

Sabrina Pacheco do Amaral Vendramini

**Troponina I e fração MB da creatinoquinase
em pacientes submetidos à revascularização
percutânea ou cirúrgica do miocárdio:
comparação de métodos analíticos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur

São Paulo

2022

Sabrina Pacheco do Amaral Vendramini

**Troponina I e fração MB da creatinoquinase
em pacientes submetidos à revascularização
percutânea ou cirúrgica do miocárdio:
comparação de métodos analíticos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vendramini, Sabrina Pacheco do Amaral
Troponina I e fração MB da creatinoquinase em
pacientes submetidos à revascularização percutânea ou
cirúrgica do miocárdio : comparação de métodos
analíticos / Sabrina Pacheco do Amaral Vendramini. --
São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Antonio de Padua Mansur.

Descritores: 1.Troponina 2.Creatina quinase
forma MB 3.Revascularização miocárdica
4.Biomarcadores 5.Imunoensaio 6.Ressonância
magnética cardíaca

USP/FM/DBD-483/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Elaine e Arnaldo e aos meus filhos Natália e Vitor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur, que me recebeu como aluna e me ensinou muito mais do que ciência. Com seu jeito humanista, expandiu a minha visão para além do laboratório clínico e despertou em mim a curiosidade e o prazer do conhecimento científico. Obrigada por tudo, principalmente pela paciência.

À Dra. Célia Maria Cássaro Strunz, que sempre me proporcionou desafios profissionais que me impulsionaram a chegar no dia de hoje. Além de ser minha diretora é também uma grande inspiração. Obrigada por confiar em mim e no meu trabalho.

À minha chefe Lucila Mitiko Araki que me incentivou a entrar neste desafio e é a grande responsável pela profissional que sou hoje. Minha gratidão por você não tem tamanho.

Aos meus colegas e ex-colegas de trabalho da Seção de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas que me apoiaram e me ajudaram muitas vezes no dia a dia, tanto na execução das dosagens da minha tese, como na colaboração e entendimento nas minhas ausências, em especial à Isabela pela grande ajuda com a soroteca.

À toda equipe multiprofissional do grupo MASS, responsáveis pelo trabalho do qual a minha tese foi um subestudo, principalmente ao Prof. Dr. Whady Armindo Hueb e Dr. Gustavo Boros, e à secretária Eliana Olímpio, pela ajuda na compilação dos dados.

Às minhas grandes amigas e colegas de trabalho, Adriana, Alessandra, Ana Paula, Christiane e Cristina (ordem alfabética e não de importância) por serem

minha rede de apoio na vida pessoal e profissional. Minha saúde mental e emocional eu devo a vocês.

Ao meu pai Arnaldo que me ensinou os valores éticos de um profissional dedicado e me mostrou que a paixão pelo nosso trabalho é a gratificação diária que nos alimenta e nos mantém firme e fortes no propósito de sermos pessoas melhores para os nossos e para a sociedade.

À minha mãe Elaine que para mim não é nada menos que sinônimo de amor e força. Mãe, toda vez que eu me sinto abalada ou enfraquecida eu penso em você e em sua força e luta pela vida. Obrigada pelo exemplo de poder feminino.

Meus filhos Vitor e Natália. Vocês são o que me motiva e sustenta. São a minha razão de viver e minha força para caminhar. Espero ser seu exemplo de virtude, e merecimento de honra e orgulho.

Ao meu marido Christian. Não tenho palavras para dizer quão grata à Deus eu sou por ter você em minha vida. Sei que posso contar com sua cumplicidade, parceria, paciência e amor, não só neste momento, mas sempre e para sempre.

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: *adaptado do International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Sueli Campos Cardoso, Valéria Vilhena 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

3.2 Métodos analíticos.....	17
3.2.1 Ressonância magnética cardíaca.....	18
3.2.2 Quimioluminescência.....	19
3.2.2.1 Troponina	20
3.2.2.2 CKMB.....	21
3.3 Análise estatística	21
3.4 Comitê de ética.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Randomização.....	23
4.2 Determinação dos Biomarcadores.....	24
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac	Anticorpo
ACCF	Fundação do Colégio Americano de Cardiologia (American College of Cardiology Foundation)
Ag	Antígeno
AHA	Associação Americana de Cardiologia (American Heart Association)
AST	Aspartato Amino Transferase
AUC	Área sob a curva (Area under de ROC curve)
AVC	Acidente vascular cerebral
CAPPesq	Comissão de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
CEC	Circulação extra-corpórea
CKMB	Creatina quinase forma MB
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CPK	Creatinofosfoquinase
CRVM	Cirurgia de revascularização miocárdica
CTn	Troponina cardíaca
CTn-hs	Troponina cardíaca de alta-sensibilidade
CTnI	Troponina cardíaca I
CTnT	Troponina cardíaca T
DAC	Doença arterial coronária
DCA	Doença coronária aguda
DCM	Doença coronária multiarterial
DCV	Doença Cardiovascular
dp	Desvio-padrão
ECG	Eletrocardiograma
ESC	Sociedade Europeia de Cardiologia (European Society Cardiology)
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FMN	Flavina mononucleotídeo
G6FDH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC	Intervalo de confiança
ICP	Intervenção coronária percutânea
IM	Infarto do miocárdio
IQR	Interquartil

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LoB	Limite de branco
LoQ	Limite de Quantificação
MASS V	The Medicine, Angioplasty, Surgery Study V
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OR	Razão de chances (Odds ratio)
PCR	Proteína C reativa
RMC	Ressonância magnética cardíaca
ROC	Característica de Operação do Receptor (Receiver Operating Characteristic)
SUS	Sistema único de saúde
USP	Universidade de São Paulo
VD	Valores de corte preconizados pelas diretrizes atuais
VF	Valores de corte preconizados pelo fabricante
VS	Valores sugeridos pela análise da curva ROC
WHF	World Heart Federation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama do estudo.

Figura 2. Valores de cTnI em relação ao tempo das marcas Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI® em pacientes submetidos à intervenção coronária percutânea.

Figura 3. Valores de cTnI em relação ao tempo das marcas Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI® em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica.

Figura 4. Comparativo das Curvas ROC entre Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI®, utilizando os valores de pico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características, Perfil Demográfico e Perfil Clínico dos pacientes.

Tabela 2 – Valores de corte de cTnI, no pico de elevação, em pacientes submetidos à ICP e CABG.

Tabela 3 – Correlação das áreas sob as curvas trapezoidais.

Tabela 4 – Capacidade diagnóstica do biomarcador (cTnI) como preditor independente de infarto pós-procedimento de revascularização miocárdica cirúrgica.

Tabela 5 - Capacidade diagnóstica do biomarcador (cTnI) como preditor independente de infarto pós-procedimento intervenção coronária percutânea.

Tabela 6 - Comparativo das Curvas ROC entre Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI®, utilizando os valores de pico (ICP).

Tabela 7 - Figura 4. Comparativo das Curvas ROC entre Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI®, utilizando os valores de pico (CRVM).

Tabela 8 – Diferenças entre as curvas ROC dos ensaios de cTnI.

Tabela 9 – Acurácia dos ensaios utilizando os valores de corte preconizados pelo fabricante (VF), pelas diretrizes atuais (VD) para o diagnóstico de IM tipos 4a e 5 e os valores sugeridos (VS) pela análise da curva ROC.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Desempenho analítico dos ensaios de Troponina

Quadro 2 - Diferenças bioquímicas e de desempenho analítico dos Kits de Troponina utilizados no estudo

Quadro 3 - Comparativo analítico de ensaios de cTnI contemporâneos e de alta sensibilidade.

RESUMO

Vendramini SPA. Troponina I e fração MB da creatinoquinase em pacientes submetidos à revascularização percutânea ou cirúrgica do miocárdio: comparação de métodos analíticos (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022

Introdução: A dosagem de Troponina I (cTnI) é determinante para o diagnóstico do infarto do miocárdio (IM). As diretrizes atuais, para o diagnóstico de IM tipo 4a e 5, recomenda como valores de corte de troponina concentrações de 5 e 10 vezes o percentil 99, respectivamente. As diretrizes levam em conta as questões analíticas relacionadas aos diferentes ensaios de cTnI e enfatiza os benefícios do uso de ensaios de alta sensibilidade (hs). Porém, a sensibilidade e especificidade do método da hs-cTn para o diagnóstico do IM tipo 4a e 5 é um desafio ainda para os clínicos. **Objetivo:** comparar 3 diferentes ensaios de cTnI e CKMB para identificar os melhores valores de corte de para cada ensaio no diagnóstico do IM tipo 4a e 5. **Métodos:** foram analisadas amostras de soro de 115 pacientes com doença arterial coronária crônica estável, média de idade de 62±9 anos. 26 (22,6%) destes submetidos a intervenção coronária percutânea e 89 (77,4%) submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. As amostras séricas foram coletadas 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após os procedimentos. O diagnóstico definitivo de IM foi confirmado pela presença de novo realce tardio detectado por nova ressonância magnética cardíaca (RMC) realizada após cada intervenção. Os ensaios de cTnI utilizados foram: dois ensaios contemporâneos das marcas Siemens – AdviaCentaurTnI - Ultra® (Siemens) e Beckman Coulter Access AccuTnI® (Beckman) e um ensaio de alta sensibilidade da Abbott Architect hs-cTnI® (Abbott). Foram analisadas a sensibilidade, especificidade, acurácia e a curva ROC para cada ensaio de cTnI. **Resultados:** 21 (18,3%) pacientes tiveram IM confirmados pela RMC sendo 5 pacientes com IM tipo 4a e 16 pacientes com IM tipo 5. Observamos baixa acurácia dos ensaios para o diagnóstico de IM tipos 4a e 5, aplicando as recomendações das diretrizes atuais. Para o diagnóstico de IM tipo 4a, os ensaios da Siemens, Beckman e Abbot apresentaram 52%, 52% e 24% de acurácia respectivamente. Já para o IM tipo 5 a acurácia observada foi de 31%, 26% e 24%, respectivamente. A análise da curva ROC para cada ensaio sugeriu valores muito superiores aos atualmente utilizados. Quando ajustado para estes novos valores de corte, a acurácia dos 3 ensaios de cTnI melhora significativamente chegando a 82% para o IM tipo 5. As acurácias dos ensaios de cTnI para o IM tipo 4a foram 78%, 88%, e 87% para Siemens, Beckman e Abbott, respectivamente. **Conclusão:** O ensaio da troponina-hs apresentou acurácia inferior aos testes contemporâneos para o diagnóstico de IM tipos 4a e 5. Portanto os valores de corte devem ser superiores aos sugeridos pelos fabricantes e pela diretriz para esses grupos de pacientes. É também necessário avaliar e validar minuciosamente as características analíticas do ensaio utilizado, considerando a perda de acurácia.

Descritores: Troponina, Creatina quinase forma MB, Revascularização miocárdica, Biomarcadores, Imunoensaio, Ressonância magnética cardíaca.

ABSTRACT

Vendramini SPA. Troponin I and Creatinokinase fraction MB measurement in patients undergoing surgical and percutaneous myocardial revascularization: comparison of analytical methods (thesis) São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022

Background: Troponin (cTn) is determinant for myocardial infarction (MI) diagnosis. The current guidelines, for diagnosing MI type 4a and 5 recommend, based on the 99th percentile rule, troponin decision limits of 5 and 10 times, respectively. The guidelines also considered the analytical questions concerning using different kits for troponin measurement and recommended adopting high sensitivity (hs) tests. However, the hs-cTn assays sensitivity and specificity for MI type 4a and 5 diagnoses are challenging for clinicians. **Objective:** to compare three different cTnI and CKMB immunoassays to identify each assay's best cTnI cutoff values for MI type 4a and 5 diagnoses. **Methods:** we used serum samples of 115 patients with stable chronic coronary artery disease, with a mean age of 62±9 years. 26 (22.6%) patients underwent percutaneous coronary intervention, and 89 (77.4%) patients underwent coronary artery bypass graft. Serum samples were collected 6, 12, 24, 36, 48, and 72 hours after the procedures. A new cardiac magnetic resonance imaging (CMR) late gadolinium enhancement performed before and after each intervention diagnosed definitive MI. The cTnI assays were two contemporary assays of Siemens – AdviaCentaurTnI - Ultra® (Siemens) and Beckman Coulter Access AccuTnI® (Beckman) and one hs-cTnI assay by Abbott Architect hs-cTnI® (Abbott). We analyzed the sensitivity, specificity, accuracy, and ROC curve for each cTnI assay. **Results:** 21 (18.3%) patients had MI, 5 with MI type 4a, and 16 with MI type 5. We observed low accuracy of the assays for MI types 4a and 5 diagnoses applying the current guidelines recommendations. For the diagnosis of MI type 4a, Siemens, Beckman, and Abbott assays showed 52%, 52%, and 24% accuracy, respectively. As for MI type 5, the observed accuracy was 31%, 26%, and 24%, respectively. The ROC curve for each assay suggested values much higher than those currently used. When adjusted for these new cutoff values, the three cTnI assay accuracies improved significantly, reaching 82% for MI type 5. The cTnI assay accuracies for MI type 4a were 78%, 88%, and 87% for Siemens, Beckman, and Abbott, respectively. **Conclusion:** The hs-cTnI assays had lower accuracy than contemporary tests for diagnosing MI types 4a and 5. Therefore the cutoff values for these groups of patients should be higher than those recommended by manufacturers and guidelines. It is also necessary to evaluate and validate thoroughly the analytical characteristics of the assay used, considering the loss of accuracy.

Descriptors: Troponin, Creatina kinase form MB, Myocardial revascularization, Biomarkers, Immunoassay, Cardiac magnetic resonance.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infarto agudo do miocárdio

As doenças cardiovasculares (DCV) são atualmente as principais causas de morte no mundo e na população Brasileira.¹ Estudo recente no Brasil, em uma população de 35 a 74 anos, entre 1996 e 2017, mostrou que a mortalidade por DCV corresponde a 31% das mortes por todas as causas² e suas complicações resultaram em um gasto de US\$ 4,18 bilhões na economia brasileira entre 2006 e 2015.³

A doença arterial coronária (DAC) é a DCV que mais contribuiu para estas estatísticas.⁴ Ela consiste em uma doença de natureza inflamatória⁵ e suas principais manifestações clínicas são a angina estável, angina instável, infarto do miocárdio (IM) e morte súbita.⁶ É um processo patológico caracterizado pelo acúmulo de placa aterosclerótica nas artérias epicárdicas, obstrutivas ou não-obstrutivas. Este processo pode ser modificado por melhoras no estilo de vida, terapias farmacológicas e intervenções invasivas destinadas a alcançar a estabilização ou regressão da doença aterosclerótica.⁷

As diretrizes recomendam a revascularização do miocárdio em pacientes com tratamento clínico otimizado, mas que continuam sintomáticos ou nos quais a revascularização pode melhorar o prognóstico.^{8,9} A revascularização por intervenção coronária percutânea (ICP) ou por cirurgia de revascularização do miocárdio (CRVM) também visa tratar a isquemia miocárdica e suas

manifestações clínicas adversas nos pacientes com estenose coronária significativa e reduzir o risco de eventos cardiovasculares agudos maiores, incluindo IM e morte cardiovascular.

Dos 1.149.602 procedimentos de revascularização (cirúrgicos/intervencionistas) realizados pelo SUS de 2008 a 2018, o ICP correspondeu a 66% (755.557), seguida por CRVM (21%, 244.105) e cirurgia valvar cardíaca (8%, 88.280). A relação ICP/CRVM foi de 2,2 em 2008, aumentando para 4,3 em 2018. Durante esse período, observou-se aumento de 70% no número de procedimentos associados à SCA.¹⁰

1.2 Definição e Classificação Universal do infarto do miocárdio

1.2.1 Definição

Ao longo dos anos, diferentes definições para o IM foram utilizadas, gerando controvérsias e confusão. Por isso, houve uma grande necessidade de uma definição universal. Isso ocorreu pela primeira vez entre as décadas de 50 e 70, quando um grupo de trabalho da Organização Mundial de Saúde estabeleceu uma definição, baseada no ECG, com intensões de uso populacional. Esta descrição original, salvo pequenas modificações, ainda é usada até os dias atuais. Com a introdução de biomarcadores cardíacos mais sensíveis, como a CKMB e a cTn, a Sociedade Europeia de Cardiologia e a Fundação do Colégio Americano de Cardiologia colaboraram para redefinir o IM usando uma abordagem bioquímica e clínica, e relataram que a lesão do

miocárdio detectada por biomarcadores anormais, em um cenário da isquemia aguda do miocárdio devem ser rotulados como IM.¹¹

A definição foi refinada por uma Força-Tarefa Global, levando à Definição Universal de Infarto do Miocárdio “Consensus Document” em 2007, introduzindo um novo sistema de classificação MI com cinco subcategorias.¹²

Em 2012, o comitê ESC/ACCF/AHA/WHF, propôs uma redefinição para o IM. Essa redefinição foi motivada pelo surgimento de biomarcadores de necrose miocárdica mais sensíveis, como a cTnI, que na época foi referida como um ensaio "sensível" contemporâneo capaz de detectar isquemia e necrose do miocárdio. Assim, o cTnI foi considerado o biomarcador preferido para o diagnóstico do IM.¹³

Já a última Definição Universal, do mesmo comitê ESC/ACCF/AHA/WHF em 2018, trouxe algumas atualizações em relação ao diagnóstico de IM.¹⁴

A primeira destas atualizações foi a utilização do termo injúria miocárdica, que pode ser usado quando há evidência de elevações de níveis séricos de cTn, com no mínimo um dos valores acima do limite de referência superior no percentil 99. A injúria miocárdica foi considerada aguda na presença de oscilações dos níveis séricos de cTn.

Dentre esta e outras considerações, essa força-tarefa considerou as questões analíticas dos ensaios de cTn, além de dar ênfase aos benefícios do uso de ensaios de alta sensibilidade para esse biomarcador e introduziu o termo troponina cardíaca de alta sensibilidade (cTn-hs), para os novos ensaios surgidos no mercado.

Portanto, para os pacientes com aumento dos valores de cTn-hs, os clínicos devem distinguir se os pacientes sofreram uma lesão miocárdica não-coronária ou um dos 5 subtipos de IM.

1.2.2 Classificação

Critérios para diagnóstico infarto agudo do miocárdio

- Detecção de injúria miocárdica com evidências clínicas de isquemia miocárdica, além da detecção de oscilações dos níveis séricos de cTn, com no mínimo um valor acima do percentil 99 do limite de referência superior e um dos seguintes achados:

- Sintomas de isquemia miocárdica
- Novas alterações isquêmicas no ECG
- Desenvolvimento de ondas Q patológicas
- Imagem evidenciando nova perda de miocárdio viável ou nova anormalidade de movimento na região da parede, em padrão consistente com etiologia isquêmica.

Além de definir as implicações que envolvam os sintomas clínicos e questões sobre a interpretação de observações relatadas por meio de outras fontes diagnósticas, a quarta definição universal de IM manteve a normatização da terceira força-tarefa. Com base na detecção de aumento e diminuição dos valores de biomarcadores cardíacos, os tipos de IM foram classificados quanto à sua causa. Desta forma, foram relacionados 5 tipos de IM:

- **Tipo 1:** IM espontâneo está relacionado à ruptura, ulceração, fissura, erosão ou dissecção da placa aterosclerótica com trombo intraluminal de uma ou mais artérias coronárias levando a diminuição do fluxo coronário ou embolia distal microtrombos com necrose miocárdica subsequente. O paciente pode ter doença coronária aguda (DCA) subjacente grave, mas ocasionalmente não-obstrutiva ou sem DCA.

As placas ateromatosas iniciam-se pelo dano das células endoteliais e íntima subjacente. Logo após a lesão endotelial, as células musculares lisas proliferam-se e migram para a lesão inicial com posterior depósito de substâncias lipídicas (p.ex.: colesterol). Nos estágios mais tardios, fibroblastos infiltram-se nas áreas degenerativas e causam esclerose progressiva nas artérias. Frequentemente, também ocorre precipitação de cálcio formando placas calcificadas. A associação destes processos é denominada aterosclerose.

A exposição dos fatores teciduais da parede vascular favorece a adesão e a agregação plaquetária, formando um coágulo que pode levar a oclusão do vaso. Em outras ocasiões, o coágulo se desprende e flui para um ramo mais distal.

Da mesma forma, o espasmo da artéria coronária pode também causar oclusão coronária aguda. Isso porque o espasmo pode resultar do processo inflamatório do músculo liso da parede da artéria nas margens da placa arteriosclerótica ou por reflexos neuro-mediados.

Imediatamente após uma oclusão coronária aguda, observa-se interrupção do fluxo coronário levando ao IM da região distal correspondente à artéria ocluída.

Logo após, pequenas quantidades de sangue se infiltram na área infartada, e esse fenômeno, combinado com a dilatação progressiva dos vasos sanguíneos locais, levando a uma hemorragia local. Simultaneamente, as fibras musculares utilizam vestígios do oxigênio existente no sangue, reduzindo por completo a hemoglobina. Nos estágios subsequentes, os vasos se tornam altamente permeáveis e com edema tecidual e das células musculares, por redução do metabolismo celular. Após algumas horas de anóxia, as células morrem.¹⁵

- **Tipo 2:** IM secundário a um desequilíbrio isquêmico. Ocorre em casos de lesão miocárdica com necrose onde uma condição diferente de DCA contribui para um desequilíbrio entre o suprimento de oxigênio do miocárdio e/ou demanda, tais como disfunção endotelial coronária, espasmo de artéria coronária, embolia coronária, taqui- ou bradiarritmias, anemia, insuficiência respiratória, hipotensão e hipertensão.

- **Tipo 3:** IM, resultando em morte quando os valores dos biomarcadores não estão disponíveis. Morte cardíaca com sintomas sugestivos de isquemia miocárdica e novas alterações isquêmicas ECG presumidas ou novo bloco de ramo esquerdo, mas a morte ocorre antes que amostras fossem obtidas, antes da elevação do biomarcador cardíaco, ou em casos raros de biomarcadores cardíacos não coletados.

- **Tipo 4a:** são os IM relativos à intervenção coronária percutânea, definidos pela elevação dos valores de cTn maiores que 5 vezes percentil 99º em pacientes com valores basais normais menores ou iguais percentil 99º ou um aumento maior que 20% dos valores cTn, se os valores iniciais são elevados, porém estáveis.

Infartos pós procedimento são geralmente devidos a complicações angiograficamente visíveis. Pela ressonância magnética cardíaca (RMC) pode-se identificar pelo menos dois locais distintos para ocorrência de necrose miocárdica pós ICP: adjacente ao local da intervenção (oclusão do ramo lateral) ou no próprio local da intervenção, onde é mais provável devido ao comprometimento da circulação.¹⁶

A embolização pode ocorrer em qualquer fase do procedimento, mas é mais comum durante a implantação do “Stent”.¹⁷

- **Tipo 4b:** IM relacionado à trombose do “Stent” que é detectado por angiografia coronária ou autópsia no estabelecimento de isquemia miocárdica e com aumento e/ou queda de biomarcadores cardíacos valores com pelo menos um valor acima do percentil 99º.¹⁴

- **Tipo 5:** são os IM relacionados à cirurgia de revascularização do miocárdio, definidos pela elevação dos valores de biomarcadores cardíacos maior que 10 vezes o percentil 99º em pacientes com valores basais normais cTn menores ou iguais ao percentil 99º.¹⁴

Desde a sua criação em 1960 a cirurgia de revascularização miocárdica (CRVM) passou por muitas mudanças para melhoria dos resultados, como por exemplo o enxerto da artéria mamária, etc.,¹⁸ e são diversos os mecanismos de lesão miocárdica na CRVM.

1.3 Biomarcadores cardíacos

1.3.1 História dos Biomarcadores

Os primeiros estudos com marcadores cardíacos, realizados em 1954, utilizaram a enzima aspartato amino transferase (AST) para o diagnóstico de IM.¹⁹ Desde então há uma busca constante por marcadores cada vez mais sensíveis e específicos para o auxílio dos clínicos no diagnóstico do infarto.

Em 1960 a creatinofosfoquinase (CPK) foi descrita pela primeira vez como marcador de lesão em músculo esquelético e miocárdico.²⁰ Sua introdução trouxe maior sensibilidade e especificidade ao diagnóstico de IM. Esta enzima possui dímeros de cadeias M e B e existe em 3 combinações: MM, MB e BB. Estas isoenzimas residem no citosol e atuam como catalizadores de fosfatos para as mitocôndrias. A forma MB é encontrada em maior quantidade nas células cardíacas, comparando-se a outros tecidos. Os ensaios disponíveis para dosagem de CKMB foram pela detecção de sua atividade (CKMB atividade) ou, mais recentemente e mais sensível, o CKMB massa pela detecção da molécula proteica (reação antígeno/anticorpo).²¹

Em 1979 surge a hipótese da existência de uma molécula, verdadeiramente cardio-específica, determinada no sangue por ensaios mais sensíveis e precisos⁷. Em 1995, a troponina T foi introduzida no mercado como marcador do IM e, em 1996, a troponina I.²²

A troponina é um complexo de três proteínas, presente no filamento fino do sarcômero do músculo estriado, que regula a interação da miosina com a actina no processo contrátil: a troponina T (cTnT) que liga o complexo à tropomiosina, a troponina C, a qual liga o cálcio no início da contração e a troponina I (cTnI), um inibidor que bloqueia a contração na ausência do cálcio.

O mecanismo de contração muscular não é totalmente conhecido. De acordo com o principal modelo proposto, ocorrem deslocamentos nanométricos dos filamentos de actina em relação aos de miosina através da interação das cabeças de miosina com sítios de ligação nos filamentos de actina. O controle da contração se dá pela inibição ativa deste deslocamento e a proteína cuja função é a inibição tônica deste processo é a tropomiosina. Ela fica enrolada em espiral envolta de todo o filamento de actina e tem 70 KDa de peso molecular. Presos à tropomiosina, em intervalos regulares de 2,7 nanômetros, que coincidem com os sítios ativos de ligação da actina às cabeças de miosina, temos o complexo de troponinas. Acredita-se que este complexo tenha a função de fixar a tropomiosina aos filamentos de actina e tenha importante função no controle da contração muscular.

A cTn está em sua maior parte compartimentada na estrutura sarcomérica do miócito e uma pequena fração (cerca de 3 a 5 %) está livre no citosol. Uma

vez liberada no sangue, com a injúria da membrana dos miócitos, sua forma livre pode ser detectada.²³

Devido à especificidade como marcador cardíaco da cTn em relação à CKMB, que está presente em pequenas quantidades na musculatura esquelética, houve melhora, não somente na precisão do diagnóstico do IM, mas também na estratificação do risco de pacientes com dor no peito. Sua introdução na prática clínica passou a conduzir estratégias de tratamento na síndrome coronária aguda.

Sabe-se que a meia vida das moléculas de troponina e CKMB é semelhante, assim como seus picos de liberação inicial e o decréscimo após pico. Porém, a troponina mantém-se detectável por dias após o retorno da concentração de CKMB ao nível basal. A liberação contínua de troponina, sete a dez dias após o evento, torna possível o diagnóstico por um período maior.²⁴

1.3.2 Desafios do uso dos biomarcadores

Desde o consenso internacional para definição de IM de 2000, tem-se discutido intensamente o aumento da sensibilidade da troponina e consequente perda de especificidade, pois publicações em larga escala têm demonstrado elevações dos níveis séricos de troponina em outras situações como: pericardite, miocardite, embolia pulmonar, sepse, insuficiência cardíaca congestiva, taquicardia, exercício físico extenuante, acidente vascular encefálico e insuficiência renal crônica.²³

1.3.2.1 Métodos de detecção

O primeiro imunoensaio para cTnI foi descrito por Cummins et al. em 1987,²⁵ com sua distribuição comercial para o analisador Stratus I (Dade Behring) somente em 1996. Mais de 20 anos depois, os ensaios de cTnI foram consideravelmente modificados.²⁶

Os ensaios para detecção de cTn ganharam maior precisão e sensibilidade. Atualmente, os ensaios ultrassensíveis para cTn (cTn-hs) foram introduzidos na prática clínica. Os testes assim classificados são diferenciados por permitir a determinação de concentrações detectáveis de cTn numa população de indivíduos saudáveis.

Este tipo de reação conta com um anticorpo (Ac) como reagente para detectar uma substância química (antígeno-Ag) de interesse. A peculiar especificidade e alta afinidade dos Ac para Ag específicos, acoplada a uma capacidade exclusiva de os Ac interligarem Ag, permitem a identificação e a dosagem de substâncias específicas por vários métodos.²⁷

Assim, o mercado diagnóstico conta com uma série de diferentes imunoensaios para detecção de cTnI. Eles utilizam anticorpos direcionados para diferentes epítomos localizados no antígeno da molécula.

A molécula de cTnI possui 209 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 23 – 24 kDa e três isoformas humanas foram descritas: uma produzida no músculo cardíaco e duas no músculo esquelético (“slows” TnI e “fasts” TnI). A sobreposição da sequência de aminoácidos entre a proteína da cTnI e a “slows” TnI é de cerca de 40% e algo próximo a isso

com a “fasts” Tnl. Portanto, os anticorpos selecionados para os ensaios de cTnI devem ser testados para garantir que não haja reações cruzadas.²⁸

Os fabricantes dos ensaios comerciais são responsáveis por preparar seus próprios materiais-padrão, de modo que diferentes procedimentos de purificação e tipos de antígenos (purificado livre ou complexado a proteínas) são utilizados. Isto leva a outra possível fonte de desacordo entre ensaios.²⁹

O método atualmente mais reconhecido na detecção da maioria das cTn é a quimioluminescência. Consiste em um imunoenensaio homogêneo e não competitivo (tipo sanduiche), onde a interpretação dos valores da cTn presentes na amostra, se dá pela detecção da luz emitida durante a reação química produzida, a partir do imunocomplexo.²⁷ A concentração de cTn é calculada com a ajuda de uma curva padrão, estabelecida com calibradores de concentrações conhecidas de cTn relacionadas à quantidade de luz produzida.

1.3.2.2 Classificação dos ensaios de Troponina

Devido às disponibilidades de mercado e orientações em constante mudança, os ensaios seriam misturados em diferentes categorias. Foi proposta uma abordagem mais sistemática por Wu e Christenson,³⁰ que classificaram os ensaios sobre a percentagem de amostras de indivíduos saudáveis com valores detectáveis.

Além disso, estes ensaios devem apresentar maior precisão possível ao determinar-se o percentil 99 (valor de referência), e possuir um coeficiente de variação (CV) menor que 10%, na mínima concentração detectável da população normal estudada.

A escolha da imprecisão aceitável para um ensaio depende da variação biológica conhecida deste analito e pode influenciar na habilidade de distinguir dois valores e detectar uma alteração significativa.³¹

Para padronização, as diretrizes recomendam que sejam seguidos alguns critérios de qualidade e imprecisão total, para que os resultados destes testes possam ser utilizados com maior eficácia no diagnóstico de IM e acompanhamento do risco de isquemia. Estes critérios estão demonstrados no quadro abaixo:

Quadro 1. Desempenho analítico dos ensaios de Troponina

Classificação quanto à imprecisão	CV% (no percentil 99)
Aceitável pelas diretrizes	≤ 10
Clinicamente utilizável	>10 a ≤ 20
Não aceitável	>20
Classificação dos ensaios	Valores detectáveis em indivíduos normais (%)
Nível 4 (3ª geração)	≥ 95
Nível 3 (2ª geração)	75 a < 95
Nível 2 (1ª geração)	50 a < 75
Nível 1 (ensaios contemporâneos)	<50

FONTE: Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: It's time do keep a scorecard.³²

Em linhas semelhantes, usamos uma simples designação de baixa, média e alta sensibilidade, com o termo ultrasensível (hs) reservado para ensaios que excedem os requisitos para os ensaios hs. Os ensaios de baixa sensibilidade referem-se aos ensaios cTn mais antigos, de primeira geração e já desatualizados. Estes ensaios detectavam apenas elevações marcadas de cTn e perdiam o aumento das concentrações de cTn menos pronunciado. Apple e outros propuseram designar os ensaios que estão atualmente no mercado, como ensaios contemporâneos ou como de média sensibilidade¹⁸. Estes ensaios detectam de forma confiável concentrações de cTn que excedem o percentil 99 de uma população de referência saudável, mas só podem quantificar cTn numa pequena fracção destes indivíduos. Porém, o objetivo de obter um CV menor que 10% foi alcançado apenas por uma fracção dos ensaios. Para rotular um ensaio de cTn como altamente sensível, a cTn deve ser mensurável em mais de 50% dos indivíduos saudáveis, e preferencialmente em mais de 95%. Foi designado que ensaios capazes de quantificar cTn em níveis bem abaixo das menores concentrações de cTn em indivíduos saudáveis, são ensaios classificados como ultrasensíveis.³³

Além da esperada perda na especificidade analítica, resultados obtidos a partir de diferentes sistemas analíticos e gerações de ensaios diferentes geram outro problema substancial para a conduta clínica.

1.3.2.3 Uso de Biomarcadores na revascularização miocárdica

Outro fato que necessita ser melhor investigado é o IM ou injúria do miocárdio pós-procedimento de revascularização, que pode ocorrer em alguns estágios da instrumentação que os procedimentos de revascularização mecânica requerem, tanto por ICP como CRVM. Esses procedimentos aumentam frequentemente os níveis séricos da cTn. Esse fato é limitante, pois pode mascarar um mau prognóstico nos casos de elevação assintomática de biomarcadores ligados à injúria miocárdica.¹⁴

Por esse motivo, as classificações do IM tipo 4a e 5, foram definidas arbitrariamente e não pelas evidências científicas substanciais que associa sua ocorrência a resultados adversos subsequentes: O uso isolado dos biomarcadores para detectar pequenas áreas de lesão não conseguiu identificar claramente o IM com base no padrão ouro (RMC).³⁴ Nesse cenário, o uso de RMC para confirmar ou descartar o evento parece ser apropriado.

Em 2016, uma pesquisa realizada no Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (Protocolo MASS V)³⁵ analisou a incidência de IM em 202 pacientes submetidos à revascularização percutânea ou cirúrgica do miocárdio diagnosticados pela RMC. Os pacientes foram randomizados para CRVM com circulação extracorpórea (CEC) (69; 34,1%), CRVM sem CEC (67; 33,2%), e ICP (66; 32,7%). A curva ROC foi calculada separadamente para cada grupo e mostrou os seguintes resultados:

- Precisão para cTn: 21,7%, 28,3%, e 52,4% e para CK-MB foi de 72,5%, 81,2% e 90,5%.

- Especificidade de cTnI foi de 3,6%, 9,4% e 42,1% e de CK-MB foi de 73,2%, 86,8% e 96,4%.

- Sensibilidade de cTnI foi de 100%, 100% e 100% e de CK-MB foi de 69,2%, 64,3% e 44,4%

- O melhor valor de corte de cTnI foi de 6,5 ng/mL, 4,5 ng/mL, e 4,5 ng/mL (162,5, 112,5 e 112,5 vezes o percentil 99) e de CK-MB foi de 37,5 ng/mL, 22,5 ng/mL e 11,5 ng/mL (8,5, 5,1 e 2,6 vezes o percentil 99).

Os autores concluíram que, em comparação com a ressonância magnética cardíaca, a CK-MB foi mais precisa do que cTnI para o diagnóstico de IM relacionado aos procedimentos. Estes dados sugerem que é necessário um valor de corte de troponina mais elevado para estes casos.

Infelizmente, poucos estudos estão disponíveis para orientar o médico e a comunidade científica a um consenso para padronização de ensaios de cTn.

2. OBJETIVOS

Esse projeto visa comparar três diferentes ensaios de cTnI disponíveis comercialmente, para identificar os melhores valores de corte para cada ensaio no diagnóstico do IM tipo 4a e 5, e comparar a acurácia com as dosagens de CKMB realizadas com reagentes provenientes dos mesmos fabricantes.

3. MÉTODOS

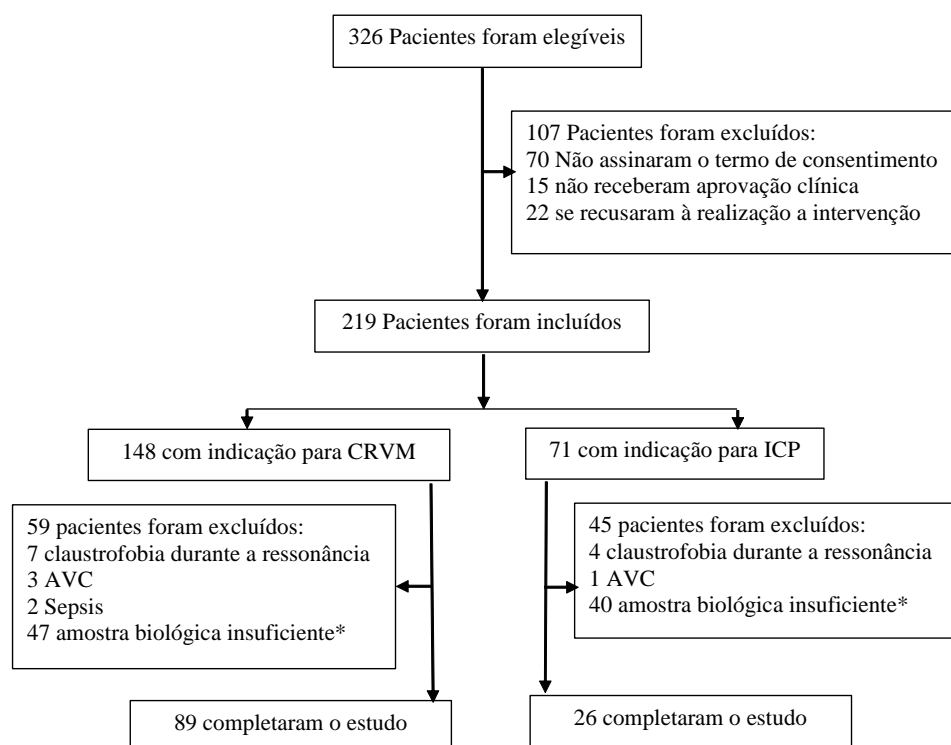
3.1 Amostragem

Esse subestudo, retrospectivo, utilizou amostras de soro provenientes do projeto MASS-V.³⁶ Os pacientes desse subestudo foram divididos em dois grupos, de acordo com o procedimento a serem submetidos, ICP ou CRVM. Os critérios para diagnóstico de IM pós-procedimento foram a elevação dos níveis de CKMB e cTnl em associação com a presença de realce tardio detectado pela RMC

3.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram determinados de acordo com a elegibilidade para cada um dos dois procedimentos (CRVM ou ICP). Sintomas de angina estabilizados e a fração de ejeção de ventrículo esquerdo preservada. Os principais critérios estão definidos na figura abaixo:

Figura 1. Diagrama do estudo



* O volume da amostra biológica, armazenada em soroteca, insuficiente para 1 ou mais dosagens de 1 ou mais tempos.

3.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- IM recente (menos de 6 meses).
- Sinais ou suspeita de infecções ou doença reumática.
- Insuficiência renal crônica.
- Embolia pulmonar ou tromboembolismo venoso recente (menos de 6 meses).
- Não assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.
- Contraindicação para utilização de inibidores de glicoproteína IIb/IIIa

- Contraindicação para realização de RMC (Ex. claustrofobia)

As coletas das amostras de sangue seriadas foram realizadas 6, 12, 24, 36, 48 horas após a ICP e estendido à 72 horas na CRVM.

Todas as amostras foram coletadas em tubo contendo gel separador e centrifugadas em 3000 ± 500 rpm por 15 minutos para obtenção de soro. A liberação de cTnI cardíaca e de CKMB foi avaliada imediatamente depois de cada procedimento, utilizando-se dos ensaios do fabricante Siemens.

Após esta dosagem, o soro foi congelado a -80 °C para posterior realização dos ensaios utilizando-se outras marcas de cTnI (Beckman e Abbott).

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Ressonância magnética cardíaca

Todos os pacientes foram submetidos à RMC com a técnica de realce tardio por gadolínio imediatamente antes do procedimento e após as intervenções, ainda durante a internação hospitalar. Foi utilizado um scanner de ressonância magnética de 1,5 Tesla (Philips Achieva[®]), com imagens adquiridas em dois eixos longos (2 e 4 câmaras) e entre oito a dez curtos do ventrículo esquerdo. O agente de contraste à base de gadolínio (Gadoterate meglumine Gd-DOTA, Guerbet SA[®], France) que foi injetado por via intravenosa (0,1 mmol por kg de peso corporal), e as imagens contrastadas adquiridas após o intervalo de 5 a 10 minutos nos mesmos planos anteriores. O

tamanho típico do voxel foi de 1,6x2, 1x8 mm, com matriz de reconstrução de 528 e tamanho de voxel reconstruído de 0,6 mm. O método de obtenção e análise da ressonância magnética cardíaca é padronizada no Instituto do Coração e reproduzido de acordo com técnicas convencionais. As imagens foram analisadas por dois observadores experientes, com a adição de um terceiro quando o consenso não era obtido inicialmente; não havendo nenhum conhecimento dos dados bioquímicos e cirúrgicos. As áreas de realce tardio pelo gadolínio foram definidas como uma intensidade de imagem maior que dois desvios-padrão acima da média das intensidades em uma região remota do miocárdio na mesma imagem e quantificadas com o programa de planimetria assistida por computador CMR42 (Circle Cardiovascular Image – Calgary - Canadá)

3.2.2 Quimiluminescência

Consiste num evento de excitação causado por uma reação química ou eletroquímica. O elemento físico da emissão de luz é similar à fluorescência pois ocorre a partir de um estado excitado e a luz é emitida quando o elétron retorna ao seu estado basal. A quimiluminescência envolve a oxidação de um composto orgânico (ex. luminol, isoluminol, ésteres de acridina ou luciferina) por um oxidante (ex. peróxido de hidrogênio, hipoclorito ou oxigênio). Estas reações ocorrem na presença de catalisadores, tais como enzimas (ex. fosfatase alcalina, peroxidase de rábano silvestre e microperoxidase) íons metálicos ou complexos metálicos (ex. ftalocianina com Cu (II) e Fe (III)) e hemina. Essas reações variam de esquemas simples, de etapa única, tais como aquelas envolvendo substratos de adamantil – 1,2 dioxietano com fosfatase alcalina,

até reações de múltiplas etapas, mais complexas que envolvem G6FDH e luciferase bacteriana, acopladas com nicotinamida adenina dinucleotídeo – flavina mononucleotídeo (NADH-FMN) oxirredutase.²²

3.2.2.1 Troponina I

Foram utilizados 3 diferentes kits para a dosagem de cTn:

Quadro 2 - Diferenças bioquímicas e de desempenho analítico dos Kits de Troponina utilizados no estudo

Ensaio	Epitopos reconhecidos pelos anticorpos utilizados no ensaio	Anticorpo e marcador	LoB (ng/L)	LoQ (ng/L)	Valor de corte no Percentil 99 (ng/L)	% da população saudável com valores detectáveis	Classificação*
Siemens Advia Centaur Tnl-Ultra®	C: 41-49, 87-91 D: 27-40	Anticorpo policlonal de cabra e éster de acridinio.	6	6	40	<32	Contemporânea
Beckman Coulter Access AccuTnl®	C: 41-49 D: 24-40	Anticorpo monoclonal de rato e fosfatase alcalina.	1,0	2,0	40	<50	Contemporânea
Abbot Architect hs-cTnl®	C:24-40 D:41-49	Anticorpo monoclonal de rato e acridinio	1,1-1,9	2,5	26,2	>65	Alta sensibilidade (hs)

* De acordo com a classificação publicada por Pet Jerolin.³⁵ LoB (limite de branco) é definido como o resultado observado de medição mais elevado de uma amostra em branco. LoQ (limite de Quantificação) é a concentração mais baixa que pode ser detectada com um CV total de 20%.

3.2.2.2 CKMB

Foram utilizadas 3 diferentes marcas de reagentes para a dosagem de CKMB massa das marcas BeckmanCoulter, Abbot e Siemens. Todos os reagentes são considerados de mesma geração.

Quadro 3 - Características imunológicas e bioquímicas dos Kits de CKMB utilizados no estudo

Marca	Anticorpo e marcador
Siemens AdviaCentaurCKMB®	Anticorpo policlonal de cabra e éster de acridinio.
Beckman Coulter Access AccuCKMB®	Anticorpo monoclonal de rato e fosfatase alcalina.
Abbott Architect CKMB ®	Anticorpo monoclonal de rato e acridinio.

FONTE: instruções técnicas dos fabricantes ^{37,38,39}

3.2 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e interquartil (IQR). A normalidade foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de qui-quadrado ou exato de Fischer foram usados para avaliação dos grupos em relação a suas proporções. Calculamos a área trapezoidal das curvas para maior entendimento sobre a correlação de suas grandezas absolutas e para esta correlação foi calculado o coeficiente r . As curvas ROC de cada ensaio foram obtidas e comparadas entre si e o método DeLong foi utilizado para determinação do melhor valor de corte. A regressão logística foi usada para análise das OR. O nível de significância adotado para

os testes estatísticos foi de 5%. O software de estatística utilizado foi o MedCalcversion 14.12.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; 2014).

3.3 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq) sob o nº SDC nº 3736/11/154. Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Os Kits para dosagens bioquímicas foram cedidos pelos respectivos fabricantes. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a declaração de Helsinque.

4. RESULTADOS

4.1 Randomização

Os pacientes foram divididos em 2 grupos, de acordo com o procedimento para o qual foram randomizados no estudo MASS-V. A distribuição, bem como os dados demográficos e clínicos, estão descritos na Tabela1.

Tabela 1 - Características, perfil demográfico e perfil clínico dos pacientes.

<i>Características</i>	<i>Total</i> (n=115)	<i>CRVM</i> (n = 89)	<i>ICP</i> (n = 26)	<i>P</i>
Perfil Demográfico				
Idade, anos	62±9	62 ± 9	61 ± 9	0,7434
Mulheres, %	38	29 (33%)	9 (35%)	0,9655
Histórico clínico				
IM prévio, %	44	29 (33%)	15 (58%)	0,0368
Diabetes mellitus, %	63	57 (64%)	6 (23%)	0,0005
Dados laboratoriais				
Colesterol total, mg/dL	169±49	163±50	187 ± 42	0,0328
LDL colesterol, mg/dL	98±44	93 ±45	113 ± 37	0,0511
HDL colesterol, mg/dL	40±13	40±12	41 ± 12	0,6910
Triglicérides, mg/dL	117 (102-132)	113 (92-128)	140 (100-170)	0,1127
Creatinina, mg/dL	1,04 (0,98-1,08)	1,06 (1,01-1,10)	0,92 (0,86-1,06)	0,0290
PCR, mg/L	3,34 (2,65-3,63)	3,15 (2,26-3,59)	3,85(3,08-5,60)	0,1472
Hemoglobina, g/dL	14,2±1,6	14,2±1,6	14,2 ±1,9	0,9117
Achado angiográficos				
FEVE %	64±9	64±10	62 ± 7	0,2786
IM pós procedimento				
(Tipo 4a e 5) %	21(18,3%)	16 (21,3%)	5 (5,2%)	0,8863

IM: infarto do miocárdio; FEVE: fração de ejeção de ventrículo esquerdo

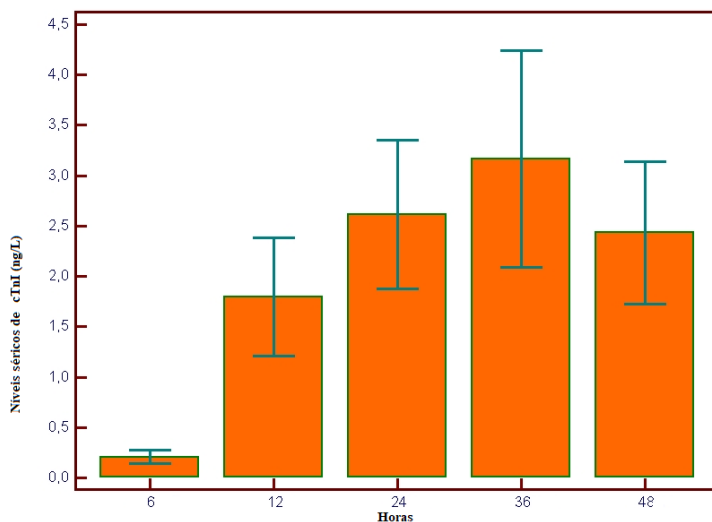
4.2 Determinação dos biomarcadores

Foram realizadas as dosagens de CKMB e cTnI, utilizando as 3 diferentes marcas de kits (Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI®) de todas as coletas seriadas previstas (6, 12, 24 e 48 horas após a ICP e estendido até 72 horas após a CRVM) de 115 pacientes. Destes, 21(18,3%) apresentaram nova área de necrose miocárdica confirmada pela ressonância magnética, onde em 5 (5,2%) deles o infarto foi tipo 4a e 16 (21,3%) o infarto foi tipo 5.

As figuras 1 e 2 mostram o comportamento dos níveis séricos de cTnI nos 3 diferentes tipos de ensaio. Os três ensaios tiveram desempenho semelhante com valores de pico em 36 horas nos pacientes submetidos à CRVM. Para os pacientes submetidos à ICP, os ensaios contemporâneos (AdviaCentaurTnI-Ultra® e Beckman Coulter Access AccuTnI®) mostraram valores de pico também em 36 horas, porém para o teste classificado como de Alta-sensibilidade (Abbott Architect hs-cTnI®) este pico foi em 48 horas.

Figura 2. Valores de cTnI em relação ao tempo das marcas Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI® em pacientes submetidos à intervenção coronária percutânea.

A. Siemens AdviaCentaurTnI-Ultra®



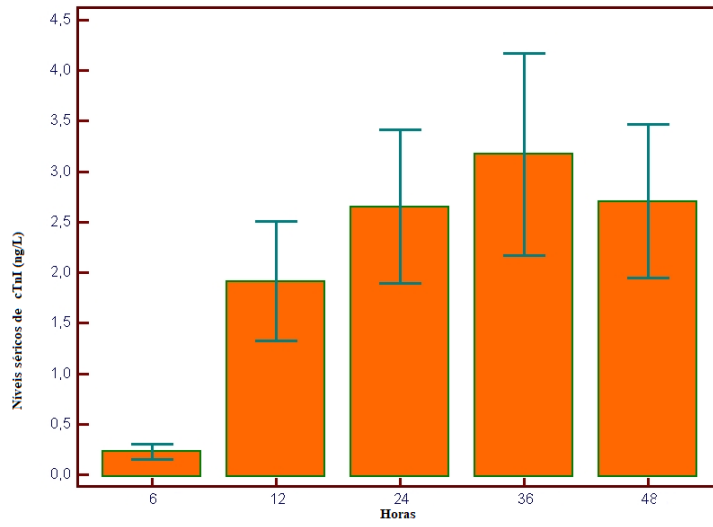
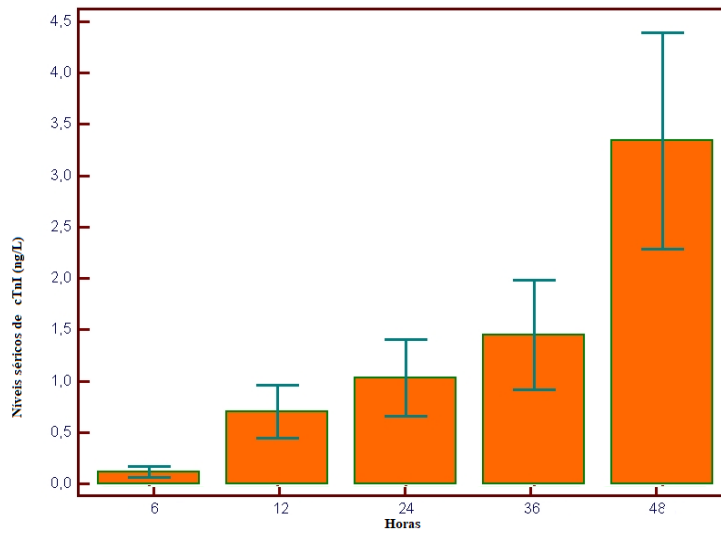
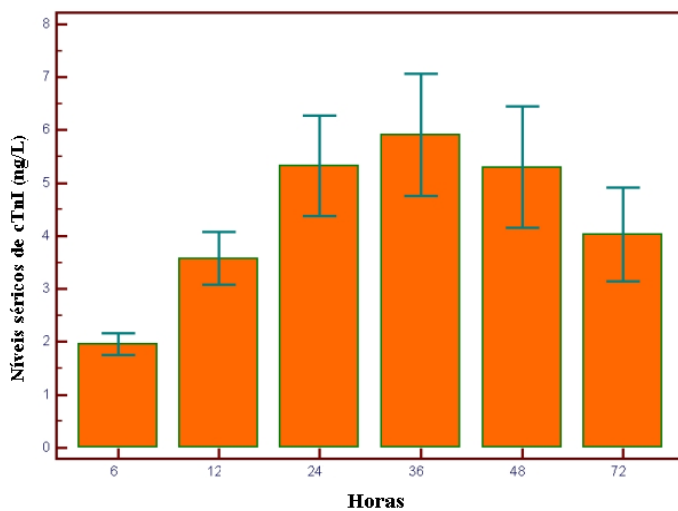
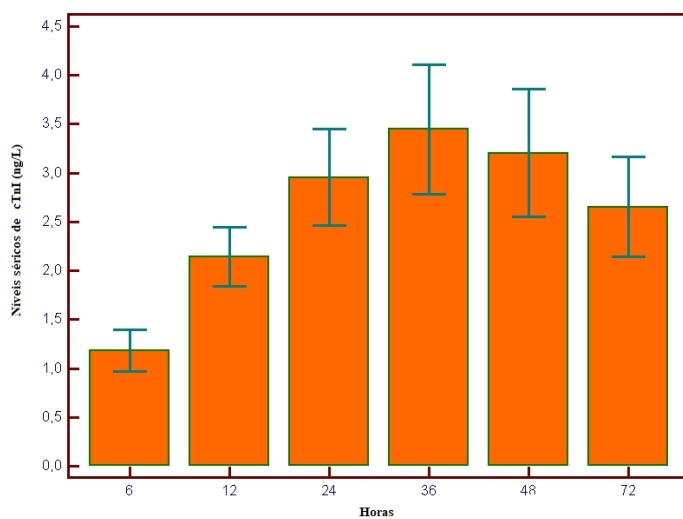
B. Beckman Coulter Access AccuTnl®**C. Abbott Architect hs-cTnI®**

Figura 3. Valores de cTnI em relação ao tempo das marcas Siemens-AdviaCentaurTnI-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnI® e Abbott Architect hs-cTnI® em pacientes submetidos à revascularização miocárdica cirúrgica.

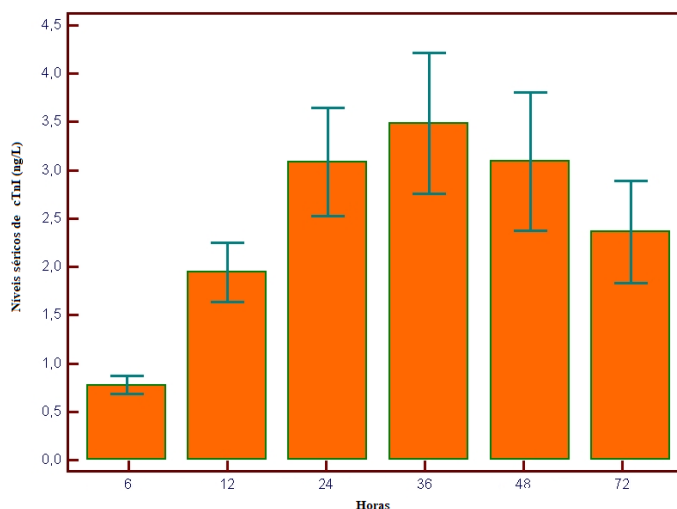
A. Siemens AdviaCentaurTnI-Ultra®



B. Beckman Coulter Access AccuTnI®



C. Abbott Architect hs-cTnI®



Analizamos os valores absolutos de cada pico e sua elevação em relação ao valor de corte do percentil 99 (tabela 2). Para os testes contemporâneos o valor de corte, definido pelos fabricantes é de 40 ng/L e o pico de elevação foi em 36 horas. No caso do ensaio de alta-sensibilidade (Abbott Architect hs-cTnI®), o valor de corte, definido pelos fabricantes é de 26,2 ng/L. O pico de valores de cTnI para pacientes submetidos à ICP foi em 48 horas e para os submetidos à CRVM foi em 36 horas. Estes dados demonstram que, além de prolongar a curva de elevação na intervenção percutânea os valores absolutos foram maiores que na cirurgia, contrariando o previsto na Quarta definição universal de IM.

Tabela 2 – Valores de corte de cTnI, no pico de elevação, em pacientes submetidos à ICP e CABG.

Ensaio	ICP (ng/L)	Elevação do limite superior do percentil 99	CRM (ng/L)	Elevação do limite superior do percentil 99
Siemens -AdviaCentaurTnI-Ultra®	2560	64 vezes	4830	121 vezes
Beckman Coulter Access AccuTnI®	3987	100 vezes	2750	69 vezes
Abbott Architect hs-cTnI®	5670	216 vezes	2345	90 vezes

Apesar das grandezas absolutas apresentarem-se bem diferentes entre os 3 ensaios, tanto para cTnI e CKMB apresentaram o mesmo comportamento com correlação significativa entre elas. O ensaio da Siemens apresentou áreas sob as curvas trapezoidais de 112,5 (95%IC 71,5-231,2) e 678,8 (95%IC 581,3-828,1) para cTnI e CKMB, respectivamente. O ensaio da Beckman apresentou áreas sob as curvas trapezoidais de 50,23 (95%IC 41,6-75,4) e 640,8 (95%IC 523,6-829,0) para cTnI e CKMB, respectivamente. E o ensaio da Abbott apresentou áreas sob as curvas trapezoidais de 58,0 (95%IC 43,1-76,5) e 575,9 (95%IC 500,0-642,9) para cTnI e CKMB, respectivamente. Os coeficientes de correlação r obtidos foram bem robustos, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Correlação das áreas sob as curvas trapezoidais.

Ensaio	Troponina		CKMB	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Siemens - AdviaCentaurTnl-Ultra® vs Beckman Coulter Access AccuTnl® Siemens - AdviaCentaurTnl-Ultra® vs Abbott Architect hs- cTnl® Abbott Architect hs-cTnl® vs Beckman Coulter Access AccuTnl®	0,9281	<0,0001	0,9631	<0,0001
	0,8908	<0,0001	0,9746	<0,0001
	0,9378	<0,0001	0,9799	<0,0001

Os dados da regressão logística ajustados pela presença de diabetes, idade, fração da ejeção do ventrículo esquerdo, valores de pico de CKMB e IM prévio, (tabelas 4 e 5), demonstraram que os três ensaios de cTnl associaram-se ao infarto Tipo 4a e Tipo 5. Porém, quando analisados conjuntamente, na presença dos mesmos ajustes, o ensaio da Beckmam apresentou associação ao infarto tipo 4a (OR 2,2, 95%IC 1,06-4,43, p= 0,0336).

Tabela 4 - Capacidade diagnóstica do biomarcador (cTnI) como preditor independente de Infarto pós-procedimento de revascularização miocárdica cirúrgica.

Ensaio	OR	95% CI	p
Siemens -Advia Centaur TnI- Ultra®	1,16	1,05-1,29	0,0038
Beckman Coulter Access AccuTnI®	1,42	1,05-1,91	0,0228
Abbott Architect hs-cTnI®	1,22	1,01-1,47	0,0404

Tab
ela
5 -
Cap
acid
ade
diag
nósti
ca
do
bio
marcador (cTnI) como preditor independente de Infarto pós procedimento de Intervenção Coronária Percutânea.

Ensaio	OR	95% CI	p
Siemens -Advia Centaur TnI- Ultra®	1,62	1,03-2,53	0,001
Beckman Coulter Access AccuTnI®	2,16	1,06-4,43	0,002
Abbott Architect hs-cTnI®	1,99	1,03-3,81	0,002

A

tabela 6 mostra a análise das curvas ROC para IM Tipo 4a (pós ICP) (Figura 4) e a tabela 7 mostra a análise das curvas ROC para IM Tipo 5 (pós CRVM) (Figura 4).

Figura 4. Comparativo das Curvas ROC entre Siemens-AdviaCentaurTnl-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnl® e Abbott Architect hs-cTnl®, utilizando os valores de pico.

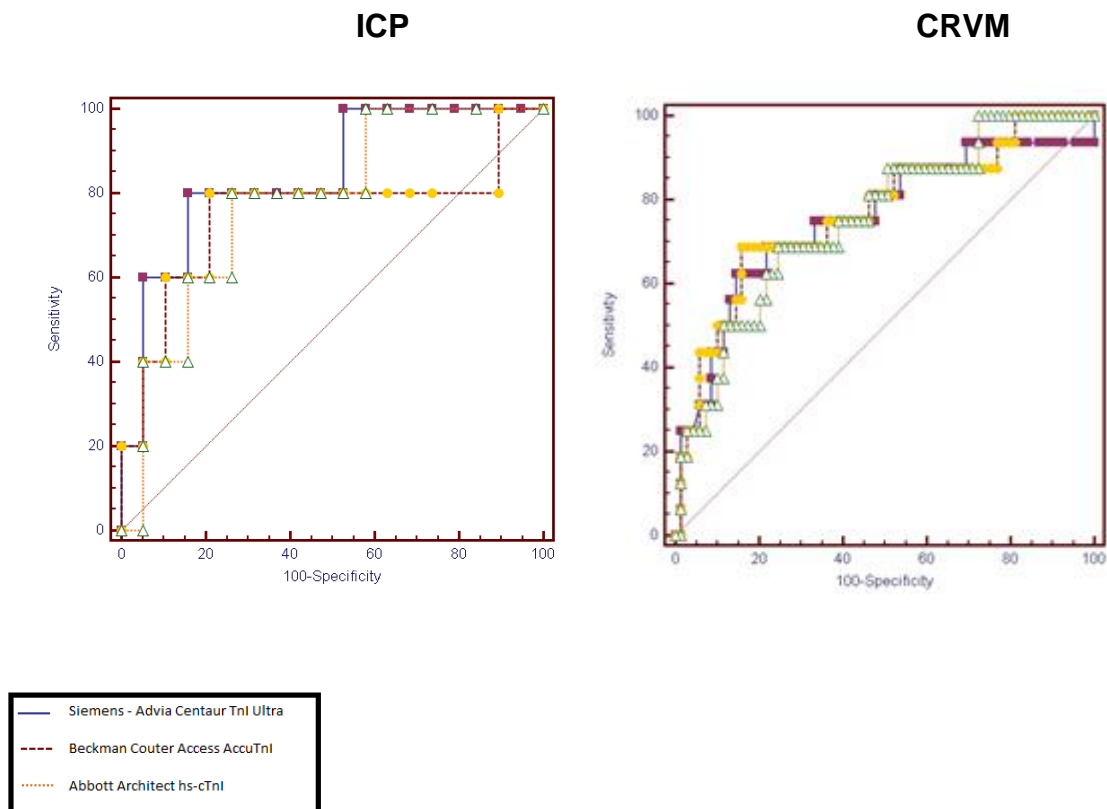


Tabela 6-Comparativo das Curvas ROC entre Siemens-AdviaCentaurTnl-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnl® e Abbott Architect hs-cTnl®, utilizando os valores de pico. (ICP)

Ensaio	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC	IC 95%	Melhor Cut-of (ng/L)	p
Siemens-AdviaCentaurTnl-Ultra®	80	76,2	0,842	0,636 – 0,957	2560	0,0067
Beckman Coulter Access AccuTnl®	75	95	0,747	0,530 – 0,901	3987	0,0274
Abbott Architect hs-cTnl®	80	73,7	0,779	0,564 – 0,921	5670	0,0345

Tabela 7- Comparativo das Curvas ROC entre Siemens-AdviaCentaurTnl-Ultra®, Beckman Coulter Access AccuTnl® e Abbott Architect hs-cTnl®, utilizando os valores de pico. (CRVM)

Ensaio	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC	IC 95%	Melhor Cut-of (ng/L)	p
Siemens-AdviaCentaurTnl-Ultra®	62,5	86,3	0,745	0,649 – 0,841	4830	0,0006
Beckman Coulter Access AccuTnl®	68,7	64,1	0,766	0,662 – 0,851	2750	0,0002
Abbott Architect hs-cTnl®	68,7	75,4	0,753	0,647 – 0,840	2345	0,0001

A tabela 8 mostra as diferenças entre as curvas ROC de cada ensaio. Para o diagnóstico de ICP, a maior AUC (0,842; IC 95%:0,636-0,957) foi a do ensaio da Siemens, o qual foi similar a AUC da Abbott ($p=0,31$), mas não similar à da Beckman ($p= 0,0177$). Já para a CRVM, a maior AUC (0,766; IC 95%:0,662-0,851) para o ensaio da Beckman e as três marcas foram similares entre si (Beckman vs da Abbott: $p=0,47$ e Beckman vs Siemens: $p= 0,81$)

Tabela 8 - Diferenças entre as Curvas ROC dos ensaios de cTnI.

Ensaio	ICP <i>p</i>	CRVM <i>p</i>
Siemens -AdviaCentaurTnI-Ultra® vs Beckman Coulter Access AccuTnI®	0,0177	0,8079
Siemens -AdviaCentaurTnI-Ultra® vs Abbott Architect hs-cTnI®	0,3068	0,9773
Abbott Architect hs-cTnI® vs Beckman Coulter Access AccuTnI®	0,6151	0,4683

Observou-se baixa acurácia dos ensaios para o diagnóstico de IM tipos 4a e 5, quando usados os valores sugeridos pelas diretrizes atuais para o IM. Dentre os 3 ensaios a hs-cTnI foi a que apresentou pior desempenho. A análise da curva ROC para cada ensaio sugeriu valores muito superiores aos atualmente utilizados (Tabela 9).

Quando ajustado para os novos valores de corte, a acurácia dos 3 ensaios de cTnI melhora significativamente aproximando-se da acurácia da CKMB observada do estudo MASS V.

Tabela 9. Acurácia dos ensaios utilizando os valores de corte preconizados pelo fabricante (VF), pelas diretrizes atuais (VD) para o diagnóstico de IM tipos 4a e 5 e os valores sugeridos (VS) pela análise da curva ROC.

Ensaio	VF (percentil 99) (ng/L)	VD IM 4a (ng/L)	VD Acurácia (%)	VS IM 4a (ng/L)	VS Acurácia (%)	VD IM 5 (ng/L)	VD Acurácia (%)	VS IM 5 (ng/L)	VS Acurácia (%)
Siemens	40	200	52	2560	79	400	31	4830	82
Beckman	40	200	52	3987	88	400	26	2750	82
Abbott	26,2	131	24	5670	87	261	24	2345	82

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou que os valores de corte são muito mais altos do que o proposto pelo consenso atual e pelos fabricantes, independentemente do método utilizado. Porém, com os valores de corte ajustados, a acurácia da cTn diagnóstico de IM tipos 4a e 5 no nosso estudo foi próxima à observada para a CKMB no estudo MASS-V.

Para a hs-cTnI, esta informação já está amplamente discutida em muitos artigos recentemente publicados. Omhan et al. encontrou valores de corte de cerca de 53,4% mais altos que o preconizado pelo consenso quando associados à repetidas revascularizações por ICP e valores de mais de 500 vezes o percentil 99 dentro de 48 horas após a CRVM.⁴⁰ O ensaio de hs-cTnI utilizado foi o da marca da Architect STAT- High Sensitivity (Abbott), o mesmo do nosso estudo, com 4684 pacientes randomizados, de janeiro de 2013 a maio de 2019. O valor de corte no pico em 48hs foi maior que 13.000 ng/L (500 vezes percentil 99), associado à revascularização repetida.

Os nossos resultados do ensaio de alta sensibilidade mostraram que, além de apresentar um pico mais tardio para a ICP (48 horas), também apresentou uma elevação 227 vezes maior que o limite superior no percentil 99.

O ensaio da hs-cTnI apresentou acurácia inferior aos testes contemporâneos para o diagnóstico de IM tipos 4a e 5. Segundo Apple et al,⁴¹ a razão mais comum para a discrepância nas dosagens de hs-cTnI foi a

diferença nos epítomos específicos para os anticorpos, nos diferentes ensaios, além da utilização de diferentes anticorpos mono- e policlonais. Também sabemos que as dosagens de cTn são influenciadas por múltiplos fatores como a degradação proteolítica, fosforilação e complexação com outras moléculas tais como troponina C, heparina, auto Ac heterófilos circulantes.

Quadro 3 - Comparativo analítico de ensaios de cTnI contemporâneos e de alta sensibilidade.

Hs-cTnI Kit	Limite de detecção (ng/L)	Percentil 99 (ng/L) / CV (%)	Valor mínimo com CV de 10%
Roche Elecsys	5,0	14/13	13
Abbott Architect	1,2	16/5,6	3,0
Beckman Access	2 a 3	8,6/10	3,0
Mitsubishi Pathfast	8,0	29/5	14
Nanosphere	0,2	2,8/9,5	0,5
Radiometer AQT90	9,5	23/17,5	39
Singulex Erenna	0,09	10,1/9,0	0,88
Siemens Vista	0,5	9/5,0	3
Siemens Centaur	6,0	40/10	30

Fonte: Sherwood MV, et al. High sensitivity troponin assays: Evidence, Indications and reasonable use. JAHA. 2016⁴². *criado com dados de Jaffet , et al e Apple, et al

No Quadro 3 podemos ver a grande variedade de características dos ensaios entre os fabricantes. Esse é um dos desafios do advento dos testes de troponina de alta sensibilidade.

A interpretação dos valores de cTnI depende diretamente do limite superior de referência. O percentil 99 é calculado com base em resultados de pacientes de população saudável em geral. Esta referência pode ser bastante subjetiva quando analisamos os valores de hs-cTnI pós-procedural. Além disso, cada fabricante estabelece este valor para cada ensaio. De acordo com as instruções de uso do fabricante, percebemos que há pouca consistência entre o tipo e o n^o de indivíduos envolvidos na determinação do percentil 99. A estatística utilizada também não é clara, assim como a definição do que seria um indivíduo saudável.

Aakre, et al.⁴³ concluiu, após analisar as metodologias para determinação do percentil 99 dos principais fabricantes, que a necessidade de padronização é urgente. Sugere que esta padronização seja iniciada por uma rigorosa triagem clínica e analítica dos indivíduos selecionados. Além disso, concluiu também que o número de pacientes incluídos, o reconhecimento dos fatores pré-analíticos, analíticos e biológicos que afetam o ensaio e manejo estatístico adequado, também podem afetar as estimativas.

Apesar destas grandezas absolutas tão discrepantes, quando calculamos a área trapezoidal das curvas de cada ensaio e as comparamos, os ensaios tiveram uma ótima correlação entre si, demonstrando assim não impactar nos diagnósticos de IM.

Este estudo possui algumas limitações, principalmente o fato de haver pouca amostra sérica disponível para realizar as dosagens em todos os 202 pacientes do estudo MASS-V.

6. CONCLUSÃO

A transição do ensaio de cTnI contemporâneo para o de alta sensibilidade requer mais do que uma atualização dos valores de corte. É também necessário avaliar e validar minuciosamente as características analíticas do ensaio utilizado, considerando a perda de acurácia. Esse estudo mostrou que cada ensaio, contemporâneo ou de alta sensibilidade, possuem valores de corte diferentes para o diagnóstico de IM 4a e 5. Portanto, essas particularidades dos diversos ensaios devem constar das diretrizes das SCA.

7. REFERÊNCIAS

- 1 GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-1858.
- 2 Mansur AP, Favarato D. Cardiovascular and Cancer Death Rates in the Brazilian Population Aged 35 to 74 Years, 1996-2017. *Arq Bras Cardiol*. 2021;117(2):329-340.
- 3 Siqueira ADE, Siqueira AG, Land MGP. Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. *Arq Bras Cardiol*. 2017;109(1):39-46.
- 4 GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117-171.
- 5 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999, 340(2):115-126.
- 6 Álvarez-Álvarez MM, Zanetti D, Carreras-Torres R, Moral P, Athanasiadis G. A survey of sub-Saharan gene flow into the Mediterranean at risk loci for coronary artery disease. *Eur J Hum Genet*. 2017(4):472-476.

7 Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T, Agewall S, Dickstein K, Edvardsen T, Escaned J, Gersh BJ, Svitil P, Gilard M, Hasdai D, Hatala R, Mahfoud F, Masip J, Muneretto C, Valgimigli M, Achenbach S, Bax JJ; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-477.

8 Cesar LA, Ferreira JF, Armaganijan D, Gowdak LH, Mansur AP, Bodanese LC, et al. Diretriz de Doença Coronária Estável. *Arq Bras Cardiol* 2014; 103(2Supl.2): 1-59.

9 Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Jüni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferovic PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019 J;40(2):87-165.

10 Oliveira GMM, Brant LCC, Polanczyk CA, Biolo A, Nascimento BR, Malta DC, Souza MFM, Soares GP, Xavier Junior GF, Machline-Carrion MJ, Bittencourt MS, Pontes Neto OM, Silvestre OM, Teixeira RA, Sampaio RO, Gaziano TA, Roth GA, Ribeiro ALP. Cardiovascular Statistics - Brazil 2020. *Arq Bras Cardiol*. 2020 ;115(3):308-439. English, Portuguese.

11 The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee; Myocardial infarction redefined a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2000; 21:1502–1513.

12 Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Joint ESC/ACC/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28:2525–2538

13. Third universal definition of myocardial infarction. Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). *Eur Heart J* 2012;33:2551–2567.

14 Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(18):2231-2264.

15 Guyton A. C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 7a ed. Ed Guanabara Koogan. RJ; 1986.

16 Herrmann J. Peri-procedural myocardial injury: 2005 update. *Eur Heart J*. 2005;26(23):2493-2519.

17 Bahrmann P, Werner GS, Heusch G, et al. Detection of coronary microembolization by Doppler ultrasound in patients with stable angina pectoris undergoing elective percutaneous coronary interventions. *Circulation*. 2007;115(5):600-608.

18 Ferguson TB Jr, Coombs LP, Peterson ED. Internal thoracic artery grafting in the elderly patient undergoing coronary artery bypass grafting: room for process improvement?. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123(5):869-880.

-
- 19 Karmen A, Wroblewski F, Laude JS. Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1955; 43(1):123-131.
- 20 Dreyfus JC, Schapira G, Demon J. Study of serum creatine kinase in myopathic patients and their families. *Rev Fr Estud Clin Biol* 1960; 5:384-386.
- 21 Bessman SP, Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:831-862.
- 22 Apple FS. High sensitivity cardiac troponin for screening large populations of healthy people: is there risk? *Clin. Chem.* 2011; 57(4):537-539
- 23 Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia. PA; Saunders: Elsevier, 2011.
- 24 Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991; 83(3):902-912.
- 25 Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac specific Troponin I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1987; 113:1333-1344
- 26 Apple FS, Collinson PO. Analytical Characteristics of High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays. *Clin Chem* 2012; 58(1): 54-61.
- 27 Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Fundamentos da Química Clínica*. 6a ed. Ed Guanabara Koogan. RJ. 2011

28 Gaze DC, Collinson PO. Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. *Ann Clin Biochem* 2008;45:349-355.

29 Panteghini MD, The Measurement of Cardiac Markers. Where Should We Focus? *Am J Clin Pathol* 2002;118:354-361

30 Wu AH, Christenson RH. Analytical and assay issues for use of cardiac troponin testing for risk stratification in primary care. *Clin Biochem* 2013;46:969–978.

31 Fraser Cg, et. al. Desirable standards for laboratory testes if they are fulfill medical needs. *Clin Chem*, 1993; 39:1447-1453.

32 Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard. *Clin Chem*. 2009 Jul;55(7):1303-1306.

33 Jarolim P. High sensitivity cardiac troponin assays in the clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(5): 635–652.

34 Testa L, VanGaal WJ, Biondizoccai GG, et al. Myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: a metanalysis of troponin elevation applying the new universal definition. *QJM* 2009;102:369–378.

35 Hueb W, Gersh BJ, Costa LMA, Oikawa FTC, Melo RMV, Rezende PC, et al. Accuracy of Myocardial Biomarkers in the Diagnosis of Myocardial Infarction After Revascularization As Assessed by Cardiac Ressonance: The

Medicine, Angioplasty, Surgery Study V (MASS-V) Trial. *Ann Thorac Surg.*

Elsevier 2016; 101(6):2202-2208

36 Rezende PC, Hueb W, Bocchi EA, et al. Hypotheses, rationale, design, and methods for prognostic evaluation of a randomized comparison between patients with coronary artery disease associated with ischemic cardiomyopathy who undergo medical or surgical treatment: MASS-VI (HF). *Trials.* 2020;21(1):337.

37 CKMB Acces Immunoassay Systems. Beckman Coulter, Inc. 2010

38 STAT-CKMB Architect Systems. Abbott Laboratories. 2013

39 CKMB. Advia Centaur Xp, XPT, Immunoassay Systems. Siemens Healthcare Diagnostics. 2018

40 Omran H, Deutsch MA, Groezinger E, Zittermann A, Renner A, Neumann JT, Westermann D, Myles P, Ramosaj B, Pauly M, Scholtz W, Hakim-Meibodi K, Rudolph TK, Gummert J, Rudolph V. High-sensitivity cardiac troponin I after coronary artery bypass grafting for post-operative decision-making. *Eur Heart J.* 2022;43(25):2388-2403.

41 Apple FS, Collinson P.O. Analytical Characteristics of High Sensitivity Cardiac Troponin Assay. *Clinical Chemistry* 2012; 58:54-61.

42 Sherwood MW, Kristin Newby L. High-sensitivity troponin assays: evidence, indications, and reasonable use. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(1):e000403

43 Aakre KM, Saenger AK, Body R, et al. Analytical Considerations in Deriving 99th Percentile Upper Reference Limits for High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays: Educational Recommendations from the IFCC Committee on Clinical Application of Cardiac Bio-Markers. *Clin Chem.* 2022;68(8):1022-1030.