estado sólido basado en el principio de inmunoensayo quimioluminiscente en sándwich de dos etapas.

Los ensayos de biochip se realizaron de la siguiente manera:

1. Dos viales de calibrador y materiales de reconstitución de control se reconstituyeron con agua destilada doble y se colocaron en un rodillo mecanizado durante 10 minutos para asegurar una mezcla adecuada.

2. Se reconstituyeron nueve viales de material calibrador lipofilizado y 3 viales de material de control lipofilizado con la solución de la etapa uno. Una vez reconstituidos, estos viales se colocaron en un rodillo mecanizado durante 10 minutos.

3. Se pipetearon 240 µl de solución salina tamponada con tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS) de 19 mMol, pH 7.0 que contiene surfactante de proteínas, conservantes y agentes bloqueadores en cada uno de los nueve pocillos de la matriz de biochip cardíaco. Micro-pipeteado sobre esto 60 µl de muestra, calibrador o material de control. A continuación se colocaron los biochips en un dispositivo termosellante y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos a 380 rpm.

4. Después de la incubación, los biochips se vaciaron de su mezcla de reactivos. Añadiendo aproximadamente 350 µl de solución salina tamponada con TRIS, pH 7,4, a cada depósito para la muestra, se realizaron dos lavados rápidos y 4 x 2 minutos de remojo.

5. Después de los ciclos de lavado, los biochips se secaron por golpecito de la solución de lavado de superficie en papel sin pelusas.

6. A continuación, se pipetearon 300 µl de solución salina tamponada con TRIS 19 mM, pH 7.0 con surfactante de proteínas, estabilizantes, conservantes, agentes bloqueadores y peróxido de rábano picante (HRP) específico del ensayo en cada depósito para la muestra. Este se colocó en el termosellador y se incubó a 37 °C durante 30 minutos a 380 rpm.

7. Después de la incubación, se realizó un ciclo de lavado adicional idéntico al proceso en la etapa 4.

8. Para evitar que los depósitos para la muestra se secan, se dejó en cada depósito la solución de lavado tamponada hasta el análisis.

9. El biochip se secó en papel sin pelusa. A continuación, se agregaron 250 µl de reactivo de señal (luminol y peróxido de solución 1:1) a cada depósito y el biochip se colocó en el soporte de la máquina de imágenes del investigador de evidencia exactamente 2 minutos +/- 10 segundos después de la adición del reactivo de señal. El investigador de evidencia toma dos imágenes de alta resolución del biochip. A continuación, se realiza la cuantificación automatizada de la fluorescencia de la muestra (y, por lo tanto, de la concentración de biomarcadores). En caso de fallo del software, las imágenes pueden ser analizadas manualmente.

El intervalo de referencia para el ensayo H-FABP ha sido determinado por un grupo independiente, que demuestra un límite superior percentil 99 de 5,3 µg/L y 5,8 µg/L en mujeres y hombres, respectivamente (Bathia et al 2009). Esta diferencia de género no fue estadísticamente significativa. En este estudio, los umbrales de decisión de 5,3 µg/L y 2,5 µg/L (percentil 95) fueron elegidos para ambos sujetos masculinos y femeninos. Los ensayos de calibración y control se realizaron según las recomendaciones de los fabricantes.

La troponina T de 4ª generación y la troponina T de alta sensibilidad se analizaron con un analizador modular Roche E170 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). El percentil 99 para el ensayo de hsTnT se derivó de una cohorte de 533 voluntarios sanos (14 ng/L CI 12,7-24,9 ng/L) (prospecto de Roche). El percentil 99 de 10 ng/L para el ensayo de troponina T de 4ª generación se derivó de una cohorte de 1.951 voluntarios sanos. Solo se pudo lograr un CV de ≤ 10% a una concentración de 30 ng/L (prospecto de Roche) y, por lo tanto, se eligió como el umbral de diagnóstico para el ensayo de troponina de 4ª generación.

Diagnóstico final

El diagnóstico final para cada paciente en el estudio fue hecho por los inventores, cegado a los resultados de biomarcadores en investigación. Se eligió una muestra aleatoria de 50 pacientes y el diagnóstico fue adjudicado por un médico independiente. En los casos en que las opiniones sobre el diagnóstico final divergieron, un tercer médico adjudicador independiente realizó el diagnóstico final. Las categorías de diagnóstico se asignaron utilizando los siguientes criterios:

Infarto agudo de miocardio

El diagnóstico de IM se realizó según la definición universal de IM de 2007. Se escogió un corte superior utilizando un

ensayo de troponina T de 4ª generación (Roche Diagnostics, Burgess Hill, Reino Unido) de 0,03 µg/L, que representa el nivel más bajo en donde el coeficiente de varianza del ensayo fue del 10%. El límite de detección con este ensayo es de 0,01 µg/L.

5 La elevación del segmento ST IM (STEMI) se diagnosticó cuando la elevación del segmento ST en el punto J era > 1 mm en las derivaciones de ECG I-III, aVL, aVF, V4-V6 y > 2 mm en las derivaciones V1-V3. El diagnóstico de IM sin elevación del segmento ST (NSTEMI) se diagnosticó mediante la exclusión de STEMI.

Síndrome coronario agudo

10 Para los fines de la clasificación de esta investigación, el síndrome coronario agudo se definió como dolor en el pecho isquémico de inicio reciente (<2 semanas) en reposo o con esfuerzo mínimo y niveles de troponina de 4ª generación que no cumplieron con los criterios de infarto de miocardio. Además tenía que haber:

1. Depresión del segmento ST del ECG de al menos 0,5 mm 80 ms después del punto J o la inversión de la onda T de ≥ 1 mm en el nadir (o pseudo normalización de la inversión de la onda T en reposo) asociada con los síntomas típicos.

O

15 2. Evidencia de isquemia miocárdica en pruebas funcionales, es decir, prueba de esfuerzo con ejercicio positivo, defecto de perfusión inducible con imágenes de perfusión miocárdica de esfuerzo o hipoquinesia miocárdica regional en ecocardiografía de esfuerzo con dobutamina.

O

20 3. Enfermedad arterial coronaria obstructiva (≥ 70% estenosis) en al menos una arteria coronaria epicárdica en angiografía invasiva.

Dolor en el pecho no isquémico

Tras la exclusión de IM y SCA, se diagnosticó dolor en el pecho no isquémico.

Resultados

25 La Tabla 1 detalla la probabilidad de infarto agudo de miocardio para cada resultado potencial de los biomarcadores individualmente o en combinación entre sí. Se identificó que hay varias vías potenciales de tratamiento de pacientes y la estratificación de los pacientes según los resultados podría permitirle tomar una decisión sobre la vía que deben seguir. En este caso, si la probabilidad de que un paciente tenga un patrón de resultado específico de tener un IM es inferior al 5%, se consideró que para estos pacientes sería seguro descartar un IAM y se pueden investigar otras causas de dolor en el pecho (según una muestra de admisión). En el modelo óptimo, este sería un resultado negativo para ECG, hsTnT y H-FABP, de estos pacientes el 1,6% se habría identificado incorrectamente (se observó que estos tenían presentaciones clínicas inusuales). La categoría de mayor riesgo se definió al tener la mayor probabilidad de IM. La práctica actual indicaría que todos los pacientes con una lectura de ECG positiva serían remitidos a un cardiólogo, el resto de los pacientes se pueden clasificar según los resultados de sus biomarcadores. La proporción de probabilidades proporciona un resumen de lo que significa un resultado específico según las probabilidades de que el paciente haya tenido un IM. Esto se calcula de la siguiente manera;

$$\text{Proporción de probabilidades} = \frac{\left(\frac{P_{im}}{P_{no-im}} \right)_{probada}}{\left(\frac{P_{im}}{P_{no-im}} \right)_{total}}$$

En donde P_{im} y P_{no-im} son la probabilidad de tener un IM y la probabilidad de no tener un IM en la prueba (población con el resultado dado) y en la población total (todos los pacientes, independientemente del resultado de la prueba).

40 Según el método de la presente invención, cualquier paciente con un ECG positivo sería remitido inmediatamente a un cardiólogo y aquellos con un ECG negativo pueden ser estratificados según el resultado de los ensayos de biomarcadores. La Tabla 2 muestra las probabilidades de IM y las proporciones de probabilidades asociadas para los pacientes con ECG negativo que dependen del resultado de H-FABP y TnT medidos en el ingreso. La Tabla 3 muestra los resultados de una correlación de Pearson realizada para determinar si hubo una relación entre los niveles de H-FABP y los niveles de TnT en diferentes puntos temporales. Se encontró que las mediciones de H-FABP a las 3 horas del ingreso estaban fuertemente correlacionadas con las mediciones de troponina T a las 6 y 12 horas del ingreso (R = 0,845 y 0,863, respectivamente).

Tabla 1 La probabilidad de infarto agudo de miocardio para cada resultado potencial de los biomarcadores individualmente o en combinación entre sí y la razón de probabilidades asociada para cada uno.

	Combinaciones de biomarcadores	IM	No-IM	Total	Prob de IM	Prob de no-IM	Proporción de probabilidades
	ECG (-)	84	376	460	0,183	0,817	1,040
	ECG (+)	71	16	87	0,816	0,184	20,662
ECG (-)	HFABP (-)	11	253	264	0,042	0,958	0,200
	HFABP (+)	67	106	173	0,387	0,613	2,909
	ECG (-) y HFABP (-)	11	253	264	0,042	0,958	0,202
	ECG (-) y HFABP (+)	67	106	173	0,387	0,613	2,943
	ECG (+) y HFABP (-)	9	10	19	0,474	0,526	4,191
	ECG (+) y HFABP (+)	60	4	64	0,938	0,063	69,844
ECG (-)	hsTnT (-)	7	238	245	0,029	0,971	0,134
	hsTnT (+)	61	72	133	0,459	0,541	3,862
	ECG (-) y hsTnT (-)	7	238	245	0,029	0,971	0,137
	ECG (-) y hsTnT (+)	61	72	133	0,459	0,541	3,945
	ECG (+) y hsTnT (-)	8	7	15	0,533	0,467	5,321
	ECG (+) y hsTnT (+)	49	3	52	0,942	0,058	76,052
	HFABP (-) y hsTnT (-)	3	183	186	0,016	0,984	0,076
ECG (-)	HFABP (+) y hsTnT (-)	3	45	48	0,063	0,938	0,310
	HFABP (-) y hsTnT (+)	7	29	36	0,194	0,806	1,124
	HFABP (+) y hsTnT (+)	51	41	92	0,554	0,446	5,792
	ECG (-) y HFABP (-) y hsTnT (-)	3	183	186	0,016	0,984	0,042
	ECG (-) y HFABP (+) y hsTnT (-)	3	45	48	0,063	0,938	0,171
	ECG (-) y HFABP (-) y hsTnT (+)	7	29	36	0,194	0,806	0,620
	ECG (-) y HFABP (+) y hsTnT (+)	51	41	92	0,554	0,446	3,193
	ECG (+) y HFABP (-) y hsTnT (-)	5	7	12	0,417	0,583	1,833
	ECG (+) y HFABP (+) y hsTnT (-)	3	0	3	1,000	0,000	Sin calc
	ECG (+) y HFABP (-) y hsTnT (+)	3	1	4	0,750	0,250	7,700
	ECG (+) y HFABP (+) y hsTnT (+)	45	2	47	0,957	0,043	57,750

Tabla 2 Probabilidad de infarto agudo de miocardio y proporciones de probabilidades para pacientes con ECG negativo según la combinación de sus resultados de H-FABP y troponina T.

Combinaciones de biomarcadores	de IM	No-IM	Total	Prob de IM	Prob de no-IM	Proporción de probabilidades
HFABP (-) y hsTnT (-)	3	183	186	0,016	0,984	0,076
HFABP (+) y hsTnT (-) O HFABP (-) y hsTnT (+)	10	74	84	0,119	0,881	0,629
HFABP (+) y hsTnT (+)	51	41	92	0,554	0,446	5,792

5 **Tabla 3** Coeficientes de correlación de Pearson entre las mediciones de H-FABP al ingreso, 1 h, 2 h, 3 h y las mediciones de troponina T de alta sensibilidad al ingreso, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h y 12 h.

	New_hsTnTAdmission	New_hsTnT ₁	New_hsTnT ₂	New_hsTnT ₃	New_hsTnT ₆	New_hsTnT ₁₂
FABPAdmission	.578	.667	.552	.585	.576	.457
FABP1	.401	.664	.653	.780	.797	.809
FABP2	.408	.671	.669	.737	.767	.806
FABP3	.388	.625	.685	.734	.845	.863

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de estratificación de riesgo de un sujeto que se presenta con dolor en el pecho que se sospecha que es de naturaleza isquémica, en donde dicho sujeto tiene un ECG negativo, comprendiendo dicho método la determinación de los niveles de una troponina cardíaca y H-FABP en una muestra *in vitro* tomada del sujeto en la presentación en donde el valor de referencia para una troponina cardíaca para descartar un infarto agudo de miocardio (IAM) es el percentil 99 de una población de referencia, y en donde el valor de referencia para H-FABP para descartar un IAM es el percentil 95 de una población de referencia, y en base a estos resultados, calculando la probabilidad del sujeto de haber sufrido un IAM y la estratificación de riesgo de dicho paciente en consecuencia.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde si la troponina cardíaca y la H-FABP son negativas, el sujeto se coloca en una categoría de bajo riesgo de infarto agudo de miocardio.
3. El método de la reivindicación 2, en donde una etapa adicional comprende la determinación de los niveles de H-FABP en una muestra adicional *in vitro* tomada del sujeto 3 horas después de la presentación.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde si una de las troponinas cardíacas o H-FABP es positiva, el sujeto se coloca en una categoría de riesgo moderado de infarto agudo de miocardio.
5. El método de la reivindicación 1, en donde si la troponina cardíaca y la H-FABP son positivas, el sujeto se coloca en una categoría de alto riesgo de infarto agudo de miocardio.
- 20 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el valor de referencia para H-FABP para descartar un infarto de miocardio es de aproximadamente 2,5 ng/ml y un valor de H-FABP menor que este valor de referencia se considera un resultado negativo e indica que el infarto de miocardio agudo no se ha producido.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la troponina cardíaca es troponina T cardíaca (cTnT) y el valor de referencia para descartar un infarto de miocardio es de aproximadamente 0,014 ng/ml y un valor de cTnT menor que este valor de referencia se considera un resultado negativo e indica que no se ha producido infarto agudo de miocardio.
- 25 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la troponina cardíaca es troponina I cardíaca (cTnI).

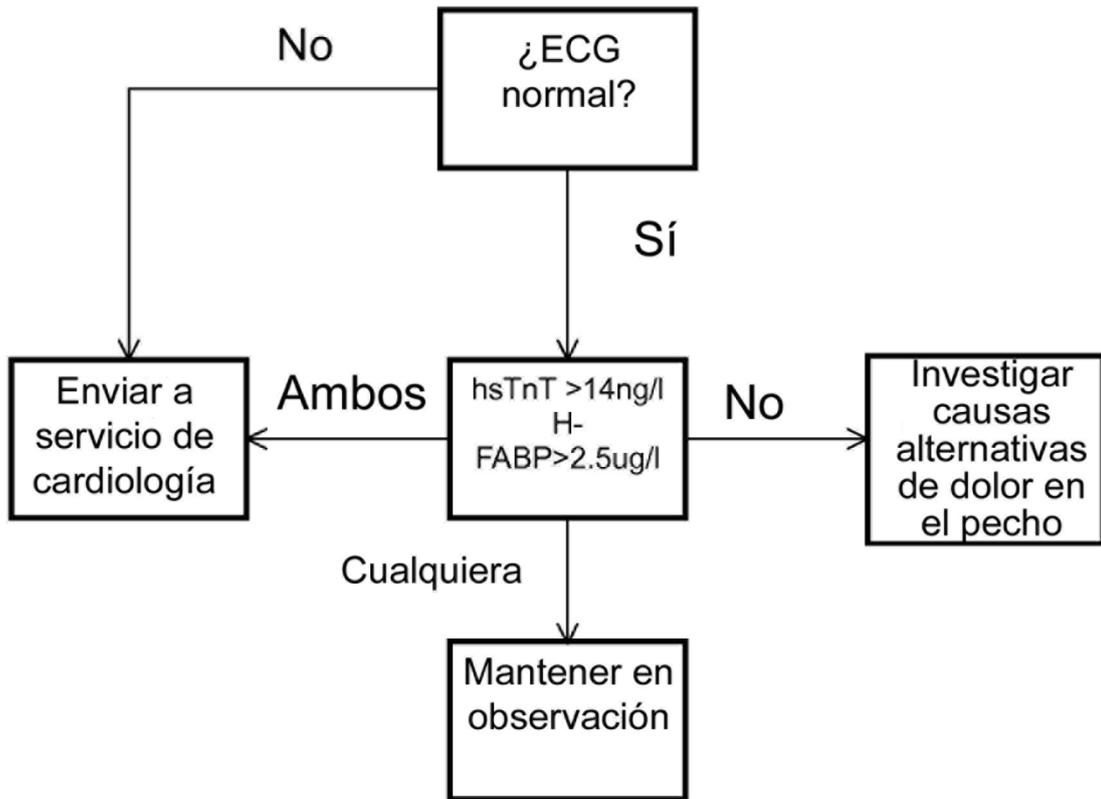


Figura 1