

¿El test kSORT es adecuado para detectar a los pacientes trasplantados renales con riesgo alto de rechazo agudo?

Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, Hsieh S, Dai H, Bestard O, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: Results of multicenter AART study. PLoS Med 2014;11(11):e1001759.

Análisis crítico: **Ingrid V. Raoch, Sara Jiménez, Nieves Plana-Farrás, Roberto Marcen, Carlos Quereda**

Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

NefroPlus 2015;7(1):42-6

■ Tipo de diseño y seguimiento

- Estudio transversal multicéntrico realizado entre febrero de 2005 y el 15 de diciembre de 2012.

■ Ámbito



Ocho centros trasplantadores renales en Estados Unidos, México y España.

■ SELECCIÓN DE PACIENTES

Se usaron 538 muestras de sangre periférica, obtenidas durante las citas de control, de 436 adultos y 116 niños trasplantados renales.

Los pacientes pediátricos provenían de un estudio clínico iniciado previamente.

Definieron la corte de población pediátrica como los menores de 20 años y la de adultos como ≥ 20 años.

Las muestras fueron incluidas si se obtenían antes de intensificar el tratamiento inmunosupresor.

Los receptores eran de diversas edades, ambos sexos, con tratamientos inmunosupresores diferentes y acordes a los protocolos de trasplante renal de cada centro, independientemente de las comorbilidades y del riesgo inmunológico.

Incluyeron injertos de donante vivo y de cadáver.

Todos los resultados fueron comparados con la biopsia del injerto realizada contemporáneamente ante la sospecha de rechazo agudo.

No queda claro si las muestras se obtuvieron consecutivamente o de manera aleatoria, salvo en la última fase, en la que se realizó de manera consecutiva.

Sin embargo, no diseñaron un estudio de casos y controles, ni parece que hubieran realizado exclusiones inapropiadas que comprometieran la capacidad diagnóstica de la prueba.

En consecuencia, no queda claro que la selección de pacientes no haya introducido sesgos en el estudio. Sin embargo, existe un bajo riesgo de que los pacientes incluidos no correspondan o encajen con la pregunta de la revisión.

■ INDEX TEST

La expresión genética fue analizada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (QPCR) en un solo centro.

El diseño y validación del Kidney Solid Organ Response Test (kSORT) se consiguió en varias fases.

Los investigadores en estudios previos habían identificado 43 genes relacionados con el rechazo agudo renal¹, de los cuales 10 habían sido validados con potencial discriminatorio en el rechazo agudo en un grupo de pacientes pediátricos.

En una primera fase, realizaron la selección de los genes y la puesta a punto del experimento. Evaluaron la capacidad de los 10 genes para clasificar el rechazo agudo en una cohorte de 143 muestras provenientes solo de adultos (AART143). Y para mejorar la capacidad diagnóstica incluyeron 7 genes más.

En una segunda fase, los 17 genes fueron validados en una cohorte independiente de muestras sanguíneas de adultos y niños y los resultados se compararon con la biopsia renal correspondiente (AART124).

En la tercera fase, debido a la heterogeneidad de las muestras de las cohortes AART, a las diferencias en el manejo de las muestras y de las comorbilidades entre los grupos de adultos y niños, los investigadores decidieron desarrollar un algoritmo sobre la plataforma Applied Biosystems, *kSORT analysis suite* (kSAS), que permite identificar un solo modelo de 14 de los 17 genes. Fue validado en una cohorte constituida por 100 muestras de adultos y niños (AART100). Las 100 muestras se aleatorizaron del grupo AART143.

Definieron 13 modelos de 12 genes que proporcionaban diferentes *scores*. Para conseguir un *score* numérico de riesgo de rechazo agudo para cada paciente realizaron un análisis de riesgo agregado restando el número de veces que un paciente fue clasificado como no rechazo agudo al número de veces que fue clasificado como rechazo agudo. Los *scores* combinados de kSORT en las muestras clasificadas como rechazo agudo fueron significativamente más altos que los del grupo de no rechazo agudo.

Al no indicar cómo ni por qué fueron seleccionados los 21 pacientes de la cohorte AART143 que fueron incluidos en la cohorte AART100, es difícil determinar si existe o no un riesgo de introducción de sesgos.

Por último, en la cuarta fase, mediante un estudio longitudinal prospectivo se realiza una segunda validación con carácter predictivo del rechazo agudo del test kSORT, a partir de 191 muestras de pacientes adultos y pediátricos, obtenidas de manera consecutiva desde seis meses antes, durante y tras el rechazo agudo (figura 1).

El hecho de que las muestras sanguíneas fueran remitidas y procesadas en un solo centro y las biopsias renales en el centro de donde provenía cada paciente probablemente impidió que los resultados del test se interpretaran con el conocimiento a priori de la prueba estándar.

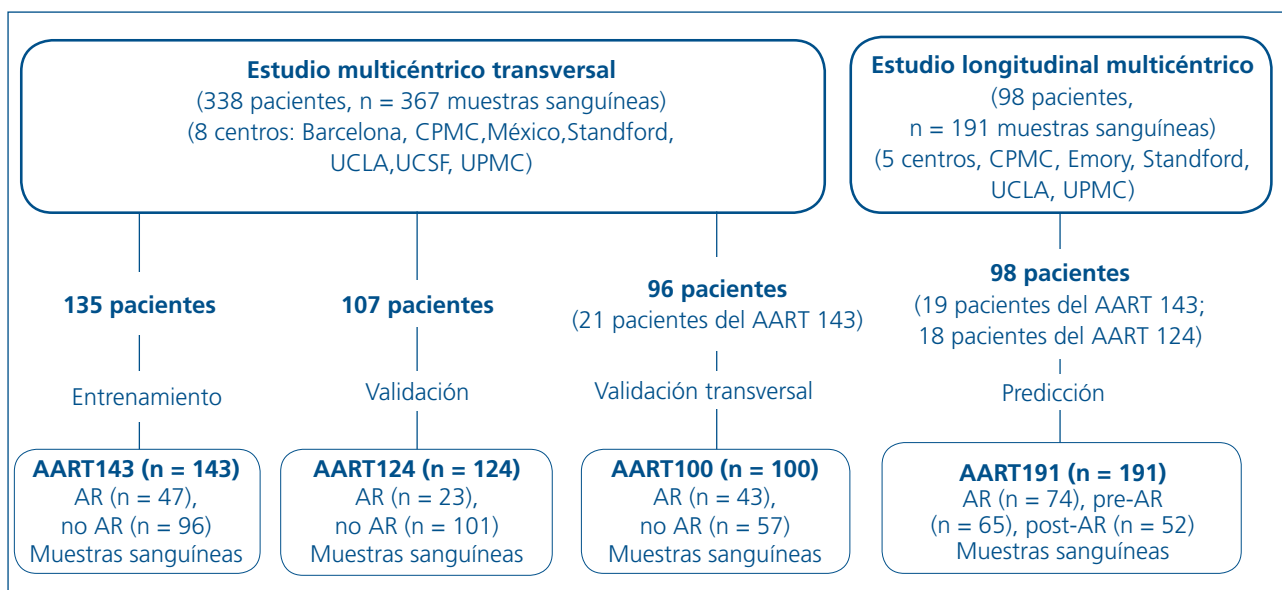


Figura 1. Análisis de 558 muestras de 436 pacientes en el estudio AART (flujo paciente/muestra).

Sin embargo, existe un riesgo alto de sesgos debido a que el desempeño del test puede ser peor al utilizar muestras independientes de pacientes.

Adicionalmente, podría haber un riesgo de sesgo por utilizar diferentes métodos de recolección de las muestras en cada centro (en tubos de PAXgene blood RNA, en tubos de Ficol para aislar linfocitos y en tubos de heparina de litio para aislar células mononucleares).

■ REFERENCIA ESTÁNDAR

Todas las muestras fueron comparadas con el patrón de oro para diagnosticar el rechazo agudo, que es la biopsia renal, definiendo en cada cohorte dos grandes grupos, según los resultados de la biopsia del injerto, en rechazo agudo y no rechazo agudo.

En el grupo pediátrico las biopsias fueron indicadas por protocolo, y las muestras sanguíneas obtenidas en el momento de la sospecha de disfunción del injerto y a los 3, 6, 12 y 24 meses postrasplante.

En la cohorte de adultos la mayoría fueron indicadas por presentar una clínica compatible con rechazo, salvo en los pacientes de Barcelona, que realizaron una biopsia por protocolo al sexto mes postrasplante.

Cada biopsia fue interpretada por el patólogo del centro correspondiente, utilizando los criterios de la última clasificación de Banff para injertos renales.

La cohorte de rechazo agudo incluyó tanto el rechazo humoral como el celular y fue definida con un score Banff ≥ 1 de infiltrado tubular o intersticial agudo o lesiones glomerulares y en capilares peritubulares con tinción difusa y positiva para C4d (rechazo agudo humoral).

La cohorte de no rechazo agudo fue definida como la ausencia de cualquier evidencia histológica de rechazo agudo. Este grupo incluyó, además, biopsias que mostraron criterios de lesión crónica, toxicidad por anticalcineurínicos, infección por poliomavirus BK y otras lesiones como necrosis tubular aguda (40 pacientes).

Diecinueve fueron clasificadas como rechazo humoral y el resto como mediadas por células o rechazo de origen mixto si la tinción C4d era negativa, pero se identificaban anticuerpos donante específicos.

Con relación a si la biopsia renal pudo inducir sesgos, se debe decir que, aunque hay un importante esfuerzo por parte de los investigadores por unificar la forma de interpretar los resultados, es imposible obviar la variable interobservador que origina el hecho de que cada muestra fue analizada por el patólogo de cada centro participante, y esto le confiere un alto riesgo de introducir sesgos.

Aunque está bastante claro que el análisis de los resultados del test se realizó sin tener conocimiento previo de los resultados de la biopsia, hay dudas con relación a que los resultados puedan variar según el criterio del observador.

■ INCLUSIÓN Y CONCORDANCIA EN TIEMPO

Todas las muestras sanguíneas fueron comparadas con la biopsia renal contemporánea del paciente correspondiente, salvo por la inclusión de 12 muestras recogidas antes y después del rechazo y 13 muestras de pacientes clínicamente estables (sin aumento de creatinina, con anticuerpos donante específico negativos y sin rechazo en los primeros tres meses postrasplante).

Definen bien los tiempos de intervalo entre la toma de la muestra y la biopsia renal, así como los tiempos de seguimiento.

Una de las dos muestras mal clasificadas por kSORT en el grupo de rechazo agudo presentaba un daño crónico severo.

Además, existe una falta de concordancia en el número de los pacientes incluidos que al inicio del artículo se indica (436) y los que se indican en la tabla de resultados (378), sin haber hecho referencia en ningún momento a la exclusión de alguno, lo cual le confiere un alto riesgo de incluir sesgos en el test.

■ RESULTADOS

Los resultados del estudio se resumen de forma adecuada en la tabla 1.

Tabla 1. Performance of kSORT in the AART143, AART124, and AART100 cohorts

Statistics	kSORT Predictions					
	AART143 (Training Set)		AART124 (Validation Set)		AART100 (Cross-Validation Set)	
	AR	No-AR	AR	No-AR	AR	No-AR
Real Results						
AR	39	8	21	2	36	3
No-AR	9	87	1	100	3	43
Sensitivity (95% CI)	82.98% (69.19%–92.35%)		91.30% (71.96%–98.93%)		92.31% (79.13%–98.38%)	
Specificity (95% CI)	90.63% (82.95%–95.62%)		99.01% (94.61%–99.97%)		93.48% (82.1%–98.63%)	
PPV (95% CI)	81.25% (68.06%–89.81%)		95.46% (78.20%–99.19%)		93.21% (79.68%–97.35%)	
NPV (95% CI)	91.58% (84.25%–95.67%)		98.04% (93.13%–99.46%)		93.48% (82.45%–97.76%)	
AUC (95% CI)	0.94 (0.91–0.98)		0.95 (0.88–1.00)		0.92* (0.86–0.98)	

*AUC was calculated based on kSORT scores for n = 100 patients including high risk for AR (n = 39), low risk for AR (n = 46), and indeterminate (n = 15).

NPV: negative predictive value.

doi:10.1371/journal.pmed.1001759.t002.

■ CONCLUSIONES DE LOS AUTORES

En el presente estudio se desarrolla y se valida un QPCR test no invasivo, con alta sensibilidad y especificidad, para diagnosticar casos de rechazo agudo, el kSORT, así como un algoritmo (kSAS) para la detección y predicción del rechazo agudo, independientemente del grado de rechazo o del diagnóstico patológico de rechazo humoral o celular.

kSORT debe ser evaluado en un estudio clínico prospectivo para determinar su eficacia clínica.

■ COMENTARIOS DE LOS REVISORES

Es indiscutible la necesidad de desarrollar pruebas moleculares no invasivas para mejorar el diagnóstico y monitorizar la aparición del rechazo agudo en pacientes trasplantados renales.

Los investigadores del estudio han conseguido identificar un grupo de 43 genes relacionados con la aparición de rechazo agudo en el trasplante renal y extraer 17 de ellos que tienen una relación significativa, en poblaciones tanto adultas como pediátricas, para desarrollar el test kSORT y el algoritmo de análisis kSAS. Estos presentan mayores scores en pacientes diagnosticados por biopsia renal de rechazo agudo, aun en muestras sanguíneas previas a la expresión clínica.

Los resultados son prometedores, teniendo en cuenta que se basan en el análisis genético a partir de la obtención del ARN y el ADN por medio de kits comercializados en la actualidad, lo cual les confiere un alto grado de reproducibilidad.

Sin embargo, la falta de claridad en la selección de los pacientes y de homogeneidad en la obtención de las muestras de ARN, y la variabilidad interobservador en el análisis de la biopsia renal, aumentan considerablemente el riesgo de sesgos.

Adicionalmente, existen discrepancias en el número de pacientes que inicialmente se incluyeron y los descritos en la tabla de resultados, sin informar en ningún momento sobre la exclusión de alguno.

Por otra parte, al ser un test diagnóstico que utiliza muestras independientes de pacientes, puede ver disminuido su potencial diagnóstico.

Estamos de acuerdo con el grupo investigador en que se debe realizar un estudio prospectivo corrigiendo los problemas previamente señalados, para validar y determinar su eficacia clínica.

■ CONCLUSIONES DE LOS REVISORES

El diseño y la validación del test kSORT tienen un riesgo alto de incluir sesgos por lo que existen dudas acerca de su aplicabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li L, Khatri P, Sigdel TK, Tran T, Ying L, Vitalone MJ, et al. A peripheral blood diagnostic test for acute rejection in renal transplantation. *Am J Transplant* 2012;12:2710-8.