

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y validación de un modelo predictivo del riesgo
de infección basado en parámetros inmunológicos en
receptores de trasplante renal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Fernández Ruiz

DIRECTORES

José María Aguado García
Francisco López Medrano

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO
PREDICTIVO DEL RIESGO DE INFECCIÓN BASADO
EN PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN
RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Fernández Ruiz

Bajo la dirección de los doctores

José María Aguado García

Francisco López Medrano

Madrid, Enero de 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO
PREDICTIVO DEL RIESGO DE INFECCIÓN BASADO
EN PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN
RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL**

A mi padre, luz perdurable

Fluctuat nec mergitur

Scientia longa, vita brevis

“El doctor Skowronnek se fue al gabinete, se subió a una silla
y descolgó el retrato del héroe de Solferino.
Cuando volvió con el cuadro entre las manos,
el señor de Trotta ya no era capaz de verlo...”

Joseph Roth, *Radetzky*

La gratitud es larga, la memoria, corta...

La relación de mis muchas deudas comienza, como no podría ser de otra forma, por mis directores de Tesis.

José María Aguado ha sido, es y será, mi mentor en el apasionante mundo de las Enfermedades Infecciosas, un ejemplo de compromiso con la investigación (y la imaginación) científicas, el modelo diario de una forma inconformista de entender la Medicina por desgracia excepcional en nuestro tiempo y, sobre todo, un amigo y un Maestro (la mayúscula no es arbitraria).

A Francisco López Medrano le debo, entre otras muchas cosas, el estímulo inicial que me llevó a emprender hace casi 10 años esta investigación y a iniciar mi andadura en la Unidad de Enfermedades Infecciosas. Gracias a él, por tanto, se abrió la senda que me ha llevado hasta donde ahora estoy: el mejor sitio al que podría aspirar desde un punto de vista profesional y personal... En ese trayecto, además, gané un buen amigo.

Mi gratitud y mi reconocimiento se hacen extensivas a Rafael San Juan, por su espíritu franco, por su rigor científico y, sobre todo, por la amistad con la que me honra. A Manuel Lizasoain (Manolo para todos), excelente profesional del que tantas cosas he aprendido y tantas cosas me quedan por aprender. Y a Carlos Lumbreras, por su continuado apoyo.

Al resto de mis actuales compañeros: Tiago, Laura y María. Y a los que ahora estáis fuera de la Unidad, pero nunca de mi recuerdo: Julia, Asun (pequeña Padowan #1), Alejandra (pequeña Padowan #2), Guillermo... Porque contribuíis a hacer inmejorable el ambiente del día a día, porque ha sido (y es) un placer trabajar, investigar, descubrir cosas nuevas... a vuestro lado.

Por su excelente predisposición, por su ánimo de trabajo y por su enorme paciencia, Tamara, Patricia y Cristina se merecen una mención especial en esta larga (y a buen seguro incompleta) relación. Sin ellas, sencillamente, no tendríamos nuestro propio laboratorio y todas nuestras líneas de investigación se hubieran quedado cortas.

A David Navarro, por las conversaciones compartidas sobre la ciencia y sobre la vida, por la mirada inteligente e irónica que parece sacada de un personaje de Houellebecq o de Philip Roth, por muchos años más de fructífera colaboración.

Mi agradecido recuerdo a Juan M. Guerra, que guió mis primeros pasos en el mundo de la investigación clínica. Buena parte de lo que he hecho a lo largo de este tiempo se lo debo al entusiasmo y generosidad con el que me acogió en mi residencia. Y a mis otros maestros de la planta 15: Félix Alonso Navas, Vicente Guillén y José Luis Aranda. El internista que hay en mí os lo debe todo a vosotros.

Sin la generosa colaboración a lo largo de estos años del Servicio de Nefrología en su conjunto, de la Consulta de Trasplante Renal y de la Coordinación de Trasplante no hubiera

sido posible llevar a cabo este estudio ni desarrollar la línea de investigación en la cual se enmarca. Si bien mi sincera gratitud abarca a todo el personal facultativo, de enfermería y administrativo implicado en ese milagro cotidiano que es el trasplante, quisiera expresar en particular mi agradecimiento al Dr. Amado Andrés, por su permanente estímulo y apoyo.

Mi reconocimiento igualmente al Servicio de Inmunología y, en particular, a los Dres. Estela Paz y Luis M. Allende, por su inestimable participación en las determinaciones inmunológicas en las que se basa este estudio.

A todo el personal del Instituto y la Fundación de Investigación del Hospital “12 de Octubre”. Al Dr. Joaquín Arenas, por la confianza que ha demostrado en mí. Y a mis compañeros de pasillo, por vuestra resignada paciencia cada vez que os apago las luces.

Y, naturalmente, mi eterno reconocimiento hacia los pacientes y sus familiares, los únicos que dan auténtico sentido a todo cuanto hacemos...

A mi familia, el auténtico sostén, patria y refugio. Puedo ser austero en palabras, pero no en emoción. A mi madre, porque sé que siempre estarás a mi lado, pase lo que pase; porque no dejas de recordarme cada día que no me acueste tan tarde; y por tantas otras cosas. A mis hermanos, porque sois mi infancia y mi armazón, porque habéis sido mis otros padres y mis otras madres, porque soy la suma de cada uno de vosotros...

Y a mi padre, origen. La luz de tu candil sigue iluminando cada rincón de mi vida.

A los que me acompañáis en el camino y a los que os separasteis en las muchas bifurcaciones del camino. A los alegres muchachos (por otros veinte años), a los poetas errantes que no renuncian a coleccionar horizontes, a las gaviotas que saben regresar a sus buhardillas, a la Quinta de Sibelius (“Allegro Molto - misterioso”)...



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Mario Fernández Ruiz
Título de la Tesis	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO PREDICTIVO DEL RIESGO DE INFECCIÓN BASADO EN PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL
Facultad o Centro	Hospital Universitario "12 de Octubre"

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL			
Nombre completo	José María Aguado García		
Centro al que pertenece y dirección	Facultad de Medicina. Universidad Complutense Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario "12 de Octubre", Avda. de Córdoba, s/n. CP: 28041 Madrid.		
D.N.I./Pasaporte	01092365A	Nacionalidad	Española
e-mail	jaguadog1@gmail.com		


	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo de investigación presentado para optar al grado de Doctor en Medicina por D. Mario Fernández Ruiz desarrolla un modelo de predicción de riesgo de infección basado en marcadores clínicos e inmunológicos que considero puede contribuir de forma notable a cambiar la practica clínica en el paciente trasplantado renal. La hipótesis está claramente definida y se expresa en unos objetivos concretos. La metodología empleada es rigurosa y esta perfectamente referida. Los resultados se exponen en forma de numerosas tablas y figuras, de un modo que permite una fácil comprensión. Las discusión es concreta y el estilo de su redacción claro, alcanzando unas conclusiones precisas que dan contestación a los objetivos planteados por el investigador al inicio de su trabajo, dando lugar a un nuevo modelo predictivo clinico-inmunológico que considero puede ser del máximo interés. Este trabajo abre unas claras líneas de investigación al doctorando y certifica su enorme capacidad como investigador clínico.

Madrid, a 15 de Enero de 2018

Fdo.:



José María Aguado García

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión Académica del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Mario Fernández Ruiz
Título de la Tesis	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO PREDICTIVO DEL RIESGO DE INFECCIÓN BASADO EN PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL
Facultad o Centro	Hospital Universitario "12 de Octubre"

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL			
Nombre completo	Francisco López Medrano		
Centro al que pertenece y dirección	Facultad de Medicina. Universidad Complutense Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario "12 de Octubre", Avda. de Córdoba, s/n. CP: 28041 Madrid.		
D.N.I./Pasaporte	02529508Z	Nacionalidad	Española
e-mail	flmedrano@yahoo.es		

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo de investigación que presenta el Doctorando se ajusta a los requisitos éticos de investigación clínica. El trabajo es original, la hipótesis que se plantea es razonable, el método aplicado parece adecuado a los objetivos marcados y los resultados se presenta de manera concisa y bien ordenados. La discusión se ajusta a los resultados obtenidos. La profusión de tablas y figuras facilita la comprensión del texto. Las conclusiones extraídas son acordes con la hipótesis planteada y los resultados obtenidos. En mi opinión es un excelente trabajo de investigación clínica apto para ser presentado para obtener el título de Doctor en Medicina.

Madrid, a 15 de Enero de 2018

Fdo.:



Francisco López Medrano

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión Académica del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	20
2. ABREVIATURAS	23
3. INTRODUCCIÓN	25
3.1 Monitorización inmunológica en el trasplante de órgano sólido	26
3.2 Niveles séricos de inmunoglobulinas	29
3.3 Niveles séricos de componentes del sistema del complemento	32
3.4 Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica	34
3.5 Otras estrategias de monitorización	37
3.6 Limitaciones de estudios previos y justificación de la presente investigación	39
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo general	44
5.2 Objetivos específicos	44
6. PACIENTES Y MÉTODOS	45
6.1 Ámbito y diseño del estudio	47
6.2 Selección de participantes	48
6.3 Procedimientos del estudio	49
6.4 Definiciones empleadas	53
6.5 Aspectos éticos	56
6.6 Análisis estadístico	56
7. RESULTADOS	61
7.1 Descripción de la cohorte global	62
7.2 Evolución post-trasplante	66
7.3 Complicaciones infecciosas	69

7.4	Cinética de los parámetros inmunológicos	76
7.5	Cohortes de derivación y de validación	81
7.6	Construcción de los modelos clínicos de predicción	83
7.7	Relación entre parámetros inmunológicos y riesgo de infección	99
7.8	Construcción de los modelos inmunológicos y combinados de predicción	108
7.9	Rendimiento de los modelos combinados de predicción en la cohorte de derivación.....	119
7.10	Rendimiento de los modelos combinados de predicción en la cohorte de validación	128
8.	DISCUSIÓN	146
9.	COROLARIO	157
10.	CONCLUSIÓN.....	160
11.	REFERENCIAS	162
12.	ANEXOS	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estrategias actualmente disponibles para la monitorización inmunológica de naturaleza no patógeno-específica en el receptor de trasplante de órgano sólido.....	28
Tabla 2.	Funciones de la inmunidad humoral en la respuesta frente a patógenos bacterianos	29
Tabla 3.	Funciones del sistema del complemento.....	33
Tabla 4.	Características demográficas y clínicas basales de los receptores en la cohorte global	62
Tabla 5.	Características demográficas y clínicas basales de los donantes en la cohorte global	64
Tabla 6.	Características relacionadas con el procedimiento quirúrgico, incompatibilidades donante / receptor y variables peri-operatorias en la cohorte global	65
Tabla 7.	Regímenes primarios de inmunosupresión y pautas de profilaxis en la cohorte global	66
Tabla 8.	Complicaciones post-trasplante de naturaleza no infecciosa en la cohorte global	67
Tabla 9.	Tipo histológico y tratamiento de los episodios de rechazo agudo el injerto.....	68
Tabla 10.	Tipo y microorganismo causante de los episodios de infección bacteriana	71
Tabla 11.	Incidencia de los principales tipos de infección bacteriana según el periodo post-trasplante	72
Tabla 12.	Tipo y microorganismo causante de los episodios de infección vírica.....	72
Tabla 13.	Incidencia acumulada de los principales tipos de infección vírica según el periodo post-trasplante	74
Tabla 14.	Tipo y microorganismo causante de los episodios de infección fúngica y parasitaria.....	75
Tabla 15.	Incidencia acumulada de los distintos tipos de infección fúngica y parasitaria según el periodo post-trasplante.	75
Tabla 16.	Comparación de las características demográficas y clínicas relevantes en las cohortes de derivación y de validación.	82
Tabla 17.	Análisis univariante y multivariante (regresión de Cox) de los factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante precoz (primer mes) en la cohorte de derivación	84
Tabla 18.	Análisis univariante y multivariante (regresión de Cox) de los factores de riesgo naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación.....	86
Tabla 19.	Análisis univariante y multivariante (regresión de Cox) de los factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	88
Tabla 20.	Análisis univariante y multivariante (regresión de Cox) de los factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante precoz (primer mes) en la cohorte de derivación	90
Tabla 21.	Análisis univariante y multivariante (regresión de Cox) de los factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación	92

Tabla 22. Análisis univariante y multivariante (regresión de Cox) de los factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	94
Tabla 23. Puntos de corte óptimos (estadístico J de Youden) de los parámetros inmunológicos en el mes 1 seleccionados para la predicción del desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación	106
Tabla 24. Puntos de corte óptimos (estadístico J de Youden) de los parámetros inmunológicos en el mes 1 seleccionados para la predicción del desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación.....	107
Tabla 25. Puntos de corte óptimos (estadístico J de Youden) de los parámetros inmunológicos en el mes 6 seleccionados para la predicción del desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	110
Tabla 26. Punto de corte óptimo (estadístico J de Youden) del parámetro inmunológico en el mes 6 seleccionado para la predicción del desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	111
Tabla 27. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo inmunológicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación	111
Tabla 28. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como no inmunológicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación	112
Tabla 29. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo inmunológicos para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación.....	114
Tabla 30. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como clínicos para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación.....	115
Tabla 31. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo inmunológicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación.....	116
Tabla 32. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como clínicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	116
Tabla 33. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como clínicos para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación.....	118
Tabla 34. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación	119
Tabla 35. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación.....	121

Tabla 36. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	125
Tabla 37. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación	125
Tabla 38. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de validación	133
Tabla 39. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de validación	133
Tabla 40. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de validación.....	137
Tabla 41. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de validación.....	138
Tabla 42. Resumen de los modelos combinados (clínicos e inmunológicos) de predicción	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia acumulada de infección bacteriana global, bacteriemia y pielonefritis aguda en el mes 6 post-trasplante en una cohorte de 304 receptores de trasplante renal en función de los niveles séricos de IgG en el primer mes	30
Figura 2. Cronograma del estudio	47
Figura 3. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global del receptor (a) y de supervivencia del injerto renal censurada por muerte (b) , con seguimiento truncado a los 5 años del trasplante renal	69
Figura 4. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección bacteriana, vírica y fúngica, con seguimiento truncado a los 2 años del trasplante renal.	70
Figura 5. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años)	70
Figura 6. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección bacteriana global (a) , pielonefritis aguda (b) y bacteriemia (c) en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años)	73
Figura 7. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de enfermedad por CMV en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años)..	74
Figura 8. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey indicando la cinética en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante de los niveles séricos de IgG (a) , IgA (b) e IgM (c)	77
Figura 9. Prevalencia de hipogammaglobulinemia según la clase de inmunoglobulina afectada en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante	78
Figura 10. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey indicando la cinética en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante de los niveles séricos de los factores de complemento C3 (a) y C4 (b)	79
Figura 11. Prevalencia de hipocomplementemia a expensas de diferentes componentes en la evaluación basal y en distintos puntos post-trasplante	79
Figura 12. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey indicando la cinética en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante de los recuentos de linfocitos totales (a) , linfocitos T CD3 ⁺ (b) , linfocitos T CD4 ⁺ (c) , linfocitos T CD8 ⁺ (d) , linfocitos B (e) y linfocitos NK (f)	80
Figura 13. Cinética de las distintas subpoblaciones linfocitarias en función del tipo de tratamiento de inducción: linfocitos totales (a) , linfocitos T CD3 ⁺ (b) , linfocitos T CD4 ⁺ (c) , linfocitos T CD8 ⁺ (d)	81
Figura 14. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global en las cohortes de derivación y de validación en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años)	83
Figura 15. Áreas bajo la curva ROC de los modelos de predicción clínica para infección global en la cohorte de derivación en el periodo post-trasplante precoz (a) , intermedio (b) y tardío (c)	97
Figura 16. Áreas bajo la curva ROC de los modelos de predicción clínica para infección bacteriana en la cohorte de derivación en el periodo post-trasplante precoz (a) , intermedio (b) y tardío (c)	98

Figura 17. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (a) , linfocitos T CD3 ⁺ (b) , linfocitos T CD4 ⁺ (c) , linfocitos T CD8 ⁺ (d) , linfocitos B (e) y linfocitos NK (f) medidos en la evaluación basal entre pacientes con o sin infección global en el periodo post-trasplante precoz	99
Figura 18. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante precoz en pacientes con o sin hipogammaglobulinemia IgG (a) , IgA (b) o IgM (c) en la evaluación basal en la cohorte de derivación.	100
Figura 19. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante precoz en pacientes con o sin hipocomplementemia C3 (a) y C4 (b) en la evaluación basal en la cohorte de derivación.....	102
Figura 20. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (a) , linfocitos T CD3 ⁺ (b) , linfocitos T CD4 ⁺ (c) , linfocitos T CD8 ⁺ (d) , linfocitos B (e) y linfocitos NK (f) medidos en el mes 1 entre pacientes con o sin infección global en el periodo post-trasplante intermedio.	102
Figura 21. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (a) , linfocitos T CD3 ⁺ (b) , linfocitos T CD4 ⁺ (c) , linfocitos T CD8 ⁺ (d) , linfocitos B (e) y linfocitos NK (f) medidos en el mes 1 entre pacientes con o sin infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio.....	103
Figura 22. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante intermedio (mes 6) en pacientes con o sin hipogammaglobulinemia IgG (a) , IgA (b) o IgM (c) en el mes 1 en la cohorte de derivación.	104
Figura 23. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante intermedio (mes 6) en pacientes con o sin hipocomplementemia C3 (a) y C4 (b) en el mes 1 en la cohorte de derivación	105
Figura 24. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (a) , linfocitos T CD3 ⁺ (b) , linfocitos T CD4 ⁺ (c) , linfocitos T CD8 ⁺ (d) , linfocitos B (e) y linfocitos NK (f) medidos en el mes 6 entre pacientes con o sin infección global en el periodo post-trasplante tardío	108
Figura 25. Incidencia acumulada de infección global y bacteriana al final del periodo post-trasplante tardío (final de seguimiento) en pacientes con o sin hipogammaglobulinemia IgG (a) , IgA (b) o IgM (c) en el mes 6 en la cohorte de derivación	109
Figura 26. Incidencia acumulada de infección global y bacteriana al final del periodo post-trasplante tardío (final de seguimiento) en pacientes con o sin hipocomplementemia C3 (a) y C4 (b) en el mes 6 en la cohorte de derivación.....	110
Figura 27. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación	113
Figura 28. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación.....	115
Figura 29. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación.....	117

Figura 30. Áreas bajo las curvas ROC de los modelos de predicción (clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación.....	118
Figura 31. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles (c)	120
Figura 32. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de enfermedad por CMV a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles (c)	122
Figura 33. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles (c)	123
Figura 34. Tasas de incidencia acumulada para ciertos síndromes específicos según cuartiles del modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: (a) pielonefritis aguda, (b) bacteriemia de cualquier foco, (c) infección de lecho quirúrgico, (d) neumonía y (e) infección por <i>Clostridium difficile</i>	124
Figura 35. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por cuartiles (c)	126
Figura 36. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o terciles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por terciles (c)	127
Figura 37. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: <i>hazard ratios</i> (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global (a) y bacteriana (b) a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes.....	129
Figura 38. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: <i>hazard ratios</i> (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil o en un tercil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global (a) y bacteriana (b) a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes.	130

Figura 39. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global (a) y bacteriana (b) en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de validación	131
Figura 40. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global (a) y bacteriana (b) en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de validación	132
Figura 41. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles (c)	134
Figura 42. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles (c)	135
Figura 43. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o cuartiles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por cuartiles (c)	137
Figura 44. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo (a) o terciles (b) , y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por terciles (c)	139
Figura 45. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: <i>hazard ratios</i> (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global (a) y bacteriana (b) a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de validación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes.....	140
Figura 46. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: <i>hazard ratios</i> (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil o en un tercil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global (a) y bacteriana (b) a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes	141
Figura 47. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación entre las cohortes de derivación y validación de las incidencias acumuladas al final del periodo post-trasplante intermedio para infección global (a) y bacteriana (b) estratificadas por cuartiles.....	142
Figura 48. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación entre las cohortes de derivación y validación de las incidencias acumuladas al final del periodo post-trasplante intermedio para infección global (a) y bacteriana (b) estratificadas por cuartiles o terciles .	143

Figura 49. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global al final del periodo post-trasplante intermedio entre las cohortes de derivación y validación estratificadas por primer **(a)**, segundo **(b)**, tercer **(c)** y cuarto cuartil **(d)**..... 144

Figura 50. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global al final del periodo post-trasplante tardío entre las cohortes de derivación y validación estratificadas por primer **(a)**, segundo **(b)**, tercer **(c)** y cuarto cuartil **(d)** 145

1. RESUMEN

Resumen

Introducción: La infección constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre receptores de trasplante renal (TR). Sin embargo, nuestra capacidad en el momento actual para identificar a los pacientes en riesgo de esta complicación es limitada. El desarrollo de un modelo ponderado de predicción basado en parámetros inmunológicos no patógeno-específicos y en variables clínicas permitiría individualizar el seguimiento y abordaje de estos pacientes en función de su riesgo específico de infección.

Métodos: Análisis retrospectivo de una cohorte observacional prospectiva integrada por 447 pacientes sometidos a TR en nuestro centro entre Noviembre de 2008 y Marzo de 2013. Esta muestra global fue segmentada de forma aleatoria en una cohorte de derivación (292 pacientes) y una cohorte de validación (155 pacientes). Monitorizamos el recuento de subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B y linfocitos *natural killer* [NK]) y los niveles séricos de inmunoglobulinas y factores de complemento (C3 y C4) según un esquema preestablecido: momento basal (pre-trasplante), mes 1 y mes 6. El objetivo del estudio fue el desarrollo de infección global y bacteriana a lo largo de diversos periodos post-trasplante (precoz [primer mes], intermedio [meses 1 a 6] y tardío [a partir del mes 6]). Para la construcción de los modelos se realizaron varios análisis de regresión logística (según el periodo y tipo de infección), asignando un valor numérico a los coeficientes β así obtenidos. La capacidad de discriminación fue analizada mediante el área bajo la curva de características operativas del receptor (ROC); la exactitud diagnóstica mediante la estimación de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN); y la reproducibilidad y calibración mediante la cohorte independiente de validación.

Resultados: No hubo diferencias en los parámetros inmunológicos basales en función del desarrollo de infección durante el primer mes post-trasplante, por lo que no se pudo construir ningún modelo para este periodo. El modelo de predicción de infección global durante el periodo intermedio se basó en los siguientes parámetros (evaluados al mes 1): edad del receptor ≥ 63 años (4 puntos), reintervención en el primer mes (3 puntos), función del injerto renal (-0,3 puntos por cada intervalo de 10 mL/min), linfocitos T CD4⁺ < 30 céls/mcL (3 puntos), linfocitos B < 110 céls/mcL (2 puntos), IgA < 115 mg/dL (3 puntos) y C3 < 76 mg/dL (2 puntos). El área bajo la curva ROC fue 0,771. Empleando como punto de corte > 4 puntos observamos los siguientes valores: sensibilidad 54,8%, especificidad 83,2%, VPP 60,7% y VPN 79,5%. El modelo para infección bacteriana consistió, por su parte, en los siguientes parámetros: edad del receptor ≥ 65 años (3 puntos), retraso en la función del injerto (2 puntos), infección bacteriana previa (4 puntos), linfocitos NK < 68 céls/mcL (2 puntos) e IgG < 500 mg/dL (3 puntos). El área bajo la curva ROC fue 0,765. Con un punto de corte $> 6,5$ puntos obtuvimos: sensibilidad 54,4%, especificidad 85,4%, VPP 47,7% y VPN 88,4%.

El modelo de predicción de infección global durante el periodo tardío incluyó los siguientes parámetros (evaluados al mes 6): enfermedad aterotrombótica (3 puntos), rechazo agudo previo (2 puntos), linfocitos NK < 232 céls/mcL (6 puntos) y C3 < 103 mg/dL (2 puntos). El área bajo la curva ROC de 0,736. Empleando un punto de corte > 7 puntos observamos los siguientes valores: sensibilidad 69,2%, especificidad 64,3%, VPP 41,4% y VPN 85,2%. Por último, el modelo para infección bacteriana tardía consistió en: infección por VHC (3 puntos), rechazo agudo previo (3 puntos) y C3 < 103 mg/dL (3 puntos). El área bajo la curva ROC fue de 0,687. En este caso, el umbral óptimo ($> 4,5$ puntos) arrojó los siguientes valores: sensibilidad 37,8%, especificidad 90,3%, VPP 45,2% y VPN 87,3%.

La reproducibilidad y calibración de los modelos en la cohorte de validación fue buena. No hubo diferencias significativas en las áreas bajo la curva ROC ni en las incidencias de infección tras estratificar ambas cohortes por cuartiles o terciles del correspondiente modelo de predicción.

Conclusiones: La combinación de parámetros inmunológicos no patógeno-específicos y ampliamente disponibles junto con una serie de variables clínicas seleccionadas permite predecir, en los meses 1 y 6 post-trasplante, el riesgo posterior de infección global o bacteriana en receptores de TR de forma individualizada.

Abstract

Introduction: Infection still constitutes one leading cause of morbidity and mortality among kidney transplant (KT) recipients. However, our current capacity to identify those patients at high risk for such event is limited. The development of a weighted prediction score based on a number of non-pathogen-specific immune parameters and clinical variables may be useful to individualize post-transplant management according to the predicted risk.

Methods: We performed a retrospective analysis of a prospective observational cohort including 447 patients that underwent KT at our center from November 2008 to March 2013. This overall sample was randomly split into a derivation cohort (292 patients) and a second validation cohort (155 patients). We assessed peripheral blood lymphocyte subpopulations (CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, B-cells and *natural killer* [NK] cells) counts and serum immunoglobulin and complement (C3 and C4) levels according to a pre-established schedule: baseline (pre-transplant) and post-transplant months 1 and 6. The study outcome was the occurrence of overall and bacterial infection throughout different post-transplant periods (early [first month], intermediate [months 1-6] and late [>6 months]). We constructed a set of logistic regression models (according to each post-transplant period and the type of infection predicted) and assigned a numeric value to the resulting β coefficients in order to develop the prediction scores. The discriminative power was assessed by means of the area under receiver operating characteristic (auROC); diagnostic accuracy was analyzed by sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive (NPV) values; and reproducibility and calibration by means of the independent validation cohort.

Results: We found no differences in baseline immune parameters according to the occurrence of infection during the first post-transplant month, and therefore no score for the early period could be developed. The model for predicting overall infection during the intermediate period was based on the following variables (assessed at month 1): recipient age ≥ 63 years (4 points), reintervention within the first month (3 points), kidney graft function (-0.3 points per 10 mL/min-interval), CD4⁺ T-cell count < 30 cells/mcL (3 points), B-cell count < 110 cells/mcL (2 points), IgA levels < 115 mg/dL (3 points) and C3 levels < 76 mg/dL (2 points). The auROC was 0.771. By applying the optimal cut-off value (> 4 points) we obtained the following diagnostic accuracy: sensitivity 54.8%, specificity 83.2%, PPV 60.7% and NPV 79.5%. The model for predicting bacterial infection during this period included the following parameters: recipient age ≥ 65 years (3 points), delayed graft function (2 points), previous bacterial infection (4 points), NK cell count < 68 cells/mcL (2 points) and IgG level < 500 mg/dL (3 points). The corresponding auROC was 0.765. The optimal cut-off value (> 6.5) yielded: sensitivity 54.4%, specificity 85.4%, PPV 47.7% and NPV 88.4%.

The model for the prediction of overall infection during the late post-transplant period was constructed on the basis of the following parameters (assessed at month 6): pre-transplant atherothrombotic disease (3 points), previous graft rejection (2 points), NK cell count < 232 cells/mcL (6 points) and C3 level < 103 mg/dL (2 points). The auROC was 0.736. With the optimal cut-off value (> 7 points) we observed: sensitivity 69.2%, specificity 64.3%, PPV 41.4% and NPV 85.2%. Finally, the model for late bacterial infection included chronic HCV infection (3 points), previous graft rejection (3 points) and C3 level < 103 mg/dL (3 points). The auROC was 0.687. The diagnostic accuracy by applying the optimal cut-off value (> 4.5) was: sensitivity 37.8%, specificity 90.3%, PPV 45.2% and NPV 87.3%.

Model reproducibility and calibration within the validation cohort were good. There were no significant differences in the auROCs between the derivation and validation cohort, or in the incidence of infection after stratifying both cohorts by increasing quartiles or tertiles of each prediction model.

Conclusions: The combination into a single prediction model of easily available non-pathogen-specific immune parameters and a series of selected clinical variables is useful to predict, at post-transplant months 1 and 6, the individual risk of subsequent infection in KT recipient.

2. ABREVIATURAS

ATG:	<i>antithymocyte globulin</i> (globulina antitimocítica policlonal)
CMV:	citomegalovirus
DE:	desviación estándar
ELISA:	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EPOC:	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FGe:	filtrado glomerular estimado
HCC:	hipocomplementemia
HGG:	hipogammaglobulinemia
HLA:	<i>human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitario humano)
HR:	<i>hazard ratio</i> (cociente de riesgos instantáneos)
HU12O:	Hospital Universitario "12 de Octubre"
IC:	intervalo de confianza
Ig:	inmunoglobulina
IgIV:	inmunoglobulina humana inespecífica por vía intravenosa intravenosa
IMC:	inmunidad mediada por células
MBL:	<i>mannose binding lectin</i> (lectina fijadora de manosa)
mTOR:	<i>mammalian target of rapamycin</i> (diana de rapamicina en células de mamífero)
NK:	<i>natural killer</i> (linfocito asesino natural)
OR:	<i>odds ratio</i> (razón de ventajas)
P:	percentil
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
Q:	cuartil
RIQ:	rango intercuartílico
ROC:	<i>receiver operating characteristic</i> (característica operativa del receptor)
SNP:	<i>single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleótido único)
T:	tercil
TOH:	trasplante ortotópico hepático
TOS:	trasplante de órgano sólido
TR:	trasplante renal
UCI:	unidad de cuidados intensivos
UFC:	unidades formadoras de colonias
VEB:	virus de Epstein-Barr
VHB:	virus de la hepatitis B
VHC:	virus de la hepatitis C
VPN:	valor predictivo negativo
VPP:	valor predictivo positivo
VVZ:	virus varicela-zóster

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Monitorización inmunológica en el trasplante de órgano sólido

Tras haber demostrado su impacto favorable en términos de supervivencia y calidad de vida, el trasplante renal (TR) constituye una alternativa terapéutica ampliamente establecida en pacientes con enfermedad renal crónica, tanto si ya se encuentran sometidos a técnicas de remplazo renal como si aún permanecen en situación de prediálisis [1,2]. La supervivencia del injerto censurada por muerte ha experimentado un avance notable en las últimas décadas, como consecuencia de la introducción de regímenes de inmunosupresión más potentes que han permitido reducir la incidencia de rechazo agudo a cifras inferiores al 12% [3-5]. No obstante, los pacientes sometidos a TR siguen sufriendo un exceso de morbi-mortalidad respecto a la población general derivado de los efectos deletéreos a medio y largo plazo del tratamiento inmunosupresor, que conducen a un mayor riesgo de infecciones, eventos cardiovasculares y neoplasia *de novo* [5,6]. En concreto, las complicaciones infecciosas suponen una de las principales causas de muerte con injerto funcionando, y se sitúan en orden de frecuencia solo por detrás de la mortalidad de origen cardiovascular [6].

La implementación en la práctica clínica de estrategias de monitorización inmunológica durante el seguimiento post-trasplante podría conducir a la minimización de estos eventos adversos a través del ajuste individualizado del tratamiento con arreglo al estado global de inmunosupresión en un paciente dado, como ha demostrado un reciente ensayo clínico basado en la determinación mediante un test comercial de los niveles intracelulares de adenosín trifosfato en linfocitos T CD4⁺ estimulados con un mitógeno inespecífico [7]. Idealmente, la estrategia de monitorización debería estar fundamentada en biomarcadores sensibles y específicos, capaces de compendiar la naturaleza multidimensional de la respuesta inmune (tanto innata como adaptativa) del huésped, cuya determinación fuera sencilla y reproducible desde un punto de vista técnico, y que pudieran ser puestos en conocimiento del clínico en un corto periodo de tiempo a fin de permitir la toma de decisiones terapéuticas [8].

Hasta la fecha la única estrategia con un grado significativo de implantación en la práctica asistencial se limita a la monitorización de los niveles plasmáticos de fármacos inmunosupresores, principalmente anti-calcineurínicos e inhibidores de la diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian target of rapamycin* [mTOR]). Se trata de un abordaje unidimensional de carácter farmacocinético [9,10]. La correlación entre la monitorización terapéutica de un determinado fármaco y el desarrollo de eventos clínicos es relativamente pobre, en particular en lo que respecta a la infección post-trasplante y otras

complicaciones asociadas al exceso de inmunosupresión [11]. Por otra parte las técnicas actuales de monitorización terapéutica no permiten capturar el impacto sinérgico que los distintos tipos de agentes (anti-calceinúricos, anti-metabolitos, corticoesteroides e inhibidores de la mTOR) ejercen sobre la respuesta inmune. Tampoco reflejan el efecto de los anticuerpos monoclonales (e.g., alemtuzumab o rituximab) o policlonales dirigidos frente a antígenos de la superficie de los linfocitos T o B, que son frecuentemente empleados como inducción [12], en regímenes de desensibilización en receptores de alto riesgo inmunológico [13], o en el tratamiento del rechazo agudo mediado por células [14].

Las distintas estrategias de monitorización inmunológica aplicables al receptor de trasplante de órgano sólido (TOS) pueden ser clasificadas desde un punto de vista pragmático y eminentemente funcional en dos grandes categorías. En primer lugar citaremos las *estrategias de naturaleza no patógeno-específica*. Éstas se articulan en torno a la determinación estructurada (con arreglo a un cronograma establecido) a lo largo del periodo post-trasplante de uno o más biomarcadores que proporcionen una evaluación, ya sea funcional o exclusivamente cuantitativa, de la respuesta inmune no circunscrita a un determinado microorganismo, toda vez que no se emplea un estímulo antigénico concreto [8]. Deben ser diferenciadas, por tanto, de aquellos abordajes que tienen por objeto explorar la magnitud y funcionalidad de la respuesta celular adaptativa frente a un microorganismo concreto, habitualmente de naturaleza vírica, y que englobaremos bajo el concepto de *estrategias patógeno-específicas*.

Estos últimos abordajes están fundamentados en la medición de citoquinas implicadas en la respuesta con orientación Th₁ (habitualmente interferón- γ) en linfocitos T o B previamente estimulados con péptidos virales, lisados virales o células dendríticas infectadas con virus vivos, y emplean diversas plataformas técnicas tales como la tinción intracelular de citoquinas mediante citometría de flujo o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay* [ELISA]) [15]. Las estrategias de monitorización patógeno-específicas han experimentado un notable desarrollo en los últimos años, circunscrito fundamentalmente a la inmunidad celular frente a citomegalovirus (CMV) [16,17]. No obstante, disponemos de ciertas experiencias preliminares acerca de la monitorización post-trasplante de la inmunidad celular específica frente a otros virus como el de la varicela-zóster (VVZ) [18,19] o el poliomavirus BK [20].

Revisaremos a continuación las principales estrategias de monitorización inmunológica no patógeno-específicas (**Tabla 1**), toda vez que conforman la justificación teórica de la presente investigación.

Tabla 1. Resumen de las estrategias actualmente disponibles para la monitorización inmunológica de naturaleza no patógeno-específica en el receptor de trasplante de órgano sólido (modificado de Fernández-Ruiz et al).

<i>Características</i>	Inmunoglobulinas séricas	Componentes del sistema de complemento	Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica	Forma soluble de CD30 (sCD30)	Viremia por VEB o anellovirus
<i>Muestra requerida</i>	Suero	Suero	Sangre completa	Suero	Sangre completa, suero o plasma
<i>Técnica</i>	Nefelometría	Nefelometría, ELISA o genotipado del gen <i>MBL2</i>	Citometría de flujo	ELISA	PCR cuantitativa
<i>Análisis funcional</i>	No	No	No	Sí	Sí
<i>Ventajas</i>	Bajo coste. Técnica sencilla y ampliamente disponible. Posibilidad de intervención mediante reposición con IgIV	Bajo coste. Técnica sencilla (cuantificación de C3 y C4)	Técnica sencilla (métodos semi-automatizados). Excelente VPN para descartar infección. Amplia experiencia análoga en la infección por VIH	Técnica sencilla (kits comerciales). Bajo volumen de muestra requerida (25 µL)	Valoración funcional global de la inmunidad celular. Técnica sencilla y ampliamente disponible (PCR para VEB)
<i>Limitaciones</i>	No informa acerca del estado funcional de la inmunidad humoral. Evidencia aún limitada de la utilidad de IgIV	No informa acerca del estado funcional del sistema del complemento. Interpretación compleja (genotipos de <i>MBL2</i>). Experiencia clínica limitada	No informa acerca del estado funcional de la inmunidad celular. Ausencia de puntos de corte establecidos. Modesto VPP	Ausencia de puntos de corte establecidos. Experiencia clínica limitada con resultados discordantes entre estudios	Ausencia de estandarización técnica. Ausencia de puntos de corte establecidos. Posible interferencia del tratamiento antiviral (VEB). Experiencia clínica limitada

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; IgIV: inmunoglobulinas intravenosas; MBL: lectina fijadora de manosa; PCR: reacción en cadena de polimerasa; VEB: virus de Epstein-Barr; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

3.2. Niveles séricos de inmunoglobulinas

La inmunidad humoral desempeña un papel crucial en la respuesta protectora tanto innata como adaptativa frente a los microorganismos causantes de infección. Interviene, entre otras funciones, en la opsonización de bacterias encapsuladas (e.g., *Streptococcus pneumoniae* o *Neisseria meningitidis*), en la activación del complemento o en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (**Tabla 2**) [21].

Tabla 2. Funciones de la inmunidad humoral en la respuesta frente a patógenos bacterianos.

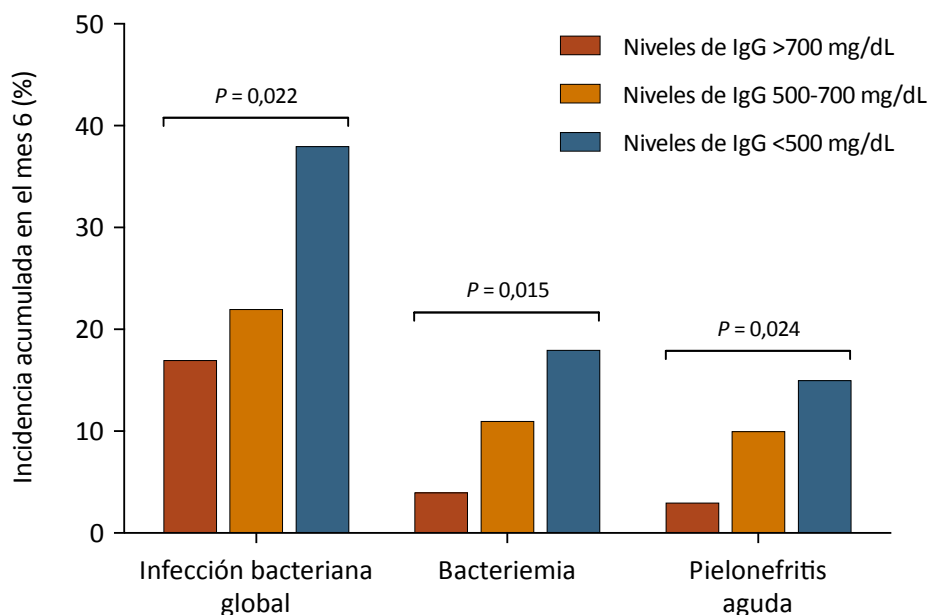
Neutralización de enzimas secretadas y de toxinas bacterianas
Opsonización y fagocitosis de bacterias encapsuladas (mediadas por los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas)
Activación del sistema del complemento por la vía clásica (particularmente IgM)
Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (lisis celular directa por linfocitos <i>natural killer</i> y macrófagos)
Mantenimiento de la inmunidad de mucosas (fundamentalmente IgA)

En el receptor de TR concurren una serie de factores que actúan de forma deletérea sobre este brazo efector inmune, entre los que destacan el síndrome de malnutrición-inflamación-ateroesclerosis en el periodo de diálisis pre-trasplante y el propio tratamiento inmunosupresor [22]. En ese sentido algunos autores han sugerido una asociación entre el uso de mofetil micofenolato y la disminución de los niveles séricos de inmunoglobulina G (IgG), que podría estar mediada por el efecto directo de este fármaco sobre la funcionalidad de los linfocitos B [23-25]. También se ha observado que la administración de anti-calcineurínicos o de bolos de corticoesteroides en la terapia del rechazo agudo contribuye indirectamente a la alteración de la inmunidad humoral a través de un mecanismo inhibitorio sobre los linfocitos T CD4 Th₂ y sus citoquinas (necesarios para la activación y expansión de los linfocitos B) [22,26]. Por todo ello la hipogammaglobulinemia (HGG) es más frecuente en receptores de TR que en sujetos sanos o en pacientes con enfermedad renal crónica terminal no sometidos a trasplante. Esta complicación aparece habitualmente *de novo* tras el trasplante. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo sobre 226 receptores de TR la prevalencia de HGG a expensas de IgG (HGG IgG), definida por niveles séricos <700 mg/dL, aumentó desde el 6,6% en situación basal hasta el 52% en el primer mes post-trasplante, para estabilizarse a continuación en el 31,4% al sexto mes (**Anexo 1** [27]). En un metaanálisis basado en 579 receptores de TR incluidos en 6 estudios la prevalencia de HGG IgG a lo largo del primer año post-trasplante fue del 40%. Es destacable que el descenso de la concentración de

IgG fuera clasificada como grave (<400 mg/dL) hasta en el 8% de los casos [28].

Desde el ya clásico trabajo de Wieneke et al. publicado hace más de 30 años, son múltiples los estudios que han analizado el impacto del desarrollo de HGG *de novo* sobre la incidencia de complicaciones infecciosas en distintos tipos de TOS [25,27,29-34]. En vista del papel de la inmunidad humoral en la respuesta frente a bacterias encapsuladas, no es sorprendente que la asociación patogénica más ampliamente documentada sea la que vincula HGG e infección bacteriana [35]. Por ejemplo, nuestro grupo demostró que los receptores de TR con HGG de cualquier clase (IgG, IgA o IgM) en el primer mes post-trasplante presentan una mayor incidencia de infección de etiología bacteriana a lo largo de los meses siguientes tras ajustar en un modelo multivariante por potenciales confusores (edad del paciente o desarrollo previo de rechazo, entre otros) [27]. De hecho, observamos una suerte de “gradiente de riesgo” según el cual la incidencia de infección bacteriana global, de bacteriemia y de pielonefritis aguda se incrementaba de forma progresiva conforme disminuían los niveles de IgG (**Figura 1**). Hasta la mitad de los receptores que presentaron niveles séricos de IgG <500 mg/dL en el primer mes habían sufrido algún tipo de infección bacteriana al finalizar el sexto mes post-trasplante. También hemos demostrado que la presencia de HGG IgG predice el desarrollo de diarrea por *Clostridium difficile* tras el TR (**Anexo 2** [36]), en la línea de trabajos previos en receptores de trasplante cardíaco [37,38].

Figura 1. Incidencia acumulada de infección bacteriana global, bacteriemia y pielonefritis aguda en el mes 6 post-trasplante en una cohorte de 304 receptores de TR en función de los niveles séricos de IgG en el primer mes (modificado de Fernández-Ruiz et al [27]).



El impacto de las alteraciones adquiridas de la inmunidad humoral en receptores de TR y de otros tipos de TOS no se limita a la infección bacteriana. En el citado metaanálisis de Florescu et al. los pacientes con HGG IgG grave presentaron un riesgo incrementado de infección por CMV, aspergilosis invasora y otras infecciones fúngicas [28]. Sin duda resulta más cuestionable establecer un nexo etiopatogénico directo entre los niveles de IgG y la susceptibilidad a herpesvirus y hongos filamentosos, toda vez que la inmunidad humoral juega un papel secundario en la respuesta frente a estos microorganismos en comparación con la inmunidad celular [39,40]. No debe excluirse, por lo tanto, que la presencia de HGG no actúe más bien como un “marcador de riesgo” capaz de identificar a pacientes más frágiles, con mayor carga de comorbilidad y peor estado nutricional [41].

La monitorización de los niveles séricos de inmunoglobulinas presenta varias ventajas (**Tabla 1**): disponibilidad, sencillez técnica (la determinación suele realizarse mediante nefelometría), bajo coste y existencia de puntos de corte validados en la literatura [22]. Otro de los principales atractivos de esta estrategia radica en la posibilidad de intervención a través de la terapia de reposición a partir de preparados de inmunoglobulina humana inespecífica por vía intravenosa (IgIV). Si se asume que la HGG juega un papel patogénico en el desarrollo de la infección post-trasplante, su reversión permitiría disminuir la incidencia de esta complicación sin necesidad de modificar el tratamiento inmunosupresor y, por tanto, sin comprometer la supervivencia del injerto [22]. La administración periódica de IgIV y de preparados similares por vía subcutánea constituye un abordaje profiláctico de contrastada utilidad en la inmunodeficiencia variable común y otras inmunodeficiencias primarias por déficit de anticuerpos [42]. Por desgracia la experiencia acumulada hasta el momento en el campo del TOS es limitada, de baja calidad metodológica y ofrece resultados discordantes. Carbone et al. comunicaron su experiencia con un grupo de 55 receptores de trasplante cardíaco con HGG IgG (<600 mg/dL) y al menos un episodio previo de infección, que fueron sometidos a una estrategia de reposición con IgIV (dosis de 300-400 mg/Kg repetidas de forma mensual hasta alcanzar niveles de IgG superiores a 750 mg/dL). Los autores observaron un descenso en la incidencia de infecciones graves una vez que se inició el tratamiento, así como la normalización de ciertos parámetros funcionales de inmunidad humoral (e.g., títulos de anticuerpos anti-toxoide tetánico), en ausencia de efectos adversos reseñables [43]. Recientemente han publicado una experiencia favorable con el uso de preparados por vía subcutánea [44]. Claustre et al. obtuvieron resultados comparables en receptores de trasplante pulmonar, si bien el carácter

retrospectivo y no aleatorizado limita la validez de su estudio [45]. Por el contrario, un ensayo clínico de diseño cruzado también realizado en receptores de trasplante pulmonar con HGG IgG (<500 mg/dL), que fueron aleatorizados a recibir IgIV o placebo a lo largo de dos periodos consecutivos de 12 semanas, no demostró diferencias en la incidencia de infección bacteriana, aun a pesar de que los niveles de IgG aumentaron de forma significativa durante la fase de administración de IgIV. Hay que señalar, no obstante, que sólo fueron incluidos 11 pacientes en este ensayo [46]. Florescu et al. tampoco pudieron demostrar que la administración periódica de IgIV tuviera un efecto aparente sobre la mortalidad o la supervivencia del injerto en un estudio retrospectivo basado en una cohorte reducida y heterogénea integrada por receptores de diversos tipos de TOS [47]. En nuestro conocimiento no se ha publicado hasta ahora ningún estudio de esta naturaleza enfocado específicamente en receptores de TR. A esta limitada evidencia disponible hay que añadir que la reposición periódica con IgIV constituye una terapia de coste elevado y no exenta de riesgos (fenómenos tromboembólicos arteriales y venosos, reacciones transfusionales o hemólisis) [48,49].

3.3. Niveles séricos de componentes del sistema del complemento

El sistema del complemento actúa como un instrumento efector de la respuesta inmune innata y adaptativa. Entre sus funciones se incluyen la opsonización de bacterias encapsuladas, la puesta en marcha de reacciones anafilactoides, el aclaramiento de inmunocomplejos circulantes o la inducción de lisis celular (**Tabla 3**) [50]. Sus tres vías de activación reconocen diversas señales, bien sean mediadas por anticuerpos (fracción cristalizable de IgM e IgG) o independientes de éstos (secuencias poliméricas de la superficie de los microorganismos), y confluyen sobre C3, cuya activación resulta en la constitución de la convertasa de C5 (C4bC2aC3b en las vías clásica y asociada a lectinas y [C3b]₂Bb en la vía alternativa). La convertasa de C5, a su vez, pone en marcha el complejo de ataque a membrana (C5b a C9) sobre la célula diana [51].

La monitorización del sistema del complemento se ha realizado clásicamente mediante parámetros funcionales que cuantifican su capacidad hemolítica (CH₅₀ para la vía clásica y AP₅₀ para la alternativa) [52]. La relativa complejidad técnica de este abordaje, no obstante, limita su aplicabilidad en la práctica habitual. La determinación mediante nefelometría o ELISA de los niveles séricos de algunos de sus componentes, como C3, C4 o la lectina fijadora de manosa (*mannose binding lectin* [MBL]), supone una

alternativa más accesible [53]. Otra aproximación consiste en el análisis de los determinantes genéticos que modulan la concentración sérica de MBL. Ha sido caracterizada una serie de polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms* [SNP]) en el exón 1 y en la región promotora del gen *MBL2*, localizado en el cromosoma 10 y que codifica dicho componente de la vía de las lectinas [54]. Los alelos variantes de estos SNP originan defectos en la expresión del gen y en la polimerización de la proteína que son en gran parte responsables de la amplia variabilidad interpersonal observada en la concentración sérica de MBL. Así, se estima que hasta la tercera parte de la población mundial presenta niveles deficientes de MBL, con notables diferencias étnicas en su distribución [55].

Tabla 3. Funciones del sistema del complemento.

Lisis celular (mediada por los componentes C5b-C9 [complejo de ataque a membrana])
Opsonización y fagocitosis de bacterias encapsuladas (mediada por los componentes C3b y C4b)
Aclaramiento de inmunocomplejos
Reacciones anafilactoides (mediadas por los componentes C3a, C4a y C5a)
Actividad quimiotáctica (mediada por los componente C5a)
Actividad neutrofílica y monocítica (adherencia celular y degranulación de granulocitos)

La utilidad de la monitorización de ciertos componentes del sistema del complemento a la hora de individualizar el riesgo de infección tras el TR ha sido evaluada en varios estudios. Nuestro grupo determinó las concentraciones de C3 y C4 en situación basal (pre-trasplante) y en los meses primero y sexto post-trasplante en una cohorte de 270 pacientes (**Anexo 3** [56]). Como era previsible a la luz de la posición pivotal que ocupa C3 en la cascada del complemento, este biomarcador se reveló más útil que C4. En concreto, la hipocomplementemia (HCC) a expensas de C3 en el primer mes (definida por niveles séricos de C3 <84 mg/dL) estuvo presente en el 20% de los pacientes y fue identificada como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de infección global y bacteriana durante los siguientes meses. La HCC C3 en el sexto mes también se asoció con el desarrollo de infección bacteriana tardía. Es destacable que la mortalidad global fuera significativamente mayor en el grupo de pacientes con niveles disminuidos de C3 en el primer mes [56]. Otros autores han comunicado asociaciones similares entre la HCC y la incidencia de infección tras el trasplante cardíaco [57] y hepático [58].

Las inmunidades innata y adaptativa ejercen funciones parcialmente complementarias. Se ha sugerido que la inmunosupresión que acompaña al TOS, al actuar de forma preferente sobre la respuesta

adaptativa, permite poner de manifiesto deficiencias constitutivas en el sistema del complemento que carecen de impacto clínico aparente en el huésped inmunocompetente [59]. Esta hipótesis cobra especial relevancia al considerar el efecto de los niveles de MBL y de sus determinantes genéticos sobre la susceptibilidad a la infección. Manuel et al. publicaron un caso de bacteriemia meningocócica en un receptor de TR con valores normales de C3, C4 y CH₅₀, pero indetectables de MBL [60]. Broeders et al. observaron un mayor riesgo de sepsis y de infección respiratoria en receptores de TR con niveles disminuidos de MBL [32]. En receptores de trasplante reno-pancreático simultáneo, Verschuren et al. demostraron que cada incremento de 500 ng/mL en la concentración basal de MBL se asociaba a un descenso en el riesgo posterior de infección de tracto urinario y de sepsis de origen urológico [61]. Todos estos hallazgos son congruentes con la mayor incidencia de shock séptico y otras infecciones que ha sido demostrada en receptores de injertos hepáticos procedentes de donantes portadores del alelo variante (O) en el exón 1 del gen *MBL2* en comparación con los que reciben órganos de sujetos con el alelo salvaje (hay que señalar que la MBL se sintetiza mayoritariamente en el hígado, por lo que el genotipo del donante es el principal factor que determina sus niveles séricos tras el trasplante hepático) [62,63]. El papel de la MBL como molécula de reconocimiento de patrones (*pattern recognition molecule*) explica igualmente su participación en la inmunidad antiviral. Se ha observado una mayor incidencia de infección asintomática y de enfermedad por CMV tras la interrupción de la profilaxis con valganciclovir en receptores de TR de alto riesgo con niveles disminuidos (<500 ng/mL) de MBL en la determinación basal [64]. En el contexto del trasplante hepático [65] y pulmonar [66] se han comunicado resultados similares. Otro estudio, por el contrario, no pudo concluir que los niveles basales de MBL modificaran el riesgo de infección o de enfermedad por CMV en receptores de TR, si bien los autores describieron una asociación entre esta complicación y la concentración de MASP-2 (*MBL-associated serine protease 2*), una proteasa involucrada en la vía de activación asociada a las lectinas [67]. No se ha observado mayor incidencia de nefropatía por poliomavirus BK en receptores deficientes en MBL [68].

3.4. Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

El empleo del recuento de determinadas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica como marcador subrogado del grado de inmunosupresión y, por tanto, del riesgo de infección post-trasplante, supone una extrapolación plausible al contexto del TR de la experiencia adquirida en otros huéspedes

inmunodeprimidos [8]. Por ejemplo, el recuento de linfocitos T CD4⁺ es empleado desde hace décadas para estratificar el riesgo de infección oportunista en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y para establecer la indicación de profilaxis [69]. Se ha propuesto un abordaje similar para la linfocitopenia T CD4⁺ idiopática [70]. Como se ha comentado, el uso de agentes depletorios linfocitarios es frecuente en receptores de TR. Tanto los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (muromonab-CD3 [OKT-3]) y anti-CD52 (alemtuzumab) como los policlonales, entre los que destaca la globulina antitimocítica policlonal (*antithymocyte globulin* [ATG]) derivada de conejo, ejercen un profundo impacto sobre el recuento linfocitario en sangre periférica que puede extenderse hasta más allá del primer año tras su administración [71,72]. El incremento del riesgo de infección post-trasplante vinculado a estas terapias está bien documentado [73,74] y justifica las actuales recomendaciones de estrategias específicas de prevención frente a la infección por CMV [75,76]. De forma análoga, y siguiendo la pauta establecida en el paciente con VIH, se contempla igualmente la monitorización de los linfocitos T CD4⁺ con el fin de individualizar la duración de la profilaxis frente a *Pneumocystis jirovecii* en pacientes oncohematológicos previamente tratados con alemtuzumab o análogos de purinas [77].

Sobre la base de estas evidencias preliminares son varios los estudios que han demostrado que los receptores de TR con recuentos disminuidos de linfocitos T CD4⁺ afrontan un mayor riesgo de infección por patógenos oportunistas (predominantemente intracelulares), con especial relevancia en el caso de *P. jirovecii* [78-80]. En un estudio reciente el número de linfocitos T CD4⁺ fue significativamente menor en pacientes con neumonía por *P. jirovecii* respecto al grupo control, integrado por receptores de TR que también habían sido sometidos a un lavado broncoalveolar pero en los que no se identificó este microorganismo. En el análisis multivariante la presencia de linfocitopenia absoluta (<750 céls/mcL) a lo largo de los 50 días previos al diagnóstico actuó como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de esta complicación [81]. Algunos autores han sugerido que la administración generalizada de profilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol durante los primeros meses tras el TR está retrasando el periodo de riesgo clásicamente asumido para la infección por *P. jirovecii*, con un aumento progresivo de casos de aparición muy tardía (a partir del primer año post-trasplante) [81-83]. De este modo, la monitorización selectiva del recuento de linfocitos T CD4⁺ tras determinados eventos que obliguen a incrementar el tratamiento inmunosupresor (un rechazo agudo, por ejemplo) permitiría identificar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse de la prolongación o reintroducción de la profilaxis frente a

Pneumocystis, en una estrategia de evaluación individual del riesgo de infección.

En el escenario específico del receptor de TR con infección por el VIH, Carter et al. observaron que la presencia de un recuento de linfocitos T CD4⁺ <200 céls/mcL a lo largo del seguimiento se asoció al desarrollo de infección grave y oportunista, si bien el tamaño muestral analizado era pequeño (n = 20). Como cabía esperar, los pacientes sometidos a inducción con ATG mantuvieron recuentos linfocitarios más bajos que los que recibieron anticuerpos monoclonales anti-CD25 (daclizumab o basiliximab) [84]. En una cohorte de 42 receptores de TR, en su mayor parte tratados con basiliximab, Calarota et al. observaron un recuento de linfocitos T CD8⁺ consistentemente menor durante los primeros meses post-trasplante entre los pacientes que desarrollaron alguna infección oportunista [85]. Nuestro grupo también ha explorado esta estrategia de monitorización inmunológica en 304 receptores de TR en los que llevamos a cabo la determinación de linfocitos totales y de diversas subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B y linfocitos *natural killer* [NK]) en varios puntos (situación basal y meses primero y sexto) (**Anexo 4** [86]). Entre otros hallazgos, comprobamos que la cinética de cada una de estas subpoblaciones difería marcadamente según el tipo de terapia de inducción administrada. Así, el recuento de linfocitos T CD4⁺ presentó un acusado nadir al primer mes en los pacientes tratados con ATG mientras que aumentaba ligeramente respecto a la basal entre los que no recibieron inducción o ésta consistió en basiliximab. La cinética de los linfocitos T CD8⁺ fue similar, aunque con diferencias menos evidentes. Por este motivo analizamos de forma separada en cada uno de estos dos grupos el papel predictivo de las subpoblaciones. Entre los pacientes que recibieron ATG la presencia de linfocitopenia T CD4⁺ (recuento <50 céls/mcL) en el primer mes se asoció al desarrollo de infección oportunista y, particularmente, de enfermedad por CMV durante el periodo posterior (meses 1 a 6). En el grupo sin inducción o tratado con basiliximab fueron los linfocitos T CD8⁺ los que exhibieron mejor capacidad predictiva, de forma que la presencia de linfocitopenia a expensas de esta subpoblación (recuento <100 céls/mcL) incrementó de forma significativa el riesgo de infección oportunista global. Ambos puntos de corte presentaron excelentes valores predictivos negativos (superiores al 83%) para el posterior desarrollo de infección, lo cual permitiría individualizar a un subgrupo de receptores de muy bajo riesgo en los cuales sería factible discontinuar las profilaxis habituales [86]. Recientemente hemos comunicado una asociación similar entre el recuento de linfocitos NK y el riesgo de infección fúngica invasora tras el TOS [87]. Por último, la validez de la monitorización de ciertas subpoblaciones en sangre

periférica (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) como aproximación al estado neto de inmunosupresión también se ha visto corroborado en una serie de estudios centrados en el desarrollo de neoplasia *de novo* post-trasplante [88-90], incluida nuestra propia experiencia (**Anexo 5** [91]).

3.5. Otras estrategias de monitorización inmunológica

De forma más breve serán revisados otros biomarcadores sin especificidad por patógeno que ofrecen igualmente oportunidades para la evaluación inmunológica en el receptor de TOS.

3.5.1. Monitorización de niveles séricos de la forma soluble de CD30

CD30 es una glucoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y del factor de crecimiento neural [92], clásicamente empleado como marcador de la célula de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin [93]. CD30 también se expresa en linfocitos T y B normales, linfocitos NK y células dendríticas [94]. Si bien su misión biológica aún no ha sido plenamente dilucidada, se cree que participa en la regulación del balance Th₁/Th₂ de la respuesta celular y en la generación de linfocitos T de memoria [95]. La coestimulación con células que expresan CD30 induce a los linfocitos T a polarizarse en sentido Th₂ y a sintetizar el correspondiente repertorio de citoquinas (como interleucina [IL]-4 o IL-13) [96,97]. Además de la forma de superficie celular (de 120 kDa), existe una forma soluble de 85 kDa (sCD30) generada tras la separación enzimática de su porción extracelular por parte de una metaloproteasa [98] y que es liberada al plasma durante el proceso de activación de los linfocitos T [99]. La monitorización de sCD30 ha recibido una creciente atención en los últimos años como estrategia de monitorización inmunológica en el TR [94,100]. Varios estudios han mostrado que los niveles basales de sCD30 se relacionan de forma inversa con la supervivencia del injerto [100-104]. Este efecto deletéreo sobre el pronóstico del injerto es sinérgico al ejercido por la sensibilización pre-trasplante o el número de incompatibilidades del antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen* [HLA]) entre donante y receptor [105]. Se ha sugerido que los niveles elevados de sCD30, en su condición de marcador de activación de la subpoblación linfocitaria Th₂, es mejor predictor del riesgo de rechazo humoral que del de rechazo celular [94,106].

La utilidad de sCD30 como biomarcador del riesgo de infección post-trasplante ha sido explorada en un número reducido de trabajos con resultados discordantes. Un estudio realizado entre receptores de TR demostró que los pacientes que sufrieron algún episodio de neumonía partían de niveles basales de

sCD30 significativamente menores respecto a los que permanecieron libres de esta complicación [107]. Nikaein et al. también observaron que las concentraciones pre-trasplante reducidas de sCD30 se asociaban a un mayor riesgo de infección tras el trasplante cardíaco [108]. Sin embargo estos mismos autores comunicaron la asociación inversa (niveles basales más elevados de sCD30 en pacientes con infección posterior) en el contexto del TR [109]. En nuestra experiencia con 101 receptores de TR los niveles basales de sCD30 fueron significativamente mayores en aquellos pacientes que desarrollaron alguna infección bacteriana durante los primeros 12 meses post-trasplante, asociación que se mantuvo después de ajustar por otras variables en un modelo multivariante. Como explicación proponemos que el nivel de sCD30 actúa fundamentalmente como un marcador de actividad de los linfocitos Th₂, que ofrecen una respuesta protectora frente a patógenos bacterianos menos eficaz que los linfocitos con diferenciación Th₁ o Th₁₇ [94].

3.5.2. Monitorización de la viremia por virus de Epstein-Barr y anellovirus

La monitorización, mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]), de la carga viral en sangre completa o muestras acelulares de determinados virus que infectan de forma latente al hospedador y cuyo control replicativo reside en la inmunidad celular adaptativa puede ofrecer una aproximación a la competencia inmunológica del receptor de TOS. La reactivación de estos virus latentes, aun siendo asintomática, constituiría un parámetro subrogado del grado de funcionalidad de la respuesta inmune. Según esta hipótesis podríamos disponer de biomarcadores muy sensibles que actuarían como un “sumatorio funcional” de la carga global de inmunosupresión. Hasta ahora son fundamentalmente dos los agentes explorados con esta finalidad: el virus de Epstein-Barr (VEB) y los miembros de la familia *Anelloviridae* (anellovirus). El primero de ellos tiene la capacidad, gracias a un amplio repertorio de mecanismos de evasión inmune, de establecer una infección latente en el compartimento de linfocitos B que dura toda la vida del huésped [110]. Se ha comprobado que la reactivación del VEB es un fenómeno frecuente en receptores de TOS [111-113]. Si bien este fenómeno replicativo es subclínico en la mayor parte de las ocasiones, puede llegar a producir daño orgánico directo o contribuir indirectamente a la patogénesis del síndrome linfoproliferativo post-trasplante [114]. Varios grupos, incluyendo el nuestro, han trabajado con la viremia de VEB como marcador de competencia funcional de la respuesta inmune celular en receptores de trasplante cardíaco, pulmonar y renal [115-117].

Los anellovirus, por su parte, son virus de pequeño tamaño carentes de envoltura que exhiben una gran diversidad genética [118]. El primer anellovirus identificado fue denominado Torque Teno virus [119], seguido tres años después del Torque Teno Mini virus [120]. La primoinfección tiene lugar en edades tempranas a través de diversas vías, tras lo que establecen una infección latente fundamentalmente en células mononucleares de sangre periférica [121]. De este modo la prevalencia de infección por TTV y TTMV en población general adulta supera el 90% y su replicación transitoria a bajo nivel es frecuente entre sujetos inmunocompetentes [122]. No ha podido ser demostrado hasta la fecha ningún efecto patogénico directamente atribuible en el ser humano (“virus huérfanos”). No obstante, varios estudios han demostrado que la reactivación de la infección latente por anellovirus es más frecuente en pacientes con enfermedades crónicas debilitantes, cáncer o infección por el VIH respecto a sujetos sanos [123-126]. Este hallazgo podría ser explicado por el papel fundamental que la inmunidad mediada por células desempeña en el control de la replicación viral. En base a esta evidencia se ha tratado de evaluar la potencial utilidad que la monitorización de la viremia por anellovirus (fundamentalmente Torque Teno virus) podría tener como aproximación a la carga global de inmunosupresión en diversos tipos de receptores de TOS, incluyendo renal [127], hepático [128,129] y pulmonar [130].

3.6. Limitaciones de estudios previos y justificación de la presente investigación

En vista de la evidencia científica expuesta, la aplicación de estrategias de monitorización inmunológica basadas en biomarcadores sin especificidad por patógeno ofrecería, sobre el papel, la posibilidad de individualizar el riesgo de infección en receptores de TR, optimizando así los resultados a largo plazo de este procedimiento. Si bien se han realizado avances prometedores en este sentido, la evidencia basada en ensayos clínicos u otras estrategias de intervención es hasta el momento escasa [7,44-46]. Además, la mayor parte de los estudios previos se ven limitados por su reducido tamaño muestral, habitualmente circunscrito a un único centro y con periodos de seguimiento tras el trasplante relativamente cortos. Los mecanismos moleculares y celulares implicados en la respuesta frente a la infección son complejos y con frecuencia redundantes. Por desgracia, los trabajos publicados se centran por regla general en la monitorización de un único biomarcador o parámetro inmunológico, adoleciendo así de una naturaleza unidimensional. Sin embargo el diseño de cualquier estrategia de monitorización debe ponderar tanto la sensibilidad y especificidad del parámetro empleado, por un lado, como su disponibilidad y aplicabilidad

en la práctica clínica, por otro [8]. Por otra parte, la susceptibilidad individual a la infección no sólo está condicionada por la situación inmunológica del huésped. Otros factores, tales como la enfermedad de base, la función del injerto, las manipulaciones quirúrgicas, los procedimientos invasivos o el estado nutricional, contribuyen igualmente a la patogenia de esta complicación [131].

Nuestro grupo de investigación ha venido trabajando en los últimos años en la utilidad y aplicabilidad clínica de una serie de estrategias de monitorización inmunológica post-trasplante basadas en parámetros evaluados de forma independiente: recuento de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica [86,91,132,133], niveles séricos de inmunoglobulinas [27,36] y niveles séricos de componentes del sistema del complemento [56] (las referencias más relevantes están disponibles como **Anexos 1 a 5**). Aventuramos que la elaboración y posterior validación de un modelo predictivo multidimensional que incorpore varios de estos biomarcadores, así como otras variables seleccionadas de naturaleza clínica, podría ser de utilidad a la hora de asignar un riesgo concreto de infección a cada receptor de TR, facilitando con ello decisiones asistenciales relacionadas con el ajuste del tratamiento inmunosupresor o la indicación y duración de la profilaxis antimicrobiana.

4. HIPÓTESIS

La combinación en un modelo predictivo ponderado de una serie de variables clínicas y de parámetros inmunológicos sin especificidad por patógeno (recuento de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y niveles séricos de inmunoglobulinas y de factores de complemento) podría constituir un abordaje útil para predecir el desarrollo de complicaciones infecciosas en receptores de TR. Una vez validado, dicho modelo ofrecería la posibilidad de individualizar el proceso de toma de decisiones terapéuticas y de profilaxis con arreglo al riesgo concreto de cada paciente en un momento determinado de su evolución post-trasplante.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el riesgo individual de infección (tanto global como, específicamente, de naturaleza bacteriana) en receptores de TR mediante la monitorización de una serie de parámetros inmunológicos no patógeno-específicos: cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica (linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B y linfocitos NK) y niveles séricos de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) y de factores de complemento (C3 y C4).

5.2. Objetivos específicos

1. Desarrollar, a partir de dichos parámetros inmunológicos combinados con variables de carácter clínico, una serie de modelos predictivos del riesgo de infección global y de infección bacteriana a lo largo de diversos periodos post-trasplante entre los receptores de TR incluidos en una cohorte de derivación.
2. Establecer el rendimiento (capacidad de discriminación, exactitud diagnóstica y valor incremental) de dichos modelos en la cohorte de derivación.
3. Evaluar la reproducibilidad y calibración de los modelos predictivos así obtenidos en una cohorte independiente de validación.
4. Describir la cinética post-trasplante de los parámetros inmunológicos analizados (recuentos de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y niveles séricos de inmunoglobulinas y de factores de complemento).

6. PACIENTES Y MÉTODOS

6.1. **Ámbito y diseño del estudio**

6.1.1. *Ámbito de realización del estudio*

El presente estudio fue realizado en el Hospital Universitario “12 de Octubre” (HU12O) de Madrid, un centro de tercer nivel adscrito a la Universidad Complutense. El número de camas de hospitalización instaladas se mantuvo básicamente estable a lo largo del periodo de estudio (variación: 1.363 [2008] a 1.322 [2013]), así como la población de referencia atendida (variación: 432.861 [2008] a 427.401 [2013]) y el número de ingresos anuales (variación: 42.981 [2008] a 42.375 [2013]).

Desde el año 1976 se viene desarrollando en el HU12O un activo programa de TOS, tanto en población adulta como pediátrica, que engloba prácticamente todas sus modalidades (excepto el doble trasplante combinado cardiopulmonar). El TR ocupa el primer puesto en cuanto a número de procedimientos realizados, que se mantuvo estable en unos 150 anuales a lo largo del periodo de estudio (variación: 161 [2008] a 141 [2013]). En este tipo de TOS el HU12O se ha significado durante varios años consecutivos como el de mayor actividad en todo el territorio nacional, sumando un total de 3.872 procedimientos de TR realizados desde el inicio del programa hasta 2016.

Desde 1991 la Unidad de Enfermedades Infecciosas del HU12O centra parte de su actividad asistencial e investigadora en el diagnóstico, tratamiento y prevención de las complicaciones infecciosas en receptores de TOS. Esta tarea se desempeña en calidad de interconsultores y en estrecha colaboración con el resto de los servicios implicados, tanto clínicos (Nefrología y Coordinación de Trasplantes en el caso del TR) como centrales (Microbiología e Inmunología). Cabe destacar que miembros de la Unidad de Enfermedades Infecciosas han participado en la elaboración de protocolos y guías de práctica clínica centradas en el receptor de TOS (e.g., gripe, tuberculosis, infecciones por bacilos Gram negativos multirresistentes o infecciones transmitidas por el donante), tanto en el ámbito institucional como nacional y europeo [134-137]. Por otra parte, el HU12O cuenta con un equipo de atención continuada (24 horas) de Nefrología de Guardia, que se encarga de valorar a todos los receptores de TR que acuden al Servicio de Urgencias y decidir, si procediera, el ingreso en sala de hospitalización.

6.1.2. *Diseño y periodo del estudio*

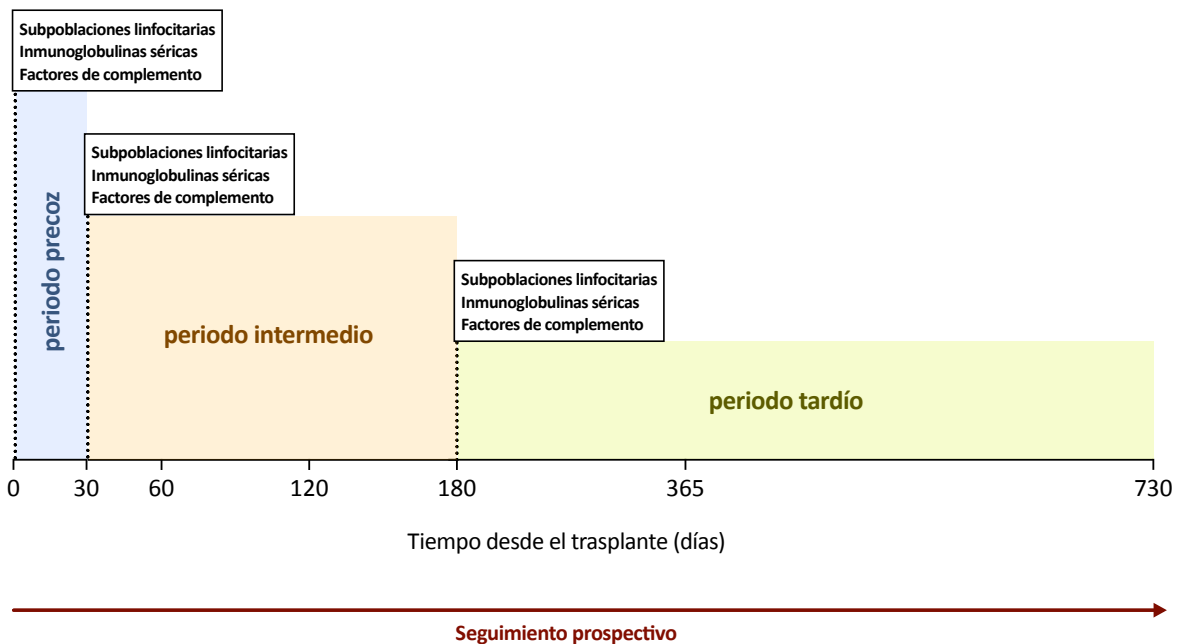
Llevamos a cabo un análisis retrospectivo de una cohorte observacional longitudinal con datos recogidos prospectivamente de receptores de TR. A fin de construir y evaluar los modelos predictivos de infección

se realizó de forma aleatoria una segmentación de la misma en dos grupos independientes: *cohorte de derivación* (aproximadamente 66,6% de la muestra global) y *cohorte de validación* (33,3% restante).

El periodo de reclutamiento abarcó desde Noviembre de 2008 hasta Marzo de 2013. El seguimiento fue censurado a 29 de Febrero de 2016 o, alternativamente, en la fecha de último contacto conocido en el HU120. Todos los participantes fueron seguidos durante un mínimo de 12 meses desde la realización del TR, excepto en caso de que el fallecimiento y/o la pérdida definitiva del injerto tuvieran lugar antes de haber completado este primer año post-trasplante.

En función del esquema temporal clásico de infección en receptores de TOS propuesto por Fishman [138], y considerando el cronograma de monitorización inmunológica aplicado, se dividió el seguimiento en tres periodos diferenciados: precoz (primer mes post-trasplante), intermedio (meses 1 a 6) y tardío (desde el mes 6 post-trasplante hasta el final de seguimiento) (**Figura 2**).

Figura 2. Cronograma del estudio.



Todos los análisis relacionados con la derivación y validación de los modelos fueron replicados de forma consecutiva para cada uno de estos tres periodos. Únicamente para la descripción global de la cohorte se tomó como referencia el periodo de seguimiento post-trasplante en su totalidad (no segmentado).

6.1.3. Objetivo del estudio

El objetivo de evaluación (*outcome*) del estudio consistió en el desarrollo de infección post-trasplante, tanto global como específicamente bacteriana, a lo largo de cada uno de los periodos antes referidos

(precoz [primer mes], intermedio [meses 1 a 6] y tardío [a partir del mes 6]). Para ser considerado como tal, en el episodio de infección (definido en la sección 4.4) se tuvieron que verificar dos requisitos: (a) necesidad de ingreso hospitalario u observación en el Servicio de Urgencias durante un mínimo de 24 horas; y (b) administración de tratamiento antibiótico, antiviral, antifúngico o antiparasitario (ya fuera empírico o dirigido). Por su relevancia clínica también fueron analizados dentro de esta categoría ciertos episodios de infección típicamente oportunista aunque no llegaran a requerir ingreso hospitalario (e.g., zóster no complicado o infección herpética orolabial). Fueron excluidos los episodios de bacteriuria asintomática, infección de tracto urinario inferior no complicada (cistitis), e infección asintomática por virus del grupo herpes (CMV y VEB) y poliomavirus JC.

6.2. Selección de participantes

Fueron reclutados en el estudio todos los pacientes con enfermedad renal terminal sometidos de forma consecutiva a TR en el HU12O a lo largo del periodo indicado y que cumplieran todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión que se detallan a continuación:

a) Criterios de inclusión:

1. Edad del receptor ≥ 18 años en el momento del trasplante;
2. Disponibilidad para mantener un seguimiento clínico y analítico habitual en el HU12O durante, al menos, el primer año post-trasplante;
3. Disponibilidad para ser sometido a la monitorización (con arreglo al cronograma detallado en la sección 4.3.2) de los parámetros inmunológicos contemplados en los modelos de predicción;
4. Otorgamiento del consentimiento expreso por escrito para la participación en el estudio.

b) Criterios de exclusión:

1. Realización simultánea de doble trasplante que incluya el injerto renal (e.g., pancreato-renal);
2. Diagnóstico pre-trasplante de infección por el VIH o de algún síndrome de inmunodeficiencia primaria (e.g., inmunodeficiencia combinada variable o linfocitopenia T CD4⁺ idiopática);
3. Fallecimiento a lo largo de la primera semana post-trasplante;
4. Ausencia de función del injerto (no función primaria);
5. Pérdida del injerto con explante del órgano y/o retirada de la inmunosupresión a lo largo de la primera semana post-trasplante.

6.3. Procedimientos del estudio

6.3.1. Seguimiento clínico

Tras la inclusión del participante se llevó a cabo su seguimiento en las consultas externas de la Unidad de Trasplante Renal del Servicio de Nefrología del HU120 mediante una serie de visitas programadas según la práctica habitual: cada 2 semanas durante los 3 primeros meses, mensualmente entre los meses 4 y 12, y con periodicidad bimensual hasta el segundo año post-trasplante. En cada una de estas visitas se realizó una anamnesis y examen físico completos. A este esquema se sumaron cuantas visitas adicionales y/o atenciones en el Servicio de Urgencias requiriera la situación clínica del paciente.

Todos los episodios de infección que requirieron ingreso hospitalario fueron evaluados por un médico adjunto de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de forma conjunta con el nefrólogo tratante del paciente. Esta labor de interconsulta también se llevó a cabo en la mayor parte de los episodios de infección tratados de forma ambulatoria, con la excepción de los cuadros de bacteriuria asintomática e infecciones de tracto urinario inferior no complicadas.

6.3.2. Monitorización inmunológica

En cada una de las visitas programadas se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de hemograma (con fórmula leucocitaria), bioquímica completa (con perfil hepático y renal), estudio de coagulación, concentraciones plasmáticas de fármacos inmunosupresores (anti-calcineurínicos, ácido micofenólico e inhibidores de la mTOR), sedimento de orina y proteinuria de 24 horas.

A este seguimiento analítico se añadió en 3 ocasiones la extracción de aproximadamente 10 cc suplementarios de sangre completa en tubos tipo Vacutainer con EDTA para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias y la determinación de niveles séricos de inmunoglobulinas y factores de complemento según un cronograma pre-establecido: momento basal o pre-trasplante (en las 12 horas previas al procedimiento) y meses 1 y 6 post-trasplante (**Figura 2**).

La *cuantificación de subpoblaciones linfocitarias* en sangre periférica (linfocitos T CD3⁺ totales, linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺, linfocitos B [CD19⁺] y linfocitos NK [CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺]) se llevó a cabo en una plataforma automatizada de citometría de flujo multiparamétrica (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, EEUU) dentro de las primeras 18 horas desde la extracción. En primer lugar se tiñó durante 15 minutos un volumen de 50 µL de sangre completa anticoagulada en EDTA con 10 µL de

reactivo *BD Multitest 6-color TBNK reagent*. A continuación los hematíes de la muestra fueron lisados con una solución de lisis (*fluorescence-activated cell sorting [FACS] lysing solution*), y se analizaron los datos inmediatamente después de la tinción mediante un citómetro de flujo (*FACS Canto II Flow Cytometer*) y el correspondiente *software* de adquisición *FACS Canto Clinical software* (todos ellos de BD Biosciences, San José, CA, EEUU). Los anticuerpos monoclonales estaban conjugados con fluoresceína-isotiocianato (anti-CD3), ficoeritrina (anti-CD8, anti-CD16 y anti-CD56), proteína peridina-clorofila (anti-CD45) y aloficocianina (anti-CD19 y anti-CD4) [139].

Los niveles séricos de las principales clases de inmunoglobulinas (IgM, IgA e IgG) fueron determinados mediante nefelometría (Image-system Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Alemania). No se realizó un análisis individualizado por sub-clases de inmunoglobulinas. Los rangos de normalidad establecidos por el Scio. de Inmunología del HU120 fueron: IgG 700-1600 mg/mL, IgA 70-400 mg/dL e IgM 40-230 mg/dL. Los niveles séricos de factores de complemento (C3 y C4) también fueron determinados por nefelometría (Image 800, Beckman Coulter, Villepinte, Francia). Los rangos de normalidad establecidos en nuestro centro fueron: C3 83-171 mg/dL y C4 14-38 mg/dL.

6.3.3. Regímenes de inmunosupresión

- a) *Tratamiento de inducción*: Se administró ATG de conejo (ATG-Fresenius® [1 mg/Kg/día]) durante 5-7 días con introducción retrasada de tacrólimus (a partir del sexto día post-trasplante) a todos los receptores de órganos procedentes de donante tras muerte circulatoria (asistolia), a fin de minimizar el riesgo de nefrotoxicidad inducida por anti-calcineurínicos. También recibieron inducción con ATG durante 1 a 3 días con introducción precoz de tacrólimus (a partir del primer día post-trasplante) aquellos receptores con criterios de alto grado de riesgo inmunológico: panel reactivo de anticuerpos >50%, receptores de un segundo TR si el anterior se perdió por rechazo en los dos años previo, y receptores de un tercer o cuarto trasplante. El tratamiento de inducción con anticuerpo monoclonal anti-CD25 (basiliximab, Simulect® [25 mg/día los días 0 y 4]) con introducción retrasada de tacrólimus (a partir del quinto día post-trasplante) fue reservado a pacientes con riesgo elevado de nefrotoxicidad inducida por anti-calcineurínicos debido a su edad avanzada o comorbilidades pre-trasplante. Se añadió rituximab (375 mg/m² de superficie corporal en un número de dosis variable) al tratamiento de inducción con ATG o

basiliximab en pacientes hiperinmunizados con anticuerpos anti-HLA específicos de donante o como prevención de la recidiva de la glomeruloesclerosis segmentaria y focal.

b) *Tratamiento de mantenimiento:* Consistió en una triple pauta con tacrólimus (0,1 mg/Kg/día ajustado para mantener concentraciones plasmáticas valle de 10-15 ng/mL durante el primer mes post-trasplante y de 5-10 ng/mL posteriormente); mofetil micofenolato (1.000 mg cada 12 horas) o ácido micofenólico (360 mg cada 12 horas); y prednisona (1 mg/Kg/día con disminución progresiva de dosis). Se empleó azatioprina (1-4 mg/Kg/día) como antimetabolito en sustitución de mofetil micofenolato o ácido micofenólico en pacientes con retraso en la cicatrización y/o otras complicaciones de la herida quirúrgica. Los inhibidores de la mTOR no fueron incluidos en los regímenes primarios de inmunosupresión, si bien se llevó a cabo una conversión secundaria a everólimus (0,75 mg cada 12 horas ajustado para mantener concentraciones plasmáticas valle de 4-6 ng/mL) con interrupción del antimetabolito y disminución de la dosis de tacrólimus (concentraciones plasmáticas valle de 4-6 ng/mL) en casos seleccionados de nefrotoxicidad por anti-calcineurínicos o complicaciones post-trasplante asociadas al exceso de inmunosupresión (neoplasia *de novo* o viremia persistente por VEB).

6.3.4. Regímenes de profilaxis

Todos los pacientes recibieron una dosis única de cefazolina intravenosa (o vancomicina en caso de alergia documentada a β -lactámicos) como profilaxis antibiótica pre-quirúrgica. La profilaxis frente a la neumonía por *P. jirovecii* consistió en trimetoprim/sulfametoxazol (160/800 mg 3 veces por semana) o pentamidina nebulizada (300 mg cada 3-4 semanas en caso de alergia documentada a sulfamidas) durante los primeros 9 meses post-trasplante. Los pacientes con riesgo elevado de enfermedad por CMV (discordancia serológica entre donante y receptor [D⁺/R⁻] o tratamiento de inducción con ATG) recibieron profilaxis universal con ganciclovir intravenoso (5 mg/Kg/día) o con valganciclovir oral (900 mg/día), con ajuste en ambos casos según función renal, durante 3-6 meses, siguiendo las recomendaciones actuales tanto nacionales [140] como internacionales [75]. No se monitorizó de forma rutinaria la viremia por CMV en ausencia de sintomatología compatible en los pacientes con riesgo intermedio de enfermedad por CMV (seropositivos [R⁺] sin tratamiento de inducción con ATG) con vistas a la adopción de una estrategia de tratamiento anticipado. En algunos casos seleccionados (neumopatía pre-trasplante, retraso en la función del injerto o aislamiento de *Aspergillus* spp. en muestras

respiratorias) se administró profilaxis frente a hongos filamentosos con una equinocandina (anidulafungina habitualmente) durante 2-3 semanas.

6.3.5. Recogida de datos clínicos

Mediante un cuaderno de recogida de datos estandarizado y con arreglo al conjunto de definiciones que se detallan en el apartado 6.4 se cumplimentó de forma prospectiva una base de datos digitalizada, protegida y debidamente anonimizada. Las variables se agruparon en cinco grandes categorías:

- a) *Variables relacionadas con el receptor:* características demográficas (edad y género); principales comorbilidades crónicas pre-trasplante (hipertensión arterial, diabetes mellitus, enfermedad aterotrombótica [cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular y/o enfermedad arterial periférica], fibrilación auricular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], asma y hepatopatía); inmunodepresión pre-trasplante y causa de la misma (si procede); etiología de la enfermedad renal de base; modalidad y tiempo de diálisis pre-trasplante (si procede); y estado serológico frente a VVZ, CMV, VEB, virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC).
- b) *Variables relacionadas con el donante:* características demográficas (edad y género); tipo de donación (muerte encefálica o cerebral, muerte cardíaca o circulatoria [asistolia] o donación de vivo); causa de la muerte (accidente cerebrovascular agudo, traumatismo craneoencefálico, encefalopatía post-anóxica o parada cardíaca); y estado serológico frente a CMV.
- c) *Variables relacionadas con el procedimiento quirúrgico y pautas de inmunosupresión y profilaxis:* tiempo de isquemia fría; grado de compatibilidad HLA entre donante y receptor; tipo de TR (único o doble); transfusión de hemoderivados durante el procedimiento; necesidad de ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) o de ventilación mecánica invasiva en el periodo post-operatorio precoz; tipo de tratamiento de inducción; composición de la pauta primaria de inmunosupresión; y profilaxis (frente a *P. jirovecii*, CMV y hongos filamentosos).
- d) *Complicaciones post-trasplante de naturaleza no infecciosa:* reintervención quirúrgica; retraso en la función del injerto; rechazo agudo o crónico del injerto; diabetes mellitus *de novo* post-trasplante; estenosis de la arteria renal; pérdida del injerto; y mortalidad de cualquier causa.
- e) *Complicaciones post-trasplante de naturaleza infecciosa:* naturaleza (bacteriana, vírica, fúngica o parasitaria); síndrome clínico; fecha de diagnóstico; y microorganismo causal.

6.4. Definiciones empleadas

- *Bacteriemia*: aislamiento de bacterias en al menos un set (botella aerobia, anaerobia o ambas) de hemocultivos. El diagnóstico de bacteriemia por microorganismos habitualmente integrantes de la flora saprofita cutánea (e.g., estafilococos coagulasa-negativos, *Bacillus* spp. o difteroides) requirió el aislamiento de dichas bacterias en al menos dos sets de hemocultivos junto con fiebre, escalofríos y/o hipotensión. Dentro de esta definición se distinguieron a su vez: *bacteriemia primaria* (sin foco infeccioso identificable), *bacteriemia asociada a catéter intravascular* [141] y *bacteriemia secundaria* a otro foco infeccioso (e.g., urológico, respiratorio, partes blandas o intraabdominal).
- *Diarrea asociada a C. difficile*: presencia de diarrea (3 o más deposiciones diarias de consistencia líquida [tipo 7 de clasificación de Bristol]) con demostración de cepa toxigénica de *C. difficile* en una muestra de heces mediante detección de enterotoxina A/B por enzimoimmunoensayo (TechLab® *C. diff* Quik Chek Complete™, Inverness Medical Innovations, Princeton, NJ, EEUU) o PCR (Xpert® *C. difficile* PCR assay, Cepheid, Sunnyvale, CA, EEUU) [142].
- *Enfermedad por CMV*: englobó dos formas clínicas: síndrome viral y enfermedad de órgano diana. El diagnóstico de *síndrome viral* requirió la demostración de replicación de CMV en sangre completa o plasma mediante antigenemia pp65 o PCR en presencia de fiebre (>37,8°C) y al menos uno de los siguientes hallazgos: leucopenia (<3.500 céls/mcL si el recuento basal fue ≥4.000 céls/mcL o disminución del 20% si el recuento basal fue <4.000 céls/mcL), linfocitosis atípica (>3% del recuento linfocitario total), trombocitopenia (<100.000 céls/mcL si el recuento basal fue ≥115.000 céls/mcL o disminución del 20% si el recuento basal fue <100.000 céls/mcL), o elevación de AST o ALT (≥2 veces el valor superior de normalidad). El diagnóstico probado de *enfermedad de órgano diana* (hepatitis, gastritis, colitis o neumonitis) precisó de la presencia de manifestaciones clínicas o endoscópicas compatibles asociadas a la demostración en una muestra de tejido de replicación de CMV mediante cultivo, inmunohistoquímica, histología (efecto citopático característico) o técnicas moleculares. La presencia de manifestaciones clínicas o endoscópicas compatibles asociadas a la replicación de CMV en sangre completa o plasma fue considerada, por su parte, como diagnóstico posible [143].
- *Filtrado glomerular estimado (FGe)*: calculado mediante la ecuación *Modification of Diet in Renal Disease* con 4 variables (MDRD-4) [144].

- *Función retrasada del injerto*: necesidad de al menos una sesión de diálisis a lo largo de las 2 primeras semanas post-trasplante.
- *Grado de compatibilidad HLA*: número de incompatibilidades entre el donante y el receptor en antígenos HLA DR, B y A, determinadas mediante microlinfocitotoxicidad (One Lambda, Canogo Park, CA, EEUU). Cada uno de los *loci* de un determinado gen HLA tiene dos alelos, por lo que podía haber un total de 6 incompatibilidades entre donante y receptor.
- *Infección de tracto respiratorio bajo*: presencia de tos con esputo purulento o cambios en las características del mismo, sin alteraciones en la radiografía de tórax. No se consideró imprescindible el aislamiento microbiológico para el diagnóstico, aunque sí que el clínico hubiera decidido iniciar tratamiento antibiótico para ese proceso. En los casos en los que se sospechó una etiología viral se recogió un exudado nasofaríngeo con torunda en un medio específico para virus (ViralPack®, Biomedics, Madrid, España) con realización sobre la muestra de un ensayo de PCR múltiple comercial (Hexaplex®, Prodesse, Wisconsin, EEUU) capaz de detectar la presencia de los siguientes virus: gripe tipo A y B, virus respiratorio sincitial tipo A y B, y virus parainfluenza tipos 1, 2 y 3.
- *Infección del lecho quirúrgico*: infección en los 30 primeros días tras la intervención (o hasta 12 meses en presencia de material protésico) con afectación de piel y tejido celular subcutáneo (*infección incisional superficial*), fascia y planos musculares (*infección incisional profunda*), u órganos o cavidades manipulados durante la intervención (*infección de órgano/espacio*), con aislamiento del mismo microorganismo en al menos dos cultivos obtenidos de forma aséptica (preferiblemente mediante aspiración con jeringa o muestra obtenida en el curso de una exploración intraoperatoria).
- *Infección fúngica invasiva*: diagnóstico de caso probado o probable establecido con arreglo a los criterios propuestos por el *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group* [145]. No se consideraron en el análisis los casos de infección fúngica invasora posible.
- *Infección post-trasplante*: aislamiento de un microorganismo relevante desde un punto de vista clínico en una localización habitualmente estéril, o bien en cualquier localización siempre que se acompañara de manifestaciones clínicas compatibles; también se consideró como tal si hubo sospecha clínica sin aislamiento microbiológico, aunque con respuesta al tratamiento antimicrobiano empírico. Como se detalla en la sección 4.1.3, el episodio tuvo que cumplir ciertos requisitos para ser

considerado como objetivo de evaluación (*outcome*) del estudio. Los episodios en los que se asumió una etiología bacteriana (documentación microbiológica y/o respuesta clínica al tratamiento antibiótico) fueron analizados de forma independiente.

- *Inmunosupresión pre-trasplante*: tratamiento con corticoesteroides (prednisona a dosis ≥ 5 mg/día o equivalente durante 2 o más semanas) u otros fármacos inmunosupresores (e.g., ciclofosfamida o rituximab) a lo largo de los 6 meses previos al trasplante.
- *Neumonía*: presencia de tos con esputo purulento o cambios en las características del mismo, dolor torácico pleurítico e infiltrado pulmonar, consolidación o cavitación en la radiografía de tórax. No se consideró imprescindible el aislamiento microbiológico para el diagnóstico, aunque sí que el clínico responsable hubiera hecho tal diagnóstico y decidido iniciar tratamiento antibiótico.
- *Pérdida del injerto*: retorno definitivo a diálisis o retrasplante, con o sin explante del injerto previo.
- *Pielonefritis aguda*: presencia de bacteriuria significativa ($>10^5$ unidades formadoras de colonias [UFC]/mL de la misma bacteria en dos muestras de orina espontánea consecutivas en mujeres o en una única muestra en varones, o bien $>10^2$ UFC/mL en una muestra de orina obtenida mediante sondaje o punción suprapúbica tanto en mujeres como en varones), fiebre ($>37,8^\circ\text{C}$) y al menos uno de los siguientes: dolor lumbar, dolor a nivel del injerto, escalofríos o síndrome miccional [146].
- *Rechazo agudo del injerto*: presencia de criterios histológicos propuestos en la clasificación de Banff 2015 [147] para el rechazo agudo mediado por linfocitos T, o en la clasificación de Banff 2013 [148] para el rechazo agudo mediado por anticuerpos. En ausencia de confirmación histológica se aceptó como diagnóstico de probabilidad el desarrollo de deterioro agudo del FGe sin causa alternativa con posterior normalización tras el aumento del tratamiento inmunosupresor (administración de bolos de corticoesteroides o 1 o varias dosis de ATG).
- *Serología positiva frente a CMV*: demostración de anticuerpos IgG frente a CMV en suero mediante un método de quimioluminiscencia (LIAISON®, DiaSorin, Saluggia, Italia).
- *Serología positiva frente a VHC*: demostración de anticuerpos IgG frente a VHC en suero mediante inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (ARCHITECT®, Abbot, Weisbaden, Alemania).
- *Tiempo de isquemia fría*: tiempo transcurrido (en horas) desde la implantación del injerto hasta la reperusión del órgano.

- *Tuberculosis*: presencia de manifestaciones clínicas y radiológicas compatibles acompañadas del aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* complex en cultivo o su identificación mediante PCR en una muestra clínica representativa, o bien de demostración histopatológica [135].

6.5. Aspectos éticos

Se les ofreció a todos los potenciales participantes se les entregó una Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado (**Anexo 6**), que debió ser firmado por el paciente o por su representante legal antes de ser incluidos en el estudio. Toda la información fue tratada de forma estrictamente confidencial con arreglo a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y a Ley de Investigación Biomédica 14/2007. El protocolo original del estudio de monitorización inmunológica (investigador principal: Dr. Francisco López Medrano) a partir del cual se ha diseñado la presente investigación fue evaluado y posteriormente aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HU12O (código interno: 09/176), con fecha de 3 de Julio de 2009 (**Anexo 7**).

6.6. Análisis estadístico

6.6.1. Estadística descriptiva y consideraciones generales

Las variables cualitativas fueron expresaron como frecuencias absolutas (n) y porcentajes (%). Las variables cuantitativas se describieron mediante sus medidas de tendencia central (media o mediana) acompañadas de la correspondiente medida de dispersión (desviación estándar [DE] o rango intercuartílico [RIQ], respectivamente), según presentaran o no una distribución asimilable a la normalidad. La normalidad de la distribución de las variables cuantitativas fue evaluada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La igualdad de varianzas fue testada mediante la prueba de Levène.

Las variables categóricas fueron comparadas mediante el test de χ^2 , excepto en los casos en los que la frecuencia absoluta esperada fuera <5 en más del 20% de las casillas, situación en la que se aplicó el test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas continuas fueron comparadas mediante la prueba de la t de Student cuando presentaban una distribución normal, o con la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney en caso de que su distribución no se ajustara a la normalidad. Para la comparación de medidas repetidas o pareadas (e.g., un parámetro inmunológico medido en diversos puntos) se emplearon los tests de McNemar y de Wilcoxon para variables cualitativas y cuantitativas, respectivamente. Las asociaciones entre variables fueron expresadas mediante sus razones de ventajas (*odds ratios* [OR]) o

cocientes de riesgos instantáneos (*hazard ratios* [HR]), según procediera, con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%.

Se fijó un valor de $P < 0,05$ como nivel de significación estadística. Todos los tests de contraste de hipótesis fueron bilaterales (dos colas). Se empleó el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU) para la realización de todos los análisis, en tanto que los gráficos fueron generados con Prism versión 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU).

6.6.2. Diseño de los modelos predictivos

Como se ha detallado anteriormente, la cohorte global integrada por todos los pacientes incluidos en el estudio fue segmentada de forma aleatoria en dos grupos independientes: cohorte de derivación (66,6% de los participantes) y de validación (33,3% restante). A partir de la primera de ellas se construyeron una serie de modelos predictivos para infección global y para infección bacteriana en cada uno de los tres periodos post-trasplante analizados (precoz, intermedio y tardío):

- *Modelo clínico*: basado exclusivamente en variables de naturaleza clínica que estuvieran presentes al principio de cada periodo en riesgo (e.g., en los modelos centrados en el periodo precoz sólo se incluyeron variables pre-trasplante y relacionadas con el procedimiento quirúrgico).
- *Modelo inmunológico*: basado exclusivamente en los parámetros inmunológicos incluidos en la estrategia de monitorización (subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y niveles séricos de inmunoglobulinas y de factores de complemento). En cada conjunto de modelos se emplearon los parámetros disponibles al principio de cada periodo de riesgo (e.g., parámetros en el mes 1 para los modelos del periodo intermedio, o parámetros en el mes 6 para los del periodo tardío).
- *Modelo combinado (clínico e inmunológico)*: basado en variables tanto clínicas como inmunológicas, con los criterios aplicados a cada una de ellas antes expuestos. A no ser que se indique lo contrario, todos los cálculos subsiguientes referidos a la capacidad de discriminación, exactitud diagnóstica, valor incremental, reproducibilidad y calibración fueron aplicados únicamente a este conjunto de modelos predictivos combinados.

6.6.3. Construcción de los modelos en la cohorte de derivación

En primer lugar se construyeron los modelos predictivos clínicos. Para ello se llevó a cabo un análisis univariado comparando las características de los pacientes con o sin infección a lo largo del periodo

considerado. Las variables que presentaron un valor de $P < 0,1$ en dicho análisis fueron incluidas en un modelo multivariante de riesgos proporcionales de Cox con proceso de selección de variables por pasos hacia atrás (*backward*). A partir de los coeficientes β de aquellas variables que mantuvieron la significación estadística en el paso final se elaboraron los modelos clínicos correspondientes.

A continuación se analizó la correlación entre los parámetros inmunológicos y el desarrollo de infección en cada periodo. Para ello se tomaron estas variables bien de forma cuantitativa (subpoblaciones linfocitarias) o dicotomizadas con arreglo a límite inferior de la normalidad (HGG para los niveles séricos de inmunoglobulinas e HCC para los factores de complemento), y se compararon entre los pacientes con o sin infección. De este modo se preseleccionaron una serie de parámetros potencialmente útiles a la hora de construir el modelo inmunológico aplicable a cada periodo y tipo de infección. El siguiente paso fue dicotomizar estas variables según el punto de corte que combinara de forma óptima los máximos valores de sensibilidad y de especificidad con arreglo al estadístico J de Youden ($J = \text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 100$) [149]. Una vez dicotomizadas, las variables inmunológicas fueron introducidas en un modelo de regresión logística con proceso de selección por pasos hacia atrás (*backward*), empleando como variable dependiente el desarrollo de infección (categorizada en sí/no). El modelo predictivo fue obtenido ponderando cada variable mantenida en el paso final con un valor numérico proporcional a su coeficiente β . Para ello se redondeó el OR correspondiente al número entero más próximo.

Por último se repitieron todos los pasos detallados en el párrafo precedente, pero incorporando esta vez al modelo de regresión logística tanto las variables clínicas como las inmunológicas a fin de obtener el modelo predictivo combinado. Una vez más la ponderación de cada variable se basó en el redondeo de su OR correspondiente. A diferencia del modelo inmunológico, en ciertas variables con valores de OR muy pequeños (e.g., por incremento urinario en una variable continua) el redondeo consistió en un número no entero con una única cifra decimal.

A fin de minimizar el riesgo de hiperinflación, en la construcción de todos los modelos multivariantes (tanto de regresión logística como de riesgos proporcionales de Cox) se respetó la premisa de contar con un mínimo de 10 eventos por cada variable explicativa [150]. Se descartó igualmente la presencia de multicolinealidad significativa entre las variables explicativas mediante el análisis del factor de inflación de la varianza (valores >3 fueron considerados sugerentes de un grado relevante de multicolinealidad) [151]. La bondad de ajuste de los modelos de regresión logística (es decir, la capacidad de dichos

modelos de explicar la distribución observada en la realidad del evento de interés) fue evaluada mediante el test de Hosmer-Lemeshow. Un valor de P en dicho test superior a 0.05 implica un buen ajuste del modelo [152].

6.6.4. Rendimiento de los modelos en la cohorte de derivación

La capacidad de discriminación (es decir, la probabilidad de clasificación correcta para un par dado de pacientes con y sin el resultado evaluado) de todos los modelos obtenidos (clínicos, inmunológicos y combinados) fue analizada mediante el estadístico C o área bajo la curva de características operativas del receptor (*receiving operator characteristics* [ROC]) [153]. Dichas áreas fueron comparadas gráfica y numéricamente entre los diversos tipos de modelo.

Se estimó la exactitud diagnóstica de los modelos combinados mediante el cálculo de su sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) y precisión (parámetro que evalúa la probabilidad global de que un paciente sea adecuadamente clasificado, y que se calcula con arreglo a la fórmula: $n. \text{ de verdaderos positivos} + n. \text{ de verdaderos negativos} / n. \text{ total de pacientes testados}$), con sus correspondientes IC 95%. Para ello se estratificó la población en riesgo según punto de corte óptimo determinado con el estadístico J de Youden, así como por cuartiles (es decir, cuatro grupos con el 25% de la muestra cada uno de ellos) o terciles (tres grupos con el 33,3% de la muestra) del modelo. La elección de una u otra estrategia de segmentación (cuartiles o terciles) dependió de la distribución del modelo (número de distintos valores individuales que puede presentar un determinado paciente).

Como análisis complementario, las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección a lo largo de cada periodo considerado fueron comparadas mediante la prueba de los rangos logarítmicos tras estratificar igualmente la cohorte por el punto de corte óptimo o por cuartiles o terciles del modelo.

La evaluación del valor incremental del modelo combinado fue realizada mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox. Así se obtuvo el HR correspondiente a cada incremento del modelo en un cuartil o en un tercil. Este cálculo se realizó tanto de forma cruda (no ajustada) como ajustando por covariables clínicamente relevantes en un modelo de Cox. alguna de ellas (e.g., desarrollo de rechazo agudo del injerto) fue tratada en el análisis como variable tiempo-dependiente.

Además se realizaron una serie de análisis de sensibilidad restringidos a subgrupos específicos de pacientes atendiendo a sus comorbilidades, tipo de donante, o pautas de inmunosupresión y profilaxis.

6.6.5. Rendimiento de los modelos en la cohorte de validación

Todos los análisis indicados en el apartado precedente (capacidad de discriminación, exactitud diagnóstica, evaluación del valor incremental y análisis de sensibilidad) fueron replicados en la cohorte de validación a fin de obtener una aproximación a la reproducibilidad y solidez de los modelos.

6.6.6. Calibración de los modelos

Finalmente se evaluó la calibración de los modelos (es decir, la coincidencia entre las probabilidades predichas y las frecuencias observadas del evento de interés) mediante la comparación de las áreas bajo la curva ROC en las cohortes de derivación y de validación. También se compararon las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección a lo largo del periodo considerado y las tasas de incidencia acumulada al final del mismo, tras estratificar por cuartiles o por terciles del modelo en ambas cohortes.

7. RESULTADOS

7.1. Descripción de la cohorte global

Fueron incluidos 447 pacientes sometidos a TR en el HU12O entre Noviembre de 2008 y Marzo de 2013.

Las características demográficas y clínicas de los receptores son detalladas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características demográficas y clínicas basales de los receptores en la cohorte global (n = 447).

Variable	
Edad del receptor, años [media ± DE]	54,9 ± 14,9
Género del receptor (masculino) [n (%)]	278 (62,2)
Hábito tabáquico [n (%)] ^a	
No fumador	264 (62,0)
Ex-fumador en el momento del trasplante	98 (23,0)
Fumador activo en el momento del trasplante	64 (15,0)
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]	
Hipertensión arterial	359 (80,3)
Diabetes mellitus	118 (26,4)
EPOC	52 (11,6)
SAHS	34 (7,6)
Asma	12 (2,7)
Fibrilación auricular	10 (2,2)
Enfermedad aterotrombótica	68 (15,2)
Cardiopatía isquémica	37 (8,3)
Enfermedad arterial periférica	35 (7,8)
Accidente cerebrovascular	29 (6,5)
Hepatopatía crónica	21 (4,7)
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]	
Glomerulonefritis	97 (21,7)
Nefropatía diabética	81 (18,1)
Enfermedad renal poliquística	57 (12,8)
Nefroangioesclerosis hipertensiva	56 (12,5)
Nefropatía intersticial crónica	40 (8,9)
Nefropatía congénita	17 (3,4)
Nefropatía por reflujo	16 (3,6)
Hipoplasia renal	7 (1,6)
Hiperfiltración	7 (1,6)
Pielonefritis crónica	5 (1,1)
Nefropatía lúpica	4 (0,9)
No filiada	38 (8,5)
Otra ^b	22 (4,9)
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	421 (94,4)
Tipo de diálisis pre-trasplante	
Hemodiálisis periódica	365 (81,7)
Diálisis peritoneal continua ambulatoria	56 (12,5)
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	648,0 (317,8 - 1324,0)
Trasplante previo [n (%)]	92 (20,6)
Dos trasplantes previos	21 (4,7)

Tipo de trasplante previo ^c	
Renal	107 (94,7)
Hepático	4 (3,5)
Cardíaco	2 (1,8)
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	54 (12,1)
Estado serológico pre-trasplante [n (%)]	
VVZ (IgG positivo)	422 (94,4)
CMV (IgG positivo)	441 (91,9)
VHB (IgG anti-HBc positivo)	23 (5,1)
VHB (HBsAg positivo)	1 (0,2)
VHC (IgG positivo)	34 (7,6)

CMV: citomegalovirus; DE: desviación estándar; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HBc: antígeno *core* del virus de la hepatitis B; HBsAg: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; IgG: inmunoglobulina G; SAHS: síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño; VHB: virus de la hepatitis B; RIQ: rango intercuartílico; VHC: virus de la hepatitis C; VVZ: virus varicela-zóster.

^a Información acerca del hábito tabáquico no disponible en 21 receptores (4,7%).

^b Incluye las siguientes etiologías de enfermedad renal: toxicidad por fármacos anti-calcineurínicos (n = 4), microangiopatía trombótica (n = 3), afectación por mieloma múltiple (n = 3), nefrocalcinosis (n = 3), nefronoptisis (n = 3), esclerosis tuberosa (n = 2), nefropatía hiperuricémica familiar (n = 2) y amiloidosis (n = 2).

^c Porcentajes calculados sobre un total de 11 trasplantes previos.

La edad media fue $54,9 \pm 14,9$ años, con cierto predominio de varones (62,2% [278/447]). Entre las comorbilidades pre-trasplante destacaron la presencia de hipertensión arterial (80,3% [359/447]), diabetes mellitus (26,4% [118/447]), enfermedad aterotrombótica en sus diversas formas clínicas (15,2% [68/447]), EPOC (11,6% [52/447]) y síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño (7,6% [34/447]). Respecto a la etiología de la enfermedad renal de base, la glomerulonefritis (21,7% [97/447]) y la nefropatía diabética (18,1% [81/447]) fueron predominantes, seguidas de la enfermedad renal poliquística (12,8% [57/447]) y la nefroangioesclerosis hipertensiva (12,5% [56/447]). La mayor parte de los pacientes (94,4% [421/447]) estaban sometidos a alguna modalidad de técnica de reemplazo renal en el momento del trasplante, con una mediana de 648,0 días en diálisis (RIQ: 317,8 - 1324,0). La hemodiálisis periódica constituyó la modalidad más frecuente (81,7% [365/447]).

Aproximadamente un quinto de los pacientes (20,6% [92/447]) había recibido previamente un TOS, generalmente renal (97,7% [107/113]), en tanto que la existencia de alguna forma de inmunosupresión ya en el periodo pre-trasplante fue documentada en algo más de la décima parte (12,1% [54/447]). La inmensa mayoría de los receptores eran seropositivos de forma basal frente a VVZ (94,4% [422/447]) y CMV (91,9% [441/447]).

Las características demográficas y clínicas de los donantes son mostradas en la **Tabla 5**. La edad media fue similar a la de los receptores ($53,3 \pm 16,6$ años). Respecto al tipo de donación, en la mayor parte de las ocasiones tuvo lugar tras el diagnóstico de muerte encefálica (64,4% [288/447]), si bien la proporción de donantes tras muerte circulatoria (donación en asistolia) fue relevante (32,4% [145/447]). Las causas de muerte más habituales fueron el accidente cerebrovascular (46,3% [201/434]), la parada cardíaca (33,4% [145/434]) y el traumatismo craneoencefálico (12,9% [56/434]). La tasa de seropositividad frente a CMV fue menor a la observado entre los receptores (77,3% [323/418]).

Tabla 5. Características demográficas y clínicas basales de los donantes en la cohorte global (n = 447).

Variable	
Edad del donante, años [media \pm DE]	53,3 \pm 16,6
Género del donante (masculino) [n (%)]	291 (65,1)
Tipo de donación [n (%)]	
Donación tras muerte encefálica	288 (64,4)
Donación tras muerte circulatoria (asistolia)	145 (32,4)
Donación de vivo	14 (3,1)
Causa de muerte del donante [n (%)] ^a	
Accidente cerebrovascular	201 (46,3)
Traumatismo craneoencefálico	56 (12,9)
Encefalopatía post-anóxica	32 (7,3)
Parada cardíaca	145 (33,4)
Estado serológico frente a CMV del donante [n (%)] ^b	
IgG positivo	323 (77,3)
IgG negativo	66 (15,8)
Serología no realizada	29 (6,9)

CMV: citomegalovirus; DE: desviación estándar; IgG: inmunoglobulina G.

^a Porcentajes calculados sobre un total de 43 donantes fallecidos.

^b Información acerca del estado serológico frente a CMV no disponible en 29 donantes (6,5%).

La **Tabla 6** recoge variables del procedimiento del trasplante y diversos aspectos relacionados con la compatibilidad entre donante y receptor. El tiempo de isquemia fría fue de $53,3 \pm 16,6$ horas. En la práctica totalidad de los casos se trasplantó un único riñón (99,1% [443/447]). La mediana de incompatibilidades HLA fue de 4 (RIQ: 4 - 5). Las complicaciones perioperatorias fueron poco frecuentes, tal y como sugiere la escasa necesidad de transfusión de hemoderivados (3,6% [16/447]), de ingreso en UCI a largo de las dos primeras semanas post-trasplante (1,3% [6/447]), o de ventilación mecánica invasiva en dicho periodo (0,7% [3/447]). En relación con la discordancia serológica frente a CMV, la

mayor parte de los pacientes se agruparon en categorías de riesgo intermedio, ya fuera D⁺/R⁺ (65,5% [293/447]) o D⁻/R⁺ (13,4% [60/447]), en tanto que las categorías de alto (D⁺/R⁻) y bajo riesgo (D⁻/R⁻) estuvieron escasamente representadas (6,7% [30/447] y 1,3% [6/447], respectivamente).

Tabla 6. Características relacionadas con el procedimiento quirúrgico, incompatibilidades donante/receptor y variables peri-operatorias en la cohorte global (n = 447).

Variable	
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	53,3 ± 16,6
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	4 (4 - 5)
Discordancia serológica frente a CMV [n (%)]	
Donante positivo / receptor positivo	293 (65,5)
Donante negativo / receptor positivo	60 (13,4)
Donante desconocido / receptor positivo	58 (13,0)
Donante positivo / receptor negativo	30 (6,7)
Donante negativo / receptor negativo	6 (1,3)
Tipo de trasplante renal [n (%)]	
Riñón único	443 (99,1)
Doble riñón	4 (0,9)
Transfusión de hemoderivados [n (%)]	
Concentrados de hematíes	12 (2,7)
Plasma fresco congelado	4 (0,9)
Unidades de plaquetas	3 (0,7)
Necesidad de ingreso en UCI en el periodo post-operatorio inmediato [n (%)] ^a	6 (1,3)
Duración del ingreso, días [mediana (RIQ)]	3,5 (2,25 - 23,8)
Necesidad de ventilación mecánica invasiva en el periodo post-operatorio inmediato [n (%)] ^a	3 (0,7)

CMV: citomegalovirus; DE: desviación estándar; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos.

^a Durante las dos primeras semanas post-trasplante.

Respecto al tratamiento inmunosupresor (**Tabla 7**), la administración de terapia de inducción en el momento del trasplante fue común, pues cerca de la mitad de la cohorte (48,5% [217/447]) recibió ATG y más de la tercera parte, basiliximab (34,5% [154/447]).

La pauta primaria de inmunosupresión consistió mayoritariamente en un régimen triple formado por tacrólimus, mofetil micofenolato o ácido micofenólico, y esteroides. El empleo de inhibidores de la mTOR dentro de este régimen primario fue testimonial (0,4% [2/447]). Con arreglo a los protocolos de nuestra institución durante el periodo del estudio, la administración de profilaxis frente a *P. jirovecii* fue

mayoritaria (95,3% [426/447]), y cerca de la mitad de los pacientes recibió igualmente profilaxis frente a CMV (49,0% [219/447]). La profilaxis frente a hongos filamentosos fue excepcional (0,9% [4/447]).

Tabla 7. Regímenes primarios de inmunosupresión y pautas de profilaxis en la cohorte global (n = 447).

Variable	
Tratamiento de inducción [n (%)]	
Globulina antitimocítica policlonal	217 (48,5)
Basiliximab	154 (34,5)
No tratamiento de inducción	75 (16,8)
Rituximab	6 (1,3)
Alefacept	1 (0,2)
Fármacos incluidos en el régimen primario de inmunosupresión [n (%)]	
Esteroides	438 (98,0)
Dosis diaria, mg [media ± DE] ^a	30,8 ± 8,1
Tacrólimus	441 (98,7)
Mofetil micofenolato / ácido micofenólico	394 (88,1)
Azatioprina	47 (10,5)
Inhibidor de mTOR	2 (0,4)
Profilaxis antimicrobiana [n (%)]	
Profilaxis frente a <i>Pneumocystis jirovecii</i>	426 (95,3)
Profilaxis frente a CMV	219 (49,0)
Duración programada de la profilaxis ^b	
3 meses	188 (85,8)
6 meses	31 (14,2)
Profilaxis frente a hongos filamentosos	4 (0,9)

CMV: citomegalovirus; DE: desviación estándar; mTOR: *mammalian target of rapamycin* (diana de rapamicina en células de mamífero)

^a Dosis diaria de prednisona o equivalente al alta.

Porcentajes calculados sobre un total de 21 pacientes que reciben profilaxis frente a CMV.

En lo que respecta a las complicaciones no infecciosas aparecidas en el periodo inmediatamente posterior al trasplante, cabe destacar la necesidad de algún tipo de reintervención quirúrgica a lo largo del primer mes (11,6% [52/447]) y el retraso en la función del injerto (60,6% [271/447]) (**Tabla 8**).

7.2. Evolución post-trasplante

La mediana de seguimiento de la cohorte global fue de 1.537,0 días (RIQ: 1.150,0 - 2.043,0) o de 4,2 años, sumando un total de 669.736 días-trasplante. Cerca de la cuarta parte de los pacientes (24,4% [109/447]) presentó al menos un episodio de rechazo agudo del injerto (121 episodios individuales) al cabo de una mediana de 41,0 días (RIQ: 14,5 - 137,5) desde el trasplante (**Tabla 8**).

Tabla 8. Complicaciones post-trasplante de naturaleza no infecciosa en la cohorte global (n = 447).

Variable	
Reintervención en la primera semana [n (%)]	21 (4,7)
Reintervención en el primer mes [n (%)]	52 (11,6)
Retraso en la función del injerto [n (%)]	271 (60,6)
Rechazo agudo del injerto [n (%)]	109 (24,4)
Dos episodios de rechazo agudo	12 (2,7)
Rechazo crónico del injerto [n (%)]	13 (2,9)
Diabetes mellitus <i>de novo</i> post-trasplante [n (%)]	63 (14,1)
Estenosis de la arteria renal [n (%)]	76 (17,0)
Neoplasia <i>de novo</i> post-trasplante [n (%)]	50 (11,2)
Neoplasia de órgano sólido	25 (5,6)
Cáncer cutáneo no melanoma	16 (3,6)
Melanoma	2 (0,4)
Sarcoma de Kaposi	3 (0,7)
Síndrome linfoproliferativo post-trasplante	2 (0,4)
Síndrome mielodisplásico	2 (0,4)
Pérdida del injerto [n (%)]	49 (11,0)
Mortalidad de cualquier causa [n (%)]	56 (12,5)

Como se muestra en la **Tabla 9**, la mayor parte de estos episodios cumplieron criterios histológicos de rechazo agudo mediado por linfocitos T (52,5% [63/121]), con menor representación de las formas mediadas por anticuerpos (25,6% [31/121]) y del rechazo *borderline* (11,6% [14/121]). Los bolos de corticoesteroides constituyeron el tratamiento más comúnmente empleado (48,7% [59/121]), seguido de la combinación de bolos de corticoesteroides, plasmaféresis e IgIV (12,4% [15/121]).

El diagnóstico de rechazo crónico fue establecido en un pequeño número de pacientes (2,9% [13/447]) tras una mediana de 722,0 días (RIQ: 191,3 - 1.010,75).

Otras complicaciones de naturaleza no infecciosa que tuvieron lugar en el seguimiento a largo plazo incluyeron el desarrollo *de novo* de diabetes mellitus (14,1% [63/447]), estenosis de la arteria renal (17,0% [76/447]) y neoplasia *de novo* (11,2% [50/447]). Este último evento tuvo lugar al cabo de una mediana de 1.476,0 días (RIQ: 952,0 - 1.991,0) y consistió mayoritariamente en una neoplasia de órgano sólido (50,0% [25/50]) y en cáncer cutáneo no melanoma (32,0% [16/50]). La incidencia de sarcoma de Kaposi (0,7% [3/447]) y de síndrome linfoproliferativo post-trasplante (0,4% [2/447]), dos neoplasias asociadas a la infección por virus del grupo herpes, fue baja (**Tabla 8**).

Tabla 9. Tipo histológico y tratamiento de los episodios de rechazo agudo el injerto (n = 121).

Variable	
Rechazo mediado por linfocitos T [n (%)] ^a	63 (52,1)
Grado IA	25 (20,7)
Grado IB	8 (6,6)
Grado IIA	25 (20,7)
Grado IIB	5 (4,1)
Sospecha de rechazo mediado por linfocitos T (cambios <i>borderline</i>) [n (%)]	14 (11,6)
Rechazo mediado por anticuerpos [n (%)] ^b	31 (25,6)
No demostración histológica [n (%)]	13 (10,7)
Tratamiento del episodio de rechazo [n (%)]	
Bolos de esteroides	59 (48,7)
Esteroides e IgIV	11 (9,1)
Esteroides y rituximab	2 (1,6)
Esteroides, plasmaféresis e IgIV	15 (12,4)
Esteroides, plasmaféresis y rituximab	3 (2,5)
Esteroides, plasmaféresis, IgIV y rituximab	7 (5,8)
Esteroides, IgIV y rituximab	1 (0,8)
Esteroides y globulina antitimocítica policlonal	4 (3,3)
Plasmaféresis e IgIV	5 (4,1)
Plasmaféresis, IgIV y rituximab	3 (2,5)
Plasmaféresis, IgIV y globulina antitimocítica policlonal	1 (0,8)
Globulina antitimocítica policlonal	2 (1,6)
IgIV	1 (0,8)
No tratado	7 (5,8)

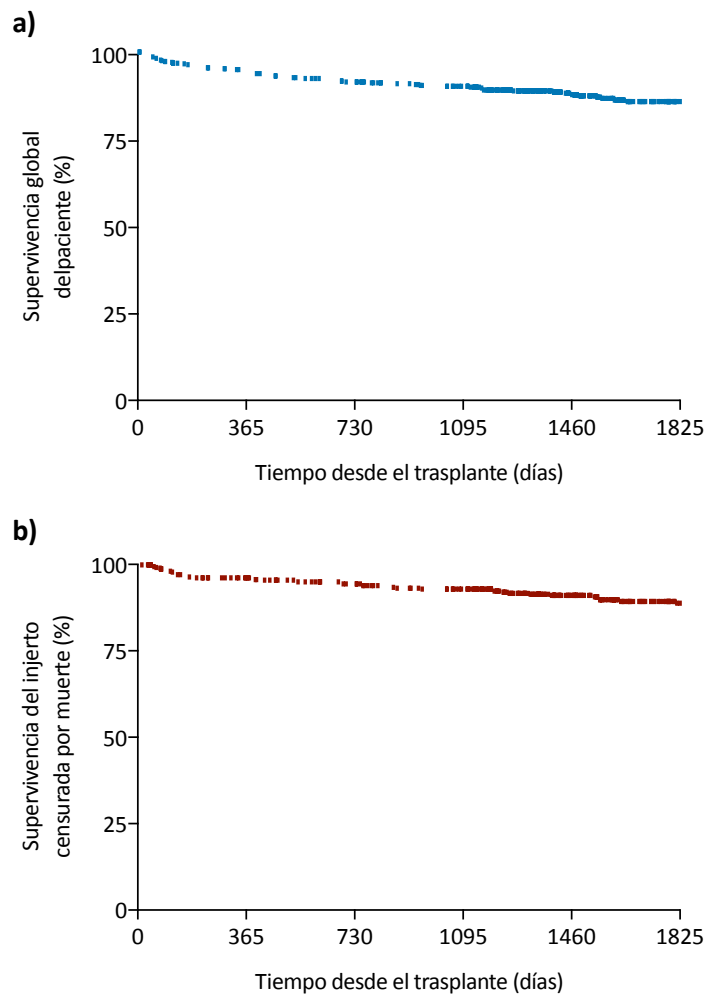
IgIV: Inmunoglobulina humana inespecífica intravenosa.

^aSegún criterios de la clasificación de Banff 2015 [147].

^bSegún criterios de la clasificación de Banff 2013 [148].

La tasa de mortalidad de cualquier causa fue del 12,5% (56/447). De este modo, la tasa de supervivencia del receptor fue del 91,0%, 90,0% y 86,0% al año, dos años y cinco años del trasplante, respectivamente (**Figura 3a**). La mediana de tiempo transcurrido desde el trasplante hasta el fallecimiento del receptor fue de 427,0 días (RIQ: 123,8 - 1.096,3). Las causas de muerte más habituales fueron la infección (42,9% [24/56]) y la enfermedad cardiovascular (12,5% [7/56]). La pérdida del injerto censurada por la muerte del receptor tuvo lugar en el 11,0% (49/447) de los pacientes. Este desenlace tuvo lugar al cabo de una mediana de 412,0 días desde el trasplante (RIQ: 93,0 - 1.213,5) y arroja una tasa de supervivencia del injerto censurada por muerte del 93,0%, 92,0% y 88,0% al año, dos años y cinco años del trasplante, respectivamente (**Figura 3b**).

Figura 3. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global del receptor **(a)** y de supervivencia del injerto renal censurada por muerte **(b)**, con seguimiento truncado a los 5 años del trasplante renal.



7.3. Complicaciones infecciosas

A lo largo del seguimiento global tuvieron lugar un total de 327 episodios de infección post-trasplante en 280 pacientes. La incidencia acumulada fue del 62,6% (IC 95%: 58,2 - 67,1) y la densidad de incidencia de 0,48 episodios por cada 1.000 días-trasplante. La **Figura 4** representa las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada a lo largo de los 2 primeros años post-trasplante para los diversos tipos de infección (bacteriana, vírica y fúngica). El intervalo mediano desde el trasplante hasta el primer episodio de infección bacteriana, vírica o fúngica fue de 40,0 (RIQ: 18,0 - 180,0), 126,5 (RIQ: 49,5 - 183,0) y 84,0 días (RIQ: 64,5 - 393,0), respectivamente. Las curvas de incidencia acumulada de infección global en cada periodo post-trasplante (precoz [primer mes], intermedio [meses 1 a 6] y tardío [a partir del mes 6]) aparecen representadas en la **Figura 5**.

Figura 4. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección bacteriana, vírica y fúngica, con seguimiento truncado a los 2 años del trasplante renal.

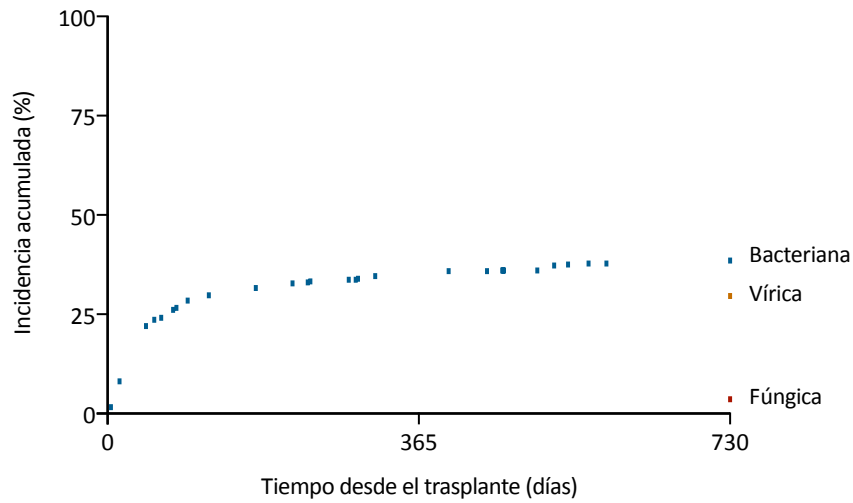
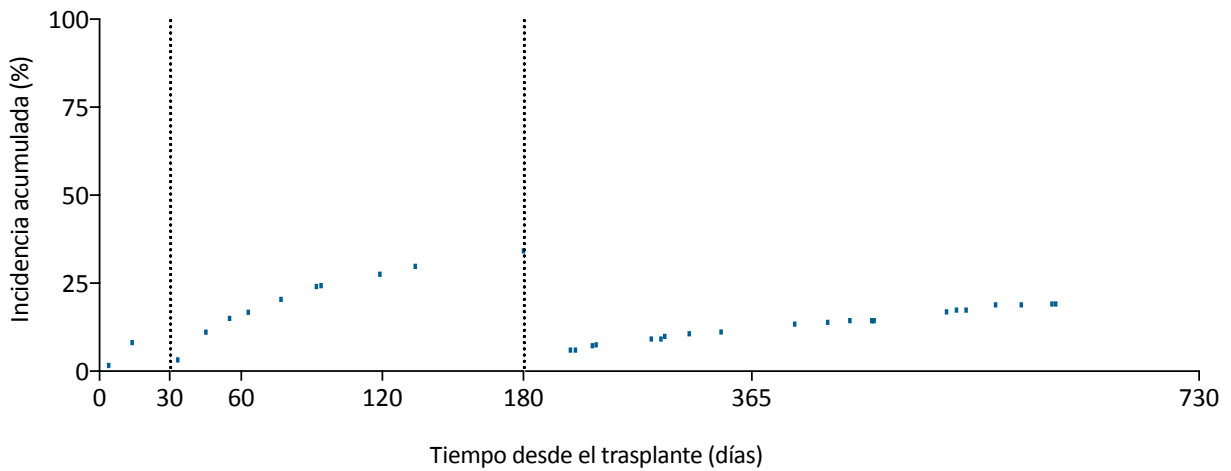


Figura 5. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años).



La **Tabla 10** detalla el síndrome clínico y microorganismo causante de los 327 episodios de infección bacteriana. Los cuadros más frecuentes fueron la pielonefritis aguda (30,6% [100/327]), la infección del lecho quirúrgico (16,8% [55/327]) y la neumonía (12,5% [41/327]). Tuvieron lugar 116 episodios de bacteriemia de cualquier origen en 60 pacientes. Respecto a la caracterización microbiológica, la mayor parte de los casos fueron causados por bacilos Gram negativos, entre los que destacan *Escherichia coli* (22,3% [73/327], *Klebsiella pneumoniae* (11,6% [38/327]) y *Pseudomonas aeruginosa* (10,7% [35/327]). En cuanto a su distribución temporal, la infección del lecho quirúrgico fue predominante en el periodo post-trasplante precoz, con una incidencia acumulada del 6,2% (28/447), en tanto que la pielonefritis

aguda fue la forma de infección bacteriana más frecuente en los periodos intermedio y tardío, con incidencias acumuladas del 6,5% (29/443) y 7,2% (30/414), respectivamente (Tabla 11).

Tabla 10. Tipo y microorganismo causante de los episodios de infección bacteriana (n = 327).

Síndrome clínico [n (%)]	
Pielonefritis aguda	100 (30,6)
Infección del lecho quirúrgico	55 (16,8)
Neumonía	41 (12,5)
Diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i>	35 (10,7)
Infección de piel y partes blandas	29 (8,9)
Infección intra-abdominal	22 (6,7)
Bacteriemia asociada a catéter intravascular	20 (6,1)
Bacteriemia primaria	10 (3,0)
Diarrea	3 (0,9)
Orquiepididimitis	3 (0,9)
Otra ^a	9 (2,8)
Microorganismo causante [n (%)]	
Cocos Gram positivos	
<i>Enterococcus faecalis</i>	18 (5,6)
<i>Enterococcus faecium</i>	6 (1,8)
Estafilococos coagulasa-negativos	21 (6,4)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (3,4)
Estreptococos del grupo viridans	5 (1,5)
Bacilos Gram negativos	
<i>Escherichia coli</i>	73 (22,3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 (11,6)
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (0,6)
Otra <i>Enterobacteriaceae</i>	7 (2,1)
<i>Proteus</i> spp.	3 (0,9)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35 (10,7)
Otro bacilo Gram negativo no fermentador ^b	2 (0,6)
<i>Campylobacter</i> spp.	2 (0,6)
Otros	
<i>Clostridium difficile</i>	34 (10,4)
<i>Nocardia</i> spp.	2 (0,6)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	3 (0,9)
Infección polimicrobiana	13 (3,9)
Sin aislamiento microbiológico	52 (15,9)

^a Endocarditis infecciosa (n = 2), absceso perirrenal (n = 2), absceso perianal (n = 2), infección osteoarticular (n = 2) sinusitis aguda (n = 1).

^b *Achromobacter xylosoxidans* (n = 1) *Acinetobacter baumannii* (n = 1).

Tabla 11. Incidencia de los principales tipos de infección bacteriana según el periodo post-trasplante.

Síndrome clínico	Incidencia acumulada [n (%)] ^a		
	Periodo precoz	Periodo intermedio	Periodo tardío
Pielonefritis aguda	23 (5,1)	29 (6,5)	30 (7,2)
Infección del lecho quirúrgico	28 (6,2)	17 (3,8)	6 (1,4)
Neumonía	4 (0,9)	17 (3,8)	20 (4,8)
Diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i>	10 (2,2)	11 (2,5)	10 (2,4)
Infección de piel y partes blandas	7 (1,6)	12 (2,7)	5 (1,2)
Infección intra-abdominal	3 (0,7)	14 (3,2)	4 (0,9)
Bacteriemia asociada a catéter intravascular	0 (0,0)	8 (1,8)	5 (1,2)
Bacteriemia primaria	3 (0,7)	2 (0,5)	3 (0,7)
Otra	3 (0,7)	2 (0,5)	6 (1,4)

^a Incidencia acumulada calculada a partir del número de pacientes vivos y con injerto funcionante al inicio del periodo de exposición (447 [precoz], 443 [intermedio] y 414 [tardío]).

Tabla 12. Tipo y microorganismo causante de los episodios de infección vírica (n = 166).

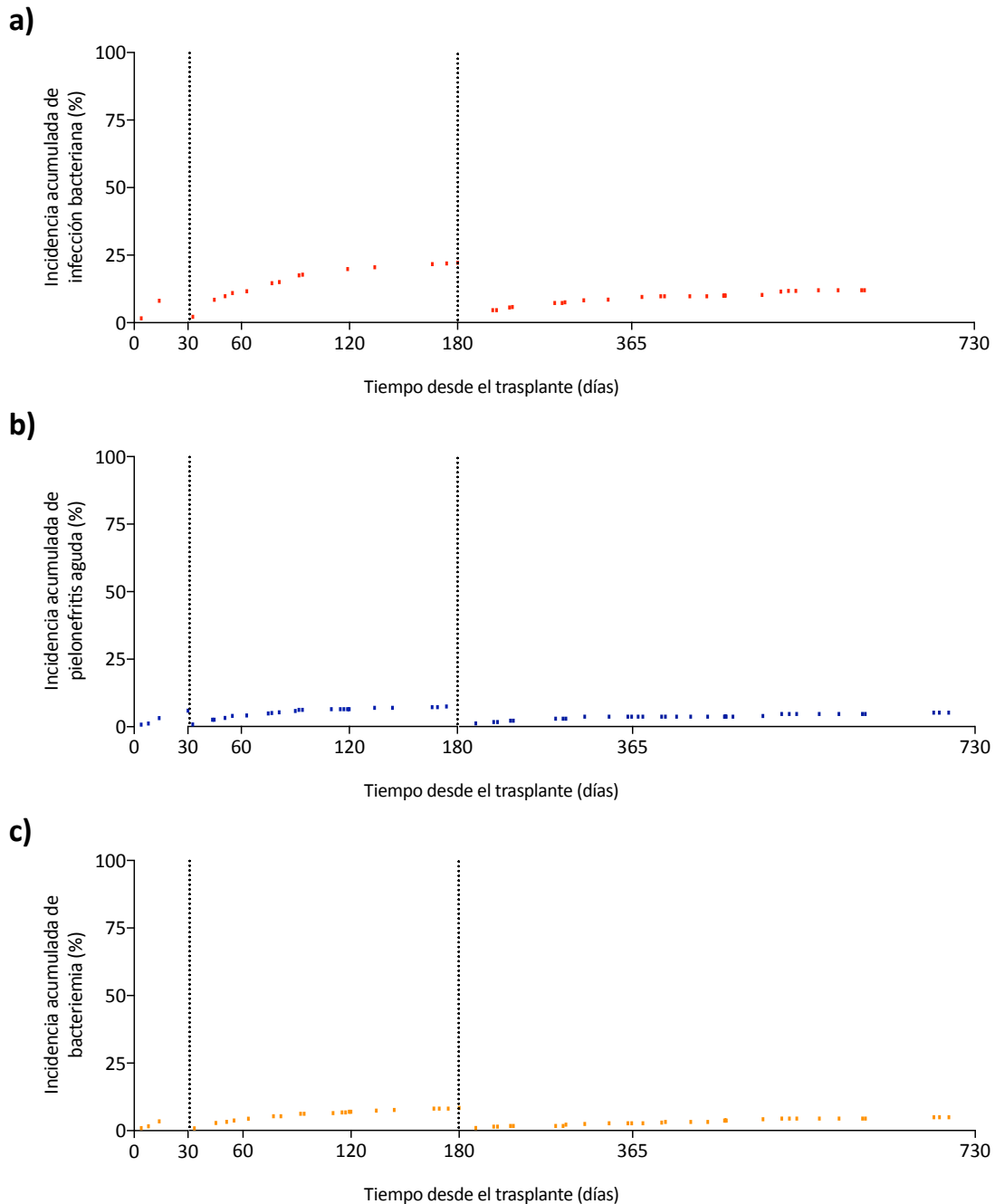
Síndrome clínico [n (%)]	
Síndrome viral	69 (41,6)
Infección de piel y partes blandas	44 (26,5)
Colitis invasiva	18 (10,8)
Infección orofaríngea	9 (5,4)
Neumonía	9 (5,4)
Infección de tracto respiratorio sin consolidación	5 (3,0)
Nefropatía del injerto	2 (1,2)
Gastroenteritis	2 (1,2)
Queratitis	2 (1,2)
Otra ^a	4 (2,4)
Microorganismo causante [n (%)]	
Herpesvirus	
CMV	94 (56,6)
VHS-1 y VHS-2	22 (13,3)
VVZ	34 (20,5)
Otros	
Virus de la gripe	8 (4,8)
VRS	3 (1,8)
Rotavirus	2 (1,2)
Poliomavirus BK	2 (1,2)

CMV: citomegalovirus; VHS: virus herpes simple; VRS: virus respiratorio sincitial; VVZ: virus de la varicela-zóster.

^a Esofagitis (n = 1), gastritis (n = 1), hepatitis (n = 1), encefalitis (n = 1).

La **Figura 6** muestra las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección bacteriana global y, específicamente, pielonefritis aguda y bacteriemia en cada uno de estos periodos post-trasplante.

Figura 6. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección bacteriana global **(a)**, pielonefritis aguda **(b)** y bacteriemia **(c)** en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años).



Respecto a la infección de naturaleza vírica, la mayor parte de los episodios correspondieron desde un punto de vista clínico a un síndrome viral (41,6% [69/166]), en tanto que los virus del grupo herpes conformaron el grupo etiológico más relevante (90,4% [150/166]) de todos los episodios de infección

vírica) (**Tabla 12**). Hubo un total de 94 episodios de enfermedad por CMV en 84 pacientes (10 pacientes desarrollaron dos episodios diferentes). En cuanto al tipo de afectación por CMV, 25 episodios (26,6%) correspondieron a una enfermedad de órgano diana (colitis [18 episodios], neumonitis [3 episodios], esofagitis, gastritis, hepatitis y nefritis [1 episodio en cada caso]) y los restantes 69 (73,4%) a un síndrome viral. La mediana de tiempo transcurrido desde el trasplante hasta el diagnóstico del primer episodio de enfermedad por CMV fue de 109,5 días (RIQ: 51,5 - 174,5). De forma congruente con el cronograma clásico de infección post-trasplante, la mayor parte de los episodios de enfermedad por CMV tuvieron lugar en el periodo intermedio (meses 1 a 6), con una incidencia acumulada de 10,6% (47/443) al final del mismo (**Figura 7**). En el periodo tardío, por su parte, predominó el zóster cutáneo con una incidencia acumulada del 7,7% (32/414) (**Tabla 13**).

Figura 7. Curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de enfermedad por CMV en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años). CMV: citomegalovirus.

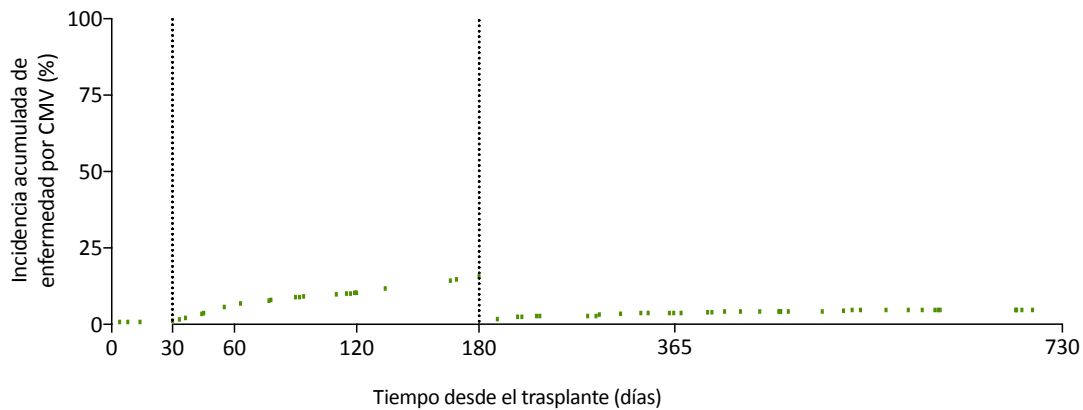


Tabla 13. Incidencia acumulada de los principales tipos de infección vírica según el periodo post-trasplante.

Síndrome clínico	Incidencia acumulada [n (%)] ^a		
	Periodo precoz	Periodo intermedio	Periodo tardío
Síndrome viral por CMV	2 (0,4)	47 (10,6)	13 (3,1)
Enfermedad de órgano diana por CMV	0 (0,0)	18 (4,1)	6 (1,4)
Zóster cutáneo	1 (0,2)	11 (2,5)	32 (7,7)
Herpes orofaríngeo	3 (0,7)	4 (0,9)	3 (0,7)
Infección de tracto respiratorio	2 (0,4)	2 (0,5)	5 (1,2)

^a Incidencia acumulada calculada a partir del número de pacientes vivos y con injerto funcionando al inicio del periodo de exposición (447 [precoz], 443 [intermedio] y 414 [tardío]).

Finalmente, la distribución de los 21 episodios de infección fúngica invasiva y parasitaria es presentada en la **Tabla 14**. La mayor parte de los episodios de infección fúngica estuvieron causados por *Candida* spp. (50,0% [7/14]), seguida de *Aspergillus* spp. (35,7% [5/14]).

Tabla 14. Tipo y microorganismo causante de los episodios de infección fúngica y parasitaria (n = 21).

Síndrome clínico [n (%)]	
Sistema retículo-endotelial y/o infección diseminada	7 (33,3)
Neumonía	6 (28,6)
Pielonefritis aguda	3 (14,3)
Esofagitis	2 (9,5)
Mucormicosis rinocerebral	1 (4,7)
Candidemia asociada a catéter intravascular	1 (4,7)
Infección intraabdominal	1 (4,7)
Microorganismo causante [n (%)]	
Hongos	
<i>Candida albicans</i>	5 (23,8)
<i>Candida no albicans</i>	2 (9,5)
<i>Aspergillus</i> spp.	5 (23,8)
Mucoral	1 (4,7)
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1 (4,7)
Parásitos	
<i>Leishmania donovani</i> complex	7 (33,3)

La mayor parte de los episodios de candidiasis invasora y de aspergilosis invasora tuvieron lugar en el periodo post-trasplante intermedio. Las incidencias acumuladas de ambos eventos fueron muy bajas en cualquier caso (1,1% [5/443] y 0,9% [4/443], respectivamente) (**Tabla 15**).

Tabla 15. Incidencia acumulada de los distintos tipos de infección fúngica y parasitaria según el periodo post-trasplante.

Síndrome clínico	Incidencia acumulada [n (%)]^a		
	Periodo precoz	Periodo intermedio	Periodo tardío
Candidiasis invasora	1 (0,4)	5 (1,1)	1 (0,2)
Aspergilosis pulmonar invasora	0 (0,0)	4 (0,9)	1 (0,2)
Mucormicosis	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)
Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,2)
Leishmaniasis visceral	0 (0,0)	2 (0,5)	5 (1,2)

^a Incidencia acumulada calculada a partir del número de pacientes vivos y con injerto funcionando al inicio del periodo de exposición (447 [precoz], 443 [intermedio] y 414 [tardío]).

La mediana de tiempo desde el trasplante hasta el diagnóstico de los 5 episodios de aspergilosis pulmonar invasora fue de 84,0 días (RIQ: 67,5 - 397,5). En relación con la infección parasitaria, tuvieron lugar 7 episodios de leishmaniasis visceral cuyo diagnóstico tuvo lugar al cabo de una mediana de 488,0 días desde el momento del trasplante (RIQ: 109,8 - 879,8).

7.4. Cinética de los parámetros inmunológicos

7.4.1. Niveles séricos de inmunoglobulinas

La evolución de los niveles séricos de las distintas clases, tanto en el momento basal (pre-trasplante) como a lo largo del periodo post-trasplante, aparece representada en la **Figura 8**. En el caso de la IgG se demostró un descenso significativo entre el momento basal y el mes 1 ($1.164,6 \pm 380,2$ versus $750,3 \pm 275,3$ mg/dL; $P < 0,0001$), para posteriormente aumentar en el mes 6 aunque sin llegar a alcanzar la situación previa al trasplante ($868,0 \pm 306,6$ mg/dL; $P < 0,0001$ comparado con momento basal y mes 1) (**Figura 8a**). También se observó un descenso significativo en los niveles séricos de IgA entre el momento basal y el mes 1 post-trasplante ($273,9 \pm 158,1$ versus $181,3 \pm 100,1$ mg/dL; $P < 0,0001$), sin que en este caso el aumento subsiguiente en el mes 6 ($189,5 \pm 119,9$ mg/dL) alcanzara la significación estadística (**Figura 8b**). Finalmente, la cinética de los niveles séricos de IgM fue paralela a la de IgG, con un descenso marcado a lo largo del primer mes ($103,3 \pm 61,9$ versus $80,5 \pm 56,9$ mg/dL; $P < 0,0001$) y una recuperación parcial en el mes 6 ($94,9 \pm 75,0$ mg/dL; $P < 0,0001$ comparado con el momento basal; $P = 0,024$ comparado con mes 1) (**Figura 8c**).

Reflejo de la cinética expuesta, la prevalencia de HGG de cualquier clase experimentó un aumento significativo entre el momento basal y el mes 1 post-trasplante (IgG: 6,1% versus 49,6% [$P < 0,0001$]; IgA: 2,0% versus 6,1% [$P < 0,0001$]; IgM: 7,3% versus 20,1% [$P < 0,0001$]). Por otra parte, la prevalencia en el mes 6 disminuyó en el caso de la HGG IgG (30,4%; $P < 0,0001$ comparado con mes 1) y de la HGG IgM (11,9%; $P = 0,001$ comparado con mes 1), pero no para la HGG IgA (**Figura 9**).

7.4.2. Niveles séricos de factores del sistema del complemento

La cinética de los niveles séricos de los componentes de la cascada del complemento analizados es mostrada en la **Figura 10**. En el caso de C3, y a diferencia de la evolución descrita en los niveles de Ig, se observó un incremento progresivo y estadísticamente significativo (o próximo a la significación) entre el momento basal ($101,1 \pm 23,7$ mg/dL), el mes 1 ($104,1 \pm 24,9$ mg/dL; $P = 0,059$) y el mes 6 ($108,5 \pm 24,1$ mg/dL;

Figura 8. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey indicando la cinética en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante de los niveles séricos de IgG (a), IgA (b) e IgM (c). Ig: inmunoglobulina.

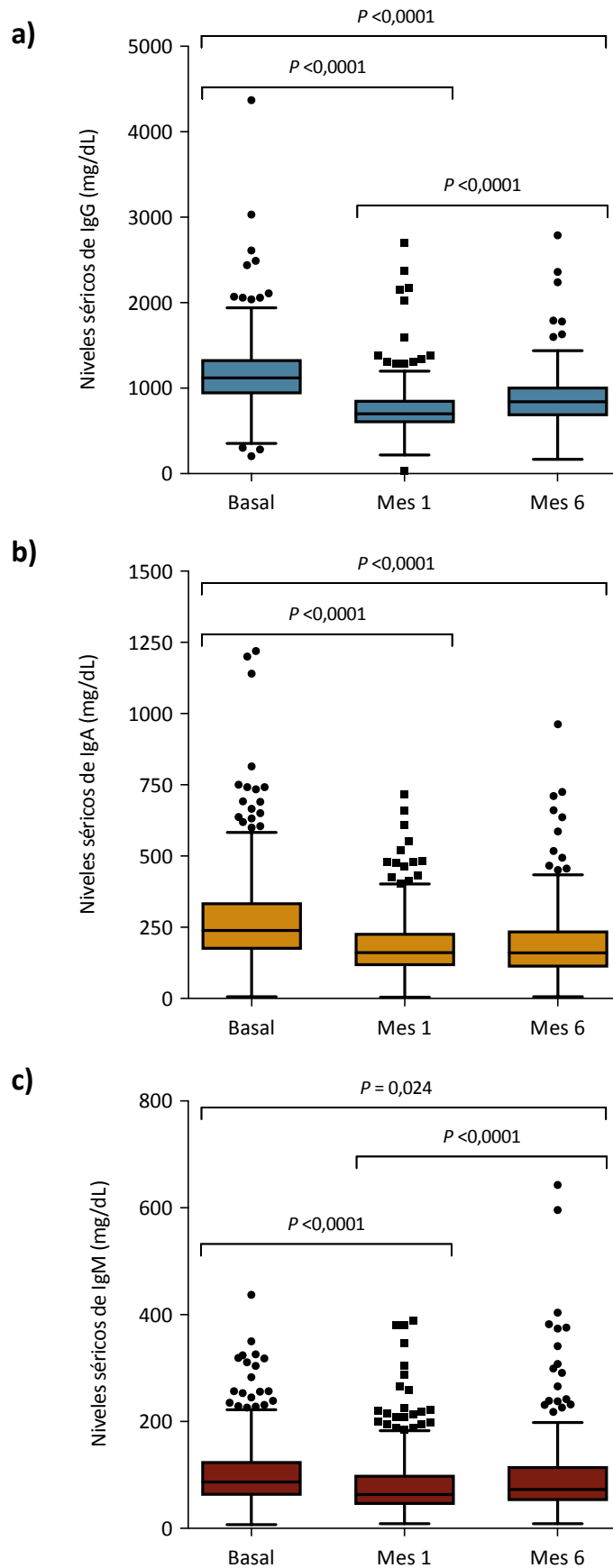
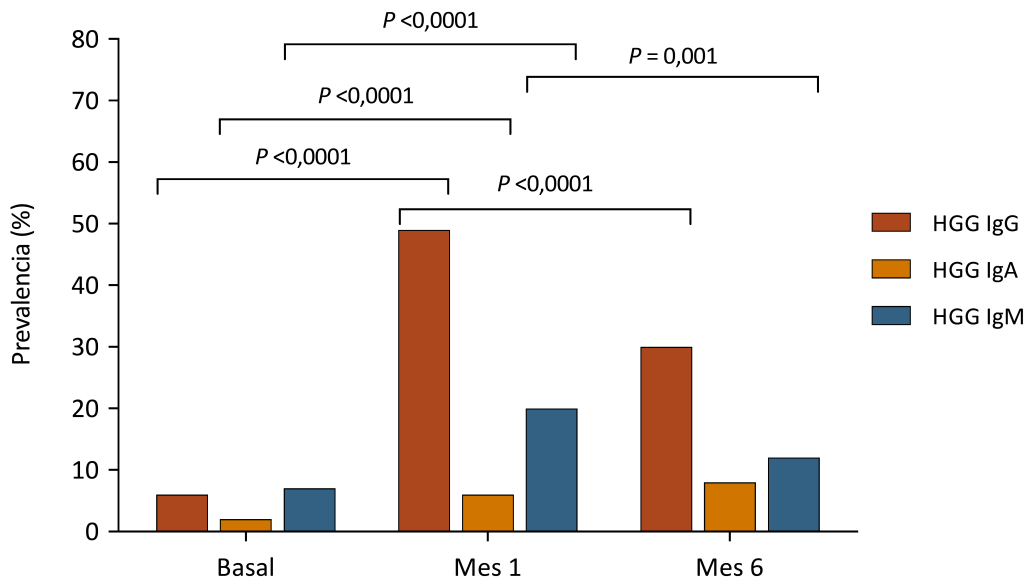


Figura 9. Prevalencia de hipogammaglobulinemia según la clase de inmunoglobulina afectada en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante. HGG: hipogammaglobulinemia.



$P < 0,0001$ comparado con situación basal; $P = 0,023$ comparado con mes 1) (**Figura 10a**). La cinética de C4 fue distinta, pues se observó un descenso desde la situación basal ($26,6 \pm 8,2$ mg/dL) hasta el mes 1 ($23,4 \pm 7,1$ mg/dL; $P < 0,0001$) o el mes 6 ($23,9 \pm 7,1$ mg/dL; $P < 0,0001$) (**Figura 10b**).

La traducción clínica de esta evolución fue un descenso progresivo en la prevalencia de HCC C3 a lo largo del tiempo, desde el momento basal (23,6%) hasta el mes 1 (19,1%) y 6 post-trasplante (11,9%; $P = 0,049$ comparado con mes 1). Por otra parte, la prevalencia de HCC C4 aumentó durante el primer mes (2,7% versus 8,2%; $P = 0,001$) para posteriormente estabilizarse en el mes 6 (5,8%) (**Figura 11**).

7.4.3. Recuentos de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

La cinética de los recuentos de linfocitos totales y de la mayor parte de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica (linfocitos T $CD3^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$ y linfocitos NK) siguió un patrón similar: un descenso más o menos marcado pero estadísticamente significativo entre el momento basal y el mes 1 post-trasplante con una posterior recuperación en el mes 6, sin llegar a alcanzar por lo general las cifras presentes basalmente (**Figura 12**). La excepción vino dada por el recuento de linfocitos B, que aumentó entre el momento basal y el mes 1 (**Figura 12e**).

Como cabría esperar atendiendo a su mecanismo de acción, la administración de ATG como tratamiento de inducción conllevó un impacto marcado y duradero en la cinética de los linfocitos totales y de ciertas subpoblaciones linfocitarias.

Figura 10. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey indicando la cinética en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante de los niveles séricos de los factores de complemento C3 (a) y C4 (b).

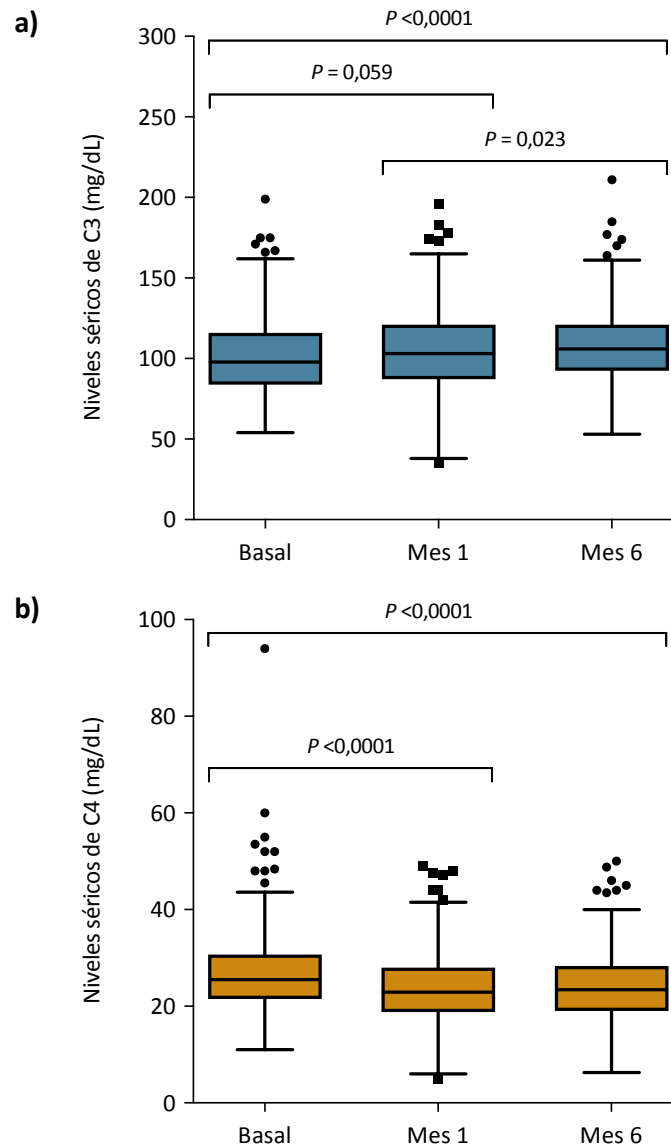


Figura 11. Prevalencia de hipocomplementemia a expensas de diferentes componentes en la evaluación basal y en distintos puntos post-trasplante. HCC: hipocomplementemia.

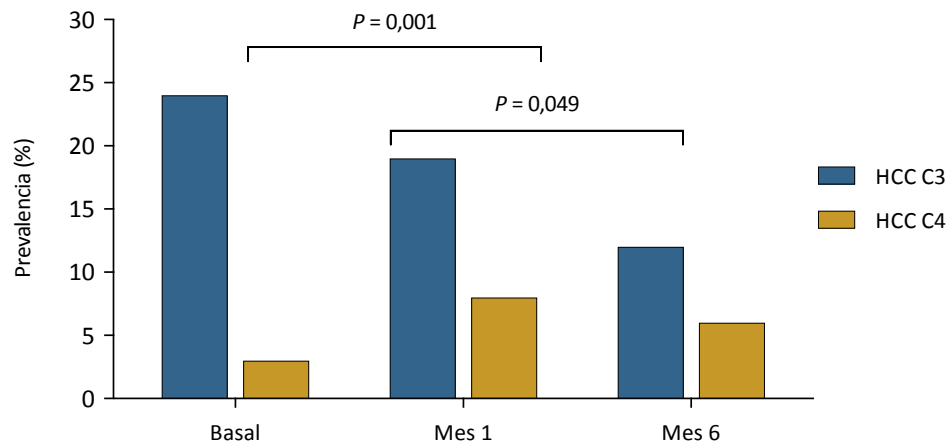
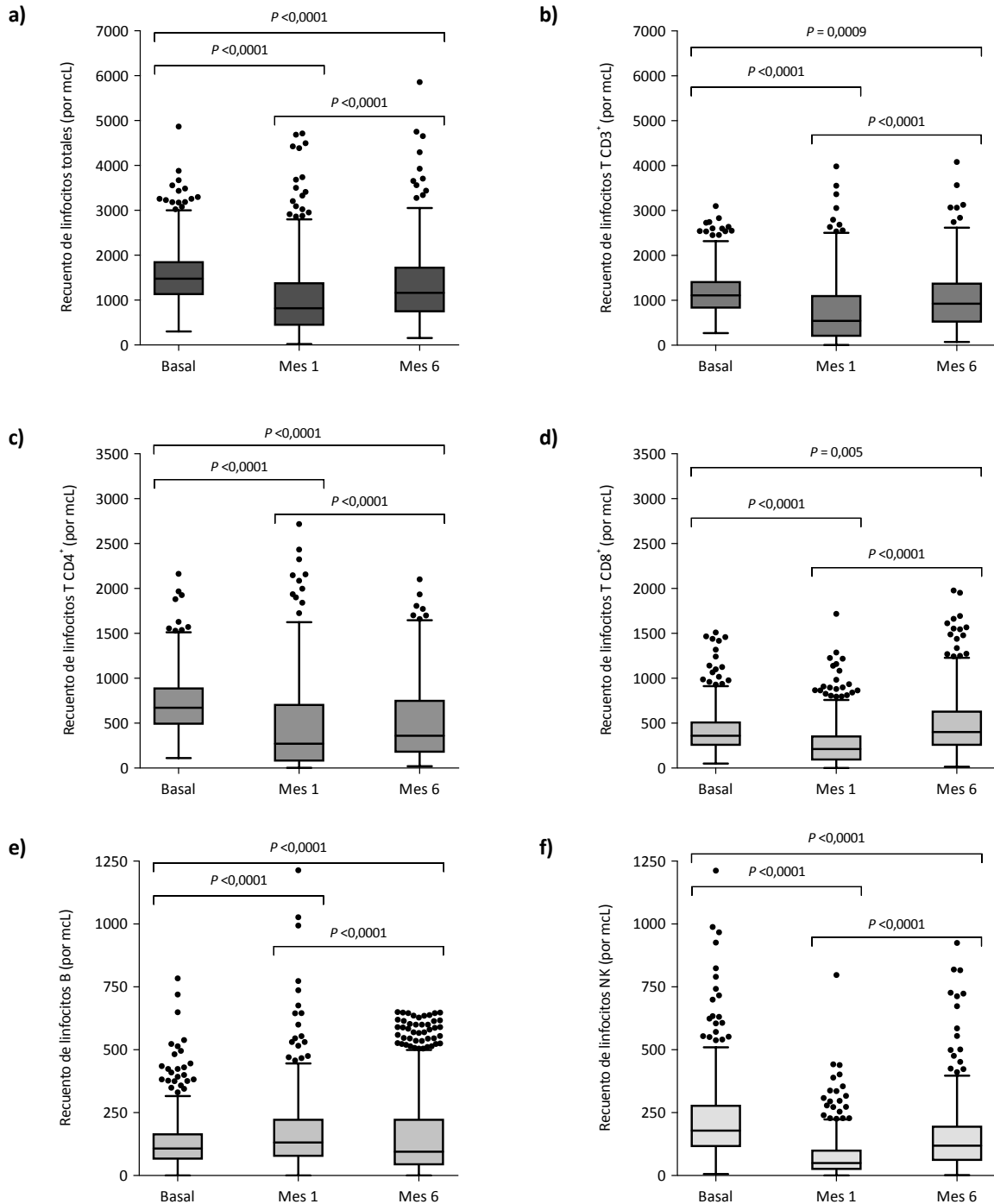


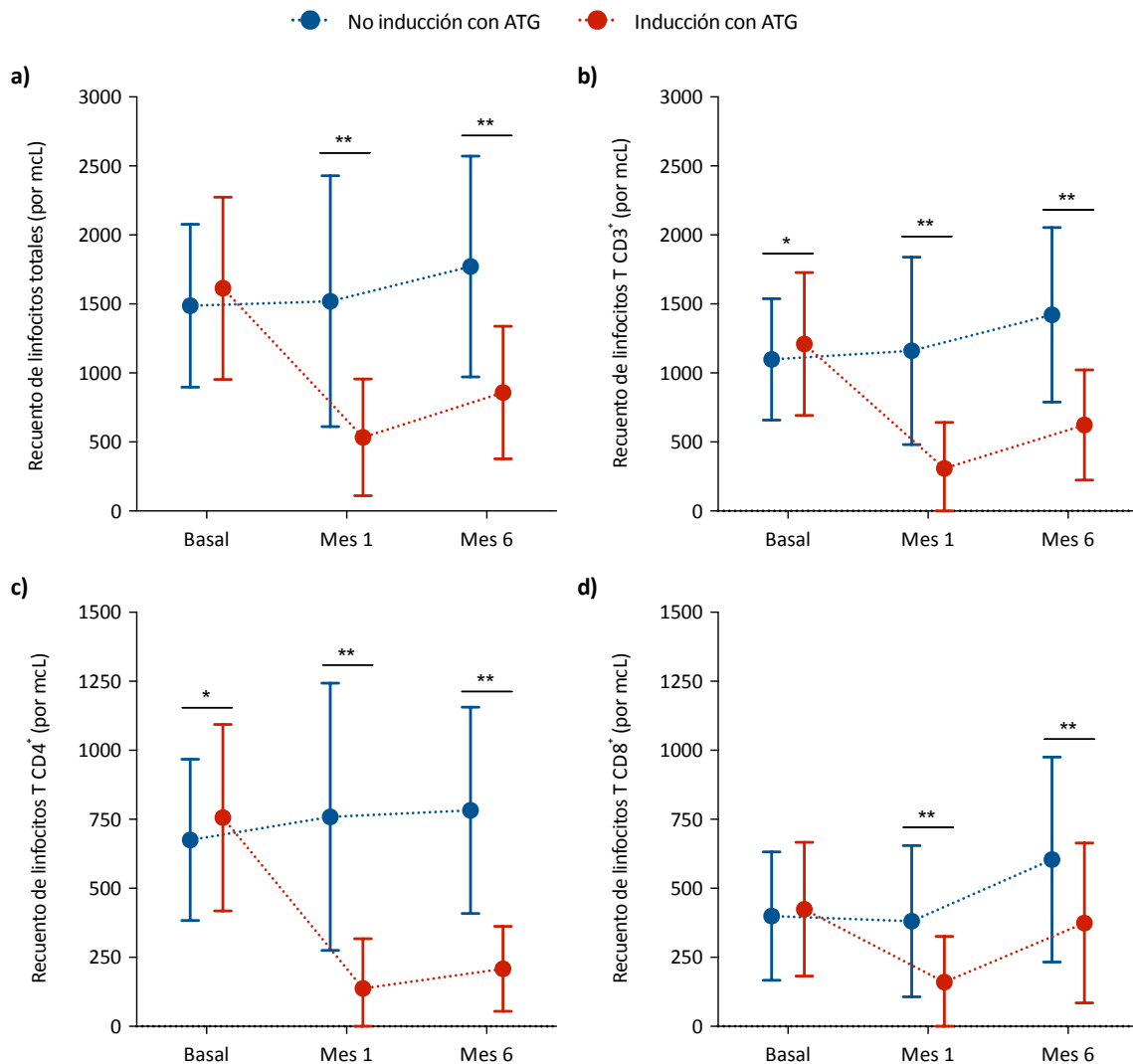
Figura 12. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey indicando la cinética en el momento basal y en distintos puntos post-trasplante de los recuentos de linfocitos totales (a), linfocitos T CD3⁺ (b), linfocitos T CD4 (c), linfocitos T CD8⁺ (d), linfocitos B (e) y linfocitos NK (f). NK: *natural killer* (asesino natural).



De este modo, ya en el mes 1 post-trasplante se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados con ATG y los que recibieron basiliximab o no fueron sometidos a tratamiento de inducción (grupo sin ATG) en los recuentos de linfocitos totales y de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ ($P < 0,0001$ en todos los casos). Cabe señalar que estas diferencias, si bien atenuadas en su

magnitud, aún persistían en el mes 6. De hecho, en el grupo sin ATG la cinética linfocitaria siguió un curso netamente diferenciado al observado en la cohorte global toda vez que, lejos de disminuir, los recuentos de linfocitos totales, $CD3^+$ y $CD4^+$ aumentaron de forma progresiva a lo largo de los 6 primeros meses (**Figura 13**).

Figura 13. Cinética de las distintas subpoblaciones linfocitarias en función del tipo de tratamiento de inducción: linfocitos totales (**a**), linfocitos T $CD3^+$ (**b**), linfocitos T $CD4^+$ (**c**), linfocitos T $CD8^+$ (**d**). Los puntos representan el valor medio y los bigotes la desviación estándar. ATG: globulina antitimocítica policlonal (de *antithymocyte globulin*). * $P < 0,05$; ** $P < 0,0001$.



7.5. Cohortes de derivación y de validación

La cohorte global ($n = 447$) fue segmentada en una primera *cohorte de derivación*, constituida por aproximadamente el 66,6% de los pacientes incluidos ($n = 292$), y una segunda *cohorte de validación*, que estuvo constituida por el 33,3% restante ($n = 155$). No encontramos diferencias estadísticamente

Tabla 16. Comparación de las características demográficas y clínicas relevantes entre las cohortes de derivación y de validación.

Variable	Cohorte de derivación (n = 292)	Cohorte de validación (n = 155)	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	55,4 ± 14,9	54,2 ± 15,1	0,452
Género del receptor (masculino) [n (%)]	176 (60,3)	102 (65,8)	0,251
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]			
Hipertensión arterial	236 (81,7)	123 (80,9)	0,849
Diabetes mellitus	80 (27,4)	38 (24,5)	0,511
EPOC	30 (10,3)	22 (14,2)	0,219
SAHS	23 (8,2)	11 (7,5)	0,783
Asma	8 (2,9)	4 (2,7)	0,931
Fibrilación auricular	6 (2,1)	4 (2,6)	0,478
Enfermedad aterotrombótica	41 (14,0)	27 (17,4)	0,344
Cardiopatía isquémica	24 (8,2)	13 (8,4)	0,951
Enfermedad arterial periférica	20 (6,8)	15 (9,7)	0,289
Accidente cerebrovascular	20 (6,9)	9 (5,9)	0,675
Hepatopatía crónica	13 (4,5)	8 (5,2)	0,736
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]			
Glomerulonefritis	61 (20,9)	36 (23,2)	0,569
Nefropatía diabética	56 (19,2)	25 (16,1)	0,426
Enfermedad renal poliquística	43 (14,7)	14 (9,0)	0,086
Nefroangioesclerosis hipertensiva	35 (12,0)	21 (13,5)	0,635
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	238 (81,5)	127 (81,9)	0,989
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	644,0 (319,0 - 1236,3)	651,5 (315,3 - 1506,5)	0,787
Trasplante previo [n (%)]	60 (20,5)	32 (20,6)	0,981
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	31 (10,6)	23 (14,8)	0,192
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	25 (8,6)	9 (5,8)	0,296
Discordancia serológica frente a CMV [n (%)]			
Receptor positivo	269 (92,1)	142 (91,6)	
Donante positivo / receptor negativo	20 (6,8)	10 (6,5)	
Donante negativo / receptor negativo	3 (1,0)	3 (1,9)	
Edad del donante, años [media ± DE]	53,6 ± 16,9	52,9 ± 16,2	0,681
Género del donante (masculino) [n (%)]	193 (66,1)	98 (63,2)	0,545
Donante en asistolia [n (%)]	98 (33,6)	47 (30,3)	0,486
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	16,7 ± 6,4	16,9 ± 6,8	0,641
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	4 (3 - 5)	4 (4 - 5)	0,245
Inducción con globulina antitimocítica policlonal [n (%)]	141 (48,3)	76 (49,0)	0,881
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	140 (48,1)	79 (52,0)	0,440
Necesidad de ingreso en UCI en el periodo post-operatorio inmediato [n (%)] ^a	3 (1,0)	3 (1,9)	0,347
Reintervención en la primera semana [n (%)]	10 (3,4)	11 (7,1)	0,081
Reintervención en el primer mes [n (%)]	30 (10,3)	22 (14,2)	0,219
Retraso en la función del injerto [n (%)]	172 (58,9)	99 (63,9)	0,306
Rechazo agudo del injerto [n (%)]	63 (21,6)	46 (29,7)	0,060

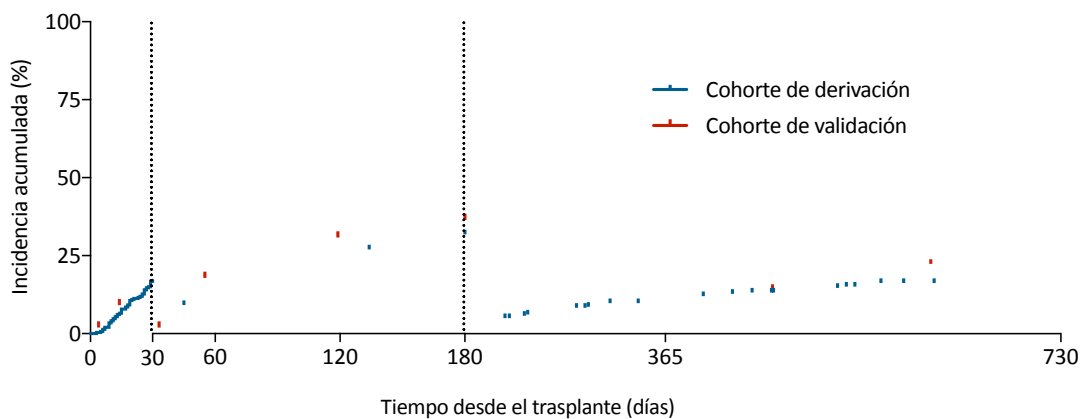
Neoplasia <i>de novo</i> post-trasplante [n (%)]	35 (12,0)	15 (9,7)	0,461
Pérdida del injerto [n (%)]	29 (9,9)	20 (12,9)	0,338
Mortalidad de cualquier causa [n (%)]	36 (12,3)	20 (12,9)	0,861

CMV: citomegalovirus; DE: desviación estándar; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); SAHS: síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño; VHB: virus de la hepatitis B; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Durante las dos primeras semanas post-trasplante.

significativas entre ambas en sus características demográficas y clínicas (incluyendo comorbilidades, etiología de la enfermedad renal de base, naturaleza del donante o tipo de inmunosupresión), ni en la incidencia acumulada de complicaciones no infecciosas (rechazo agudo del injerto, neoplasia *de novo*, pérdida del injerto o mortalidad) al final del periodo de seguimiento (**Tabla 16**). Tampoco hubo diferencias significativas en las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección entre la cohorte de derivación y la de validación a lo largo de los diversos periodos post-trasplante: precoz (17,1% versus 20,9%, respectivamente; $P = 0,282$); intermedio (31,9% versus 36,6%; $P = 0,241$); y tardío (19,0% versus 26,0%; $P = 0,605$) (**Figura 14**).

Figura 14. Comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global en las cohortes de derivación y de validación en función del periodo post-trasplante: precoz, intermedio y tardío (seguimiento truncado a los 2 años).



7.6. Construcción de los modelos clínicos de predicción

En primer lugar (como detalla en la sección 4.6.2) fueron construidos varios modelos de predicción exclusivamente clínicos (es decir, sin incorporar ninguna variable inmunológica), para infección global y para infección bacteriana, y para cada uno de los tres periodos post-trasplante en los que ha sido estratificado el seguimiento (precoz [primer mes], intermedio [meses 1 a 6] y tardío [a partir del mes 6]).

Tabla 17. Análisis univariante y multivariante de factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante precoz (primer mes) en la cohorte de derivación (n = 292).

Variable	Infección precoz (n = 50)	No infección precoz (n = 242)	P	Modelo univariante			Modelo multivariante		
				HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	58,5 ± 14,8	54,7 ± 14,8	0,099						
Género del receptor (masculino) [n (%)]	32 (64,0)	144 (59,5)	0,554						
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]									
Diabetes mellitus	20 (40,0)	60 (24,8)	0,028	1,84 ^b	1,04 - 3,23	0,035			
EPOC	13 (26,0)	17 (7,0)	0,000	3,48	1,85 - 6,55	0,000	3,64	1,87 - 7,07	0,000
Enfermedad aterotrombótica ^a	13 (26,0)	28 (11,6)	0,008	2,32	1,23 - 4,37	0,009	-	-	-
Hepatopatía crónica	0 (0,0)	13 (5,4)	0,135						
Número de comorbilidades pre-trasplante [mediana (RIQ)]	2 (1 - 3)	1 (1 - 2)	0,004	1,36	1,10 - 1,67	0,004	-	-	-
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]									
Glomerulonefritis	9 (18,0)	52 (21,5)	0,581						
Nefropatía diabética	15 (30,0)	41 (16,9)	0,033	1,95	1,06 - 3,57	0,031	2,11	1,12 - 3,97	0,020
Enfermedad renal poliquística	7 (14,0)	36 (14,9)	0,874						
Nefroangioesclerosis hipertensiva	7 (14,0)	28 (11,6)	0,630						
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	48 (96,0)	228 (94,2)	1,000						
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	610,5 (298,8 - 1197,5)	654 (324,8 - 1241)	0,821						
Trasplante previo [n (%)]	10 (20,0)	50 (20,7)	0,916						
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	6 (12,0)	25 (10,3)	0,727						
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	4 (8,0)	21 (8,7)	1,000						

Discordancia serológica frente a CMV (D+/R-) [n (%)]	0 (0,0)	20 (8,3)	0,031	0,04	0,00 - 4,64	0,189			
Edad del donante, años [media ± DE]	58,6 ± 18,0	52,5 ± 16,5	0,021	1,02	1,00 - 1,04	0,025	-	-	-
Donante en asistolia [n (%)]	12 (24,0)	86 (35,5)	0,116						
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	17,3 ± 7,0	16,5 ± 6,2	0,426						
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	4 (3 - 5)	4 (3 - 5)	0,786						
Inducción con globulina antitimocítica policlonal [n (%)]	22 (44,0)	119 (49,2)	0,505						
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	18 (36,7)	122 (50,4)	0,081	0,61	0,34 - 1,09	0,097	-	-	-
Reintervención en la primera semana [n (%)]	2 (4,0)	8 (3,3)	0,682						
Retraso en la función del injerto [n (%)]	31 (62,0)	141 (58,3)	0,625						

CMV: citomegalovirus; D+/R-: donante seropositivo/receptor seronegativo; DE: desviación estándar; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos); IC: intervalo de confianza; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Incluye cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular.

Esta variable no fue incluida en el modelo multivariante debido a la presencia de multicolinealidad significativa de acuerdo con el factor de inflación de varianza (FIV = 3,284).

Tabla 18. Análisis univariante y multivariante (regresión logística de Cox) de factores de riesgo naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Variable	Infección intermedia (n = 93)	No infección intermedia (n = 199)	P	Modelo univariante			Modelo multivariante		
				HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	60,3 ± 14,6	53,0 ± 14,4	0,000	1,03	1,02 - 1,05	0,000	1,03	1,01 - 1,05	0,001
Género del receptor (masculino) [n (%)]	58 (62,4)	118 (59,3)	0,618						
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]									
Diabetes mellitus	28 (30,1)	52 (26,1)	0,478						
EPOC	12 (12,9)	18 (9,0)	0,312						
Enfermedad aterotrombótica ^a	12 (12,9)	29 (14,6)	0,702						
Hepatopatía crónica	4 (4,3)	9 (4,5)	1,000						
Número de comorbilidades pre-trasplante [mediana (RIQ)]	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	0,332						
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]									
Glomerulonefritis	14 (15,1)	47 (23,6)	0,094	0,63	0,36 - 1,11	0,110			
Nefropatía diabética	20 (21,5)	36 (18,1)	0,490						
Enfermedad renal poliquística	19 (20,4)	24 (12,1)	0,060	1,59	0,96 - 2,64	0,069	-	-	-
Nefroangioesclerosis hipertensiva	9 (9,7)	26 (13,1)	0,406						
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	88 (94,6)	188 (94,5)	0,958						
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	638,5 (287,8 - 1214,5)	651 (324,8 - 1241)	0,923						
Trasplante previo [n (%)]	19 (20,4)	41 (20,6)	0,973						
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	11 (11,8)	20 (10,1)	0,646						
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	9 (9,7)	16 (8,0)	0,641						
Discordancia serológica frente a CMV (D+/R-) [n (%)]	9 (9,7)	11 (5,5)	0,191						

Edad del donante, años [media ± DE]	58,1 ± 16,7	51,4 ± 16,6	0,002	1,02	1,01 - 1,04	0,000	-	-	-
Donante en asistolia [n (%)]	23 (24,7)	75 (37,7)	0,029	0,59	0,37 - 0,94	0,026	-	-	-
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	18,3 ± 5,8	15,9 ± 6,5	0,002	1,05	1,02 - 1,09	0,003	-	-	-
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	5 (4 - 5)	4 (3 - 5)	0,091	1,16	0,98 - 1,37	0,095	-	-	-
Inducción con globulina antitímocítica policlonal [n (%)]	38 (40,9)	103 (51,8)	0,083	0,64 ^d	0,43 - 0,97	0,036			
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	35 (38,0)	105 (52,8)	0,019	0,55	0,36 - 0,84	0,006			
Reintervención en el primer mes [n (%)]	15 (16,1)	15 (7,5)	0,024	2,36	1,36 - 4,11	0,002	2,31	1,27 - 4,20	0,006
Retraso en la función del injerto [n (%)]	57 (61,3)	115 (57,8)	0,571						
FGe en el mes 1, mL/min [media ± DE]	35,8 ± 15,2	45,6 ± 21,9	0,000	0,98	0,97 - 0,99	0,000	0,98	0,97 - 0,99	0,007
Niveles de tacrólimus en el mes 1, ng/mL [media ± DE] ^b	10,1 ± 11,9	10,3 ± 7,6	0,907						
Niveles de MMF/AMF en el mes 1, ng/mL [media ± DE] ^c	3,3 ± 2,1	2,9 ± 1,8	0,569						
Albumina sérica en el mes 1, g/dL [media ± DE]	3,8 ± 0,6	4,0 ± 0,5	0,000	0,43	0,29 - 0,63	0,000	-	-	-
Rechazo agudo del injerto en el primer mes [n (%)]	15 (16,1)	17 (8,5)	0,053	1,70	0,98 - 2,96	0,059	-	-	-
Infección de cualquier tipo en el primer mes [n (%)]	25 (26,9)	25 (12,6)	0,002	2,26	1,43 - 3,58	0,001	-	-	-

CMV: citomegalovirus; D+/R-: donante seropositivo/receptor seronegativo; DE: desviación estándar; FGe: filtrado glomerular estimado; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos); IC: intervalo de confianza; MMF/AMF: mofetil micofenolato/ácido micofenólico; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Incluye cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular.

^b Información acerca de los niveles valle de tacrólimus no disponible en 38 pacientes (13,1% de los pacientes que recibieron este fármaco).

^c Información acerca de los niveles valle de mofetil micofenolato/ácido no disponible en 196 pacientes (75,7% de los pacientes que recibieron este fármaco).

Esta variable no fue incluida en el modelo multivariante debido a la presencia de multicolinealidad significativa de acuerdo con el factor de inflación de varianza (FIV = 3,677).

Tabla 19. Análisis univariante y multivariante (regresión logística de Cox) de factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación (n = 276 [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]).

Variable	Infección tardía (n = 77)	No infección tardía (n = 199)	P	Modelo univariante			Modelo multivariante		
				HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	54,9 ± 15,3	54,7 ± 14,7	0,918						
Género del receptor (masculino) [n (%)]	41 (53,2)	126 (63,3)	0,125						
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]									
Diabetes mellitus	21 (27,3)	52 (26,1)	0,847						
EPOC	9 (11,7)	18 (9,0)	0,507						
Enfermedad aterotrombótica ^a	16 (20,8)	22 (11,1)	0,035	2,19	1,26 - 3,81	0,005	2,17	1,24 - 3,78	0,006
Hepatopatía crónica	4 (5,2)	9 (4,5)	0,760						
Número de comorbilidades pre-trasplante [mediana (RIQ)]	2 (1 - 2)	1 (1 - 2)	0,256						
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]									
Glomerulonefritis	13 (16,9)	46 (23,1)	0,257						
Nefropatía diabética	15 (19,5)	34 (17,1)	0,640						
Enfermedad renal poliquística	13 (16,9)	30 (15,1)	0,710						
Nefroangioesclerosis hipertensiva	10 (13,0)	23 (11,6)	0,743						
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	76 (98,7)	184 (92,5)	0,048	6,21	0,86 - 44,67	0,070	-	-	-
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	803 (449 - 1447)	576 (300 - 1130)	0,039	1,00	1,00 - 1,00	0,002	1,00	1,00 - 1,00	0,002
Trasplante previo [n (%)]	16 (20,8)	39 (19,6)	0,826						
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	11 (14,3)	18 (9,0)	0,203						
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	10 (13,0)	13 (6,5)	0,082	1,85	0,95 - 3,59	0,070	-	-	-
Discordancia serológica frente a CMV (D+/R-) [n (%)]	9 (11,7)	11 (5,5)	0,077	1,65	0,82 - 3,31	0,159			

Edad del donante, años [media ± DE]	54,8 ± 16,9	52,2 ± 16,9	0,251						
Donante en asistolia [n (%)]	21 (27,3)	74 (37,2)	0,120						
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	17,1 ± 5,9	16,3 ± 6,6	0,373						
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	4 (4 - 5))	4 (3 - 5)	0,467						
Inducción con globulina antitímocítica policlonal [n (%)]	37 (48,1)	98 (49,2)	0,859						
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	41 (53,9)	94 (47,2)	0,319						
Reintervención en el primer mes [n (%)]	4 (5,2)	20 (10,1)	0,199						
Retraso en la función del injerto [n (%)]	43 (55,8)	114 (57,3)	0,828						
FGe en el mes 6, mL/min [media ± DE]	48,5 ± 19,4	52,8 ± 19,4	0,108						
Niveles de tacrólimus en el mes 6, ng/mL [media ± DE] ^b	8,2 ± 3,8	7,3 ± 2,2	0,112						
Niveles de MMF/AMF en el mes 6, ng/mL [media ± DE] ^c	2,9 ± 1,8	3,2 ± 2,9	0,680						
Albumina sérica en el mes 6, g/dL [media ± DE]	4,2 ± 0,5	4,3 ± 0,4	0,107						
Rechazo agudo del injerto en los 6 primeros meses [n (%)]	20 (26,0)	29 (14,6)	0,026	1,95	1,17 - 3,25	0,010	1,86	1,11 - 3,17	0,019
Infección de cualquier tipo en los 6 primeros meses [n (%)]	25 (32,5)	54 (27,1)	0,379						

CMV: citomegalovirus; D+/R-: donante seropositivo/receptor seronegativo; DE: desviación estándar; FGe: filtrado glomerular estimado; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos); IC: intervalo de confianza; MMF/AMF: mofetil micofenolato/ácido micofenólico; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Incluye cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular.

^b Información acerca de los niveles valle de tacrólimus no disponible en 163 pacientes (59,7% de los pacientes que recibieron este fármaco).

^b Información acerca de los niveles valle de mofetil micofenolato/ácido no disponible en 157 pacientes (63,5% de los pacientes que recibieron este fármaco).

Tabla 20. Análisis univariante y multivariante (regresión logística de Cox) de factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante precoz (primer mes) en la cohorte de derivación (n = 292).

Variable	Infección bacteriana precoz (n = 44)	No infección bacteriana precoz (n = 248)	P	Modelo univariante			Modelo multivariante		
				HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	58,4 ± 14,4	54,8 ± 14,9	0,138						
Género del receptor (masculino) [n (%)]	27 (61,4)	149 (60,1)	0,873						
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]									
Diabetes mellitus	16 (36,4)	64 (25,8)	0,148						
EPOC	12 (27,3)	18 (7,3)	0,000	3,66	1,86 - 7,12	0,000	4,02	2,05 - 7,88	0,000
Enfermedad aterotrombótica ^a	11 (25,0)	30 (12,1)	0,023	2,17	1,09 - 4,29	0,026	-	-	-
Hepatopatía crónica	0 (0,0)	13 (5,2)	0,229						
Número de comorbilidades pre-trasplante [mediana (RIQ)]	2 (1 - 3)	1 (1 - 2)	0,016	1,33	1,07 - 1,66	0,012	-	-	-
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]									
Glomerulonefritis	7 (15,9)	54 (21,8)	0,378						
Nefropatía diabética	13 (29,5)	43 (17,3)	0,058	1,87	0,98 - 3,57	0,059	2,14	1,11 - 4,12	0,024
Enfermedad renal poliquística	6 (13,6)	37 (14,9)	0,825						
Nefroangioesclerosis hipertensiva	7 (15,9)	28 (11,3)	0,385						
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	42 (95,5)	234 (94,4)	1,000						
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	548,5 (289,3 - 1372,0)	654 (325,8 - 1238,8)	0,851						
Trasplante previo [n (%)]	9 (20,5)	51 (20,6)	0,987						
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	6 (13,6)	25 (10,1)	0,436						
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	3 (6,8)	22 (8,9)	1,000						

Discordancia serológica frente a CMV (D+/R-) [n (%)]	0 (0,0)	20 (8,1)	0,052	0,04	0,00 - 6,49	0,221	-	-	-
Edad del donante, años [media ± DE]	58,6 ± 17,3	52,7 ± 16,7	0,033	1,02	1,00 - 1,04	0,040	-	-	-
Donante en asistolia [n (%)]	12 (27,3)	86 (34,7)	0,338						
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	16,9 ± 7,2	16,6 ± 6,2	0,850						
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	4 (4 - 5)	4 (3 - 5)	0,721						
Inducción con globulina antitimocítica policlonal [n (%)]	21 (47,7)	120 (48,4)	0,936						
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	17 (39,5)	123 (49,6)	0,223						
Reintervención en la primera semana [n (%)]	2 (4,5)	8 (3,2)	0,650						
Retraso en la función del injerto [n (%)]	28 (63,6)	144 (58,1)	0,489						

CMV: citomegalovirus; D+/R-: donante seropositivo/receptor seronegativo; DE: desviación estándar; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos); IC: intervalo de confianza; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Incluye cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular.

Tabla 21. Análisis univariante y multivariante (regresión logística de Cox) de factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Variable	Infección bacteriana intermedia (n = 57)	No infección bacteriana intermedia (n = 235)	P	Modelo univariante			Modelo multivariante		
				HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	61,1 ± 13,9	53,9 ± 14,8	0,001	1,03	1,01 - 1,05	0,001	1,02	0,99 - 1,04	0,058
Género del receptor (masculino) [n (%)]	38 (66,7)	138 (58,7)	0,272						
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]									
Diabetes mellitus	19 (33,3)	61 (26,0)	0,263						
EPOC	8 (14,0)	22 (9,4)	0,297						
Enfermedad aterotrombótica ^a	9 (15,8)	32 (13,6)	0,672						
Hepatopatía crónica	4 (7,0)	9 (3,8)	0,290						
Número de comorbilidades pre-trasplante [mediana (RIQ)]			0,415						
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]									
Glomerulonefritis	10 (17,5)	51 (21,7)	0,488						
Nefropatía diabética	13 (22,8)	43 (18,3)	0,438						
Enfermedad renal poliquística	10 (17,5)	33 (14,0)	0,503						
Nefroangioesclerosis hipertensiva	8 (14,0)	27 (11,5)	0,596						
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	55 (96,5)	221 (94,0)	0,746						
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]			0,064	1,00	1,00 - 1,01	0,237			
Trasplante previo [n (%)]	15 (26,3)	45 (19,1)	0,230						
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	7 (12,3)	24 (10,2)	0,649						
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	8 (14,0)	17 (7,2)	0,114						

Discordancia serológica frente a CMV (D+/R-) [n (%)]	2 (3,5)	18 (7,7)	0,385							
Edad del donante, años [media ± DE]	58,6 ± 16,5	52,3 ± 16,8	0,011	1,02	1,01 - 1,04	0,011	-	-	-	
Donante en asistolia [n (%)]	15 (26,3)	83 (35,3)	0,197							
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	17,7 ± 5,8	16,4 ± 6,5								
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]			0,258							
Inducción con globulina antitímocítica policlonal [n (%)]	23 (40,4)	118 (50,2)	0,181							
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	20 (35,7)	120 (51,1)	0,039	0,56	0,32 - 0,97	0,038	-	-	-	
Reintervención en el primer mes [n (%)]	13 (22,8)	17 (7,2)	0,001	3,53	1,89 - 6,58	0,000	-	-	-	
Retraso en la función del injerto [n (%)]	41 (71,9)	131 (55,7)	0,026	2,01	1,11 - 3,63	0,021	1,80	0,97 - 3,36	0,064	
FGe en el mes 1, mL/min [media ± DE]	35,9 ± 16,5	44,0 ± 21,1	0,007	0,98	0,97 - 0,99	0,007	-	-	-	
Niveles de tacrólimus en el mes 1, ng/mL [media ± DE] ^b	8,7 ± 2,6	10,6 ± 9,9	0,211							
Niveles de MMF/AMF en el mes 1, ng/mL [media ± DE] ^c	2,6 ± 1,1	3,1 ± 1,9	0,532							
Albúmina sérica en el mes 1, g/dL [media ± DE]	3,6 ± 0,6	4,0 ± 0,5	0,000	0,29	0,18 - 0,47	0,000	0,45	0,25 - 0,79	0,006	
Rechazo agudo del injerto en el primer mes [n (%)]	11 (19,3)	21 (8,9)	0,025	2,15	1,11 - 4,16	0,023	-	-	-	
Infección bacteriana en el primer mes [n (%)]	19 (33,3)	25 (10,6)	0,000	3,60	2,07 - 6,27	0,000	1,95	1,02 - 3,74	0,043	

CMV: citomegalovirus; D+/R-: donante seropositivo/receptor seronegativo; DE: desviación estándar; FGe: filtrado glomerular estimado; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos); IC: intervalo de confianza; MMF/AMF: mofetil micofenolato/ácido micofenólico; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Incluye cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular.

^b Información acerca de los niveles valle de tacrólimus no disponible en 3 pacientes (13,1% de los pacientes que recibieron este fármaco).

^c Información acerca de los niveles valle de mofetil micofenolato/ácido n disponible en 19 pacientes (75,7% de los pacientes que recibieron este fármaco).

Tabla 22. Análisis univariante y multivariante (regresión logística de Cox) de factores de riesgo de naturaleza no inmunológica para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación (n = 276 [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 6]).

Variable	Infección bacteriana tardía (n = 52)	No infección bacteriana tardía (n = 224)	P	Modelo univariante			Modelo multivariante		
				HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad del receptor, años [media ± DE]	57,4 ± 14,6	54,2 ± 14,9	0,166						
Género del receptor (masculino) [n (%)]	28 (53,8)	139 (62,1)	0,276						
Principales comorbilidades pre-trasplante [n (%)]									
Diabetes mellitus	16 (30,8)	57 (25,4)	0,433						
EPOC	6 (11,5)	21 (9,4)	0,636						
Enfermedad aterotrombótica ^a	10 (19,2)	28 (12,5)	0,204						
Hepatopatía crónica	4 (7,7)	9 (4,0)	0,276						
Número de comorbilidades pre-trasplante [mediana (RIQ)]	2 (1 - 2,8)	1 (1 - 2)	0,117						
Etiología de la enfermedad renal de base [n (%)]									
Glomerulonefritis	8 (15,4)	51 (22,8)	0,242						
Nefropatía diabética	12 (23,1)	37 (16,5)	0,265						
Enfermedad renal poliquística	10 (19,2)	33 (14,7)	0,420						
Nefroangioesclerosis hipertensiva	6 (11,5)	27 (12,1)	0,918						
Diálisis pre-trasplante [n (%)]	52 (100,0)	208 (92,9)	0,048	22,42	0,19 - 2597,83	0,200	-	-	-
Tiempo en diálisis, días [mediana (RIQ)]	808 (453 - 1447)	585 (300 - 1159)	0,037						
Trasplante previo [n (%)]	11 (21,2)	44 (19,6)	0,806						
Inmunodepresión pre-trasplante [n (%)]	7 (13,5)	22 (9,8)	0,441						
Estado serológico VHC (IgG) positivo [n (%)]	8 (15,4)	15 (6,7)	0,052	2,25	1,06 - 4,78	0,035	2,51	1,16 - 5,44	0,020

Discordancia serológica frente a CMV (D+/R-) [n (%)]	4 (7,7)	16 (7,1)	1,000							
Edad del donante, años [media ± DE]	56,6 ± 17,5	52,1 ± 16,7	0,087	1,02	1,00 - 1,03	0,042	-	-	-	
Donante en asistolia [n (%)]	12 (23,1)	83 (37,1)	0,056							
Tiempo de isquemia fría, horas [media ± DE]	18,4 ± 4,8	16,1 ± 6,7	0,005	1,06	1,01 - 1,10	0,014	-	-	-	
Número de incompatibilidades HLA [mediana (RIQ)]	4 (4 - 5)	4 (3 - 5)	0,840							
Inducción con globulina antitímocítica policlonal [n (%)]	21 (40,4)	114 (50,9)	0,172							
Profilaxis frente a CMV [n (%)]	22 (43,1)	113 (50,4)	0,346							
Reintervención en el primer mes [n (%)]	3 (5,8)	21 (9,4)	0,586							
Retraso en la función del injerto [n (%)]	30 (57,7)	127 (56,7)	0,896							
FGe en el mes 6, mL/min [media ± DE]	46,4 ± 18,6	52,8 ± 19,5	0,034	0,98	0,96 - 0,99	0,021	0,99	0,97 - 1,00	0,099	
Niveles de tacrólimus en el mes 6, ng/mL [media ± DE] ^b	8,5 ± 4,2	7,3 ± 2,2	0,203							
Niveles de MMF/AMF en el mes 6, ng/mL [media ± DE] ^c	3,3 ± 1,8	3,2 ± 2,8	0,897							
Albúmina sérica en el mes 6, g/dL [media ± DE]	4,1 ± 0,5	4,3 ± 0,4	0,002	0,29	0,16 - 0,54	0,000	0,28	0,15 - 0,54	0,000	
Rechazo agudo del injerto en los 6 primeros meses [n (%)]	14 (26,9)	35 (15,6)	0,055	1,98	1,07 - 3,65	0,029	-	-	-	
Infección bacteriana en los 6 primeros meses [n (%)]	19 (36,5)	50 (22,3)	0,033	1,99	1,13 - 3,51	0,017	-	-	-	

CMV: citomegalovirus; D+/R-: donante seropositivo/receptor seronegativo; DE: desviación estándar; FGe: filtrado glomerular estimado; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HLA: *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitario humano); HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos); IC: intervalo de confianza; MMF/AMF: mofetil micofenolato/ácido micofenólico; RIQ: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; VHC: virus de la hepatitis C.

^a Incluye cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular.

^b Información acerca de los niveles valle de tacrólimus no disponible en 163 pacientes (59,7% de los pacientes que recibieron este fármaco).

^c Información acerca de los niveles valle de mofetil micofenolato/ácido n disponible en 157 pacientes (63,5% de los pacientes que recibieron este fármaco).

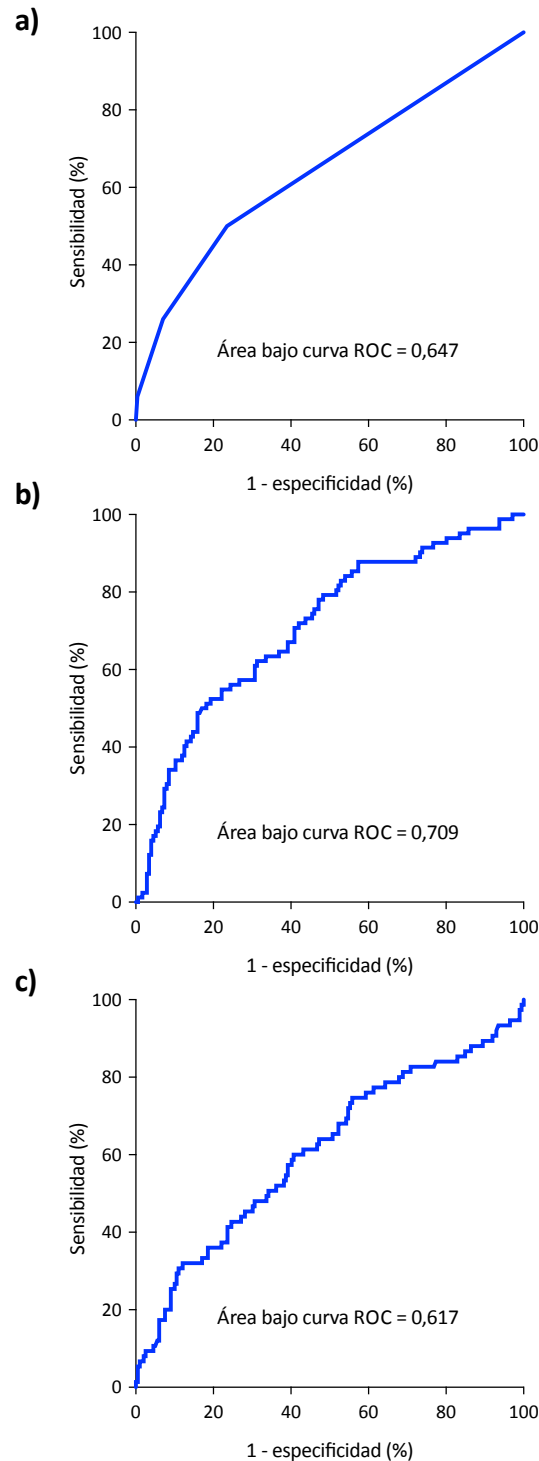
El diagnóstico pre-trasplante de EPOC (HR: 3,64; IC 95%: 1,87 - 7,07; $P < 0,0001$) y la nefropatía diabética como causa del TR (HR: 2,11; IC 95%: 1,12 - 3,97; $P = 0,020$) fueron identificados como factores de riesgo para el desarrollo de infección global en el periodo precoz (primer mes) (**Tabla 17**). La edad del receptor en el momento del TR (HR [por incremento unitario en años]: 1,03; IC 95%: 1,01 - 1,05; $P = 0,001$), la necesidad de reintervención quirúrgica durante el primer mes (HR: 2,31; IC 95%: 1,27 - 4,20; $P = 0,006$) y el FGe en el mes 1 (HR [por incremento unitario en mL/min]: 0,98; IC 95%: 0,97 - 0,99; $P = 0,007$) actuaron como factores de riesgo para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) (**Tabla 18**). Por último, el diagnóstico de enfermedad aterotrombótica pre-trasplante (HR: 2,17; IC 95%: 1,24 - 3,78; $P = 0,006$), la duración de la diálisis pre-trasplante (HR [por incremento unitario en días]: 1,00; IC 95%: 1,00 - 1,00; $P = 0,002$) y el rechazo agudo durante los 6 primeros meses (HR: 1,86; IC 95%: 1,11 - 3,17; $P = 0,019$) fueron los factores de riesgo identificados para el desarrollo de infección global en el periodo tardío (a partir del mes 6) (**Tabla 19**).

Por otra parte, tanto el diagnóstico pre-trasplante de EPOC (HR: 4,02; IC 95%: 2,05 - 7,88; $P < 0,0001$) como la nefropatía diabética (HR: 2,14; IC 95%: 1,11 - 4,12; $P = 0,024$) se revelaron igualmente como factores de riesgo de infección bacteriana en el periodo precoz (**Tabla 20**). La concentración de albúmina sérica en el mes 1 (HR [por incremento unitario en g/dL]: 0,45; IC 95%: 0,25 - 0,79; $P = 0,006$), el desarrollo previo de infección bacteriana en el primer mes (HR: 1,95; IC 95%: 1,02 - 3,74; $P = 0,043$) y, sin alcanzar la significación estadística, la edad del receptor en el momento del TR (HR [por incremento unitario en años]: 1,02; IC 95%: 0,99 - 1,04; $P = 0,059$) y el retraso en la función del injerto (HR: 1,80; IC 95%: 0,97 - 3,36; $P = 0,064$) fueron los factores de riesgo para la infección bacteriana en el periodo intermedio (**Tabla 21**). Finalmente, el estado IgG positivo para VHC (HR: 2,51; IC 95%: 1,16 - 5,44; $P = 0,020$), la concentración de albúmina sérica en el mes 6 (HR [por incremento unitario en g/dL]: 0,28; IC 95%: 0,15 - 0,54; $P < 0,0001$) y, sin alcanzar la significación, el FGe en el mes 6 (HR [por incremento unitario en mL/min]: 0,99; IC 95%: 0,97 - 1,00; $P = 0,099$) actuaron como factores de riesgo para el desarrollo de infección bacteriana tardía (**Tabla 22**).

Las áreas bajo la curva ROC correspondientes a los distintos modelos clínicos de predicción de infección global en la cohorte de derivación son mostradas en la **Figura 15**. El modelo resultante presentó una capacidad de discriminación modesta para el desarrollo de infección global en el periodo precoz (área bajo la curva ROC: 0,647; IC 95%: 0,556 - 0,738; $P = 0,001$). Dicha capacidad mejoró sensiblemente en la

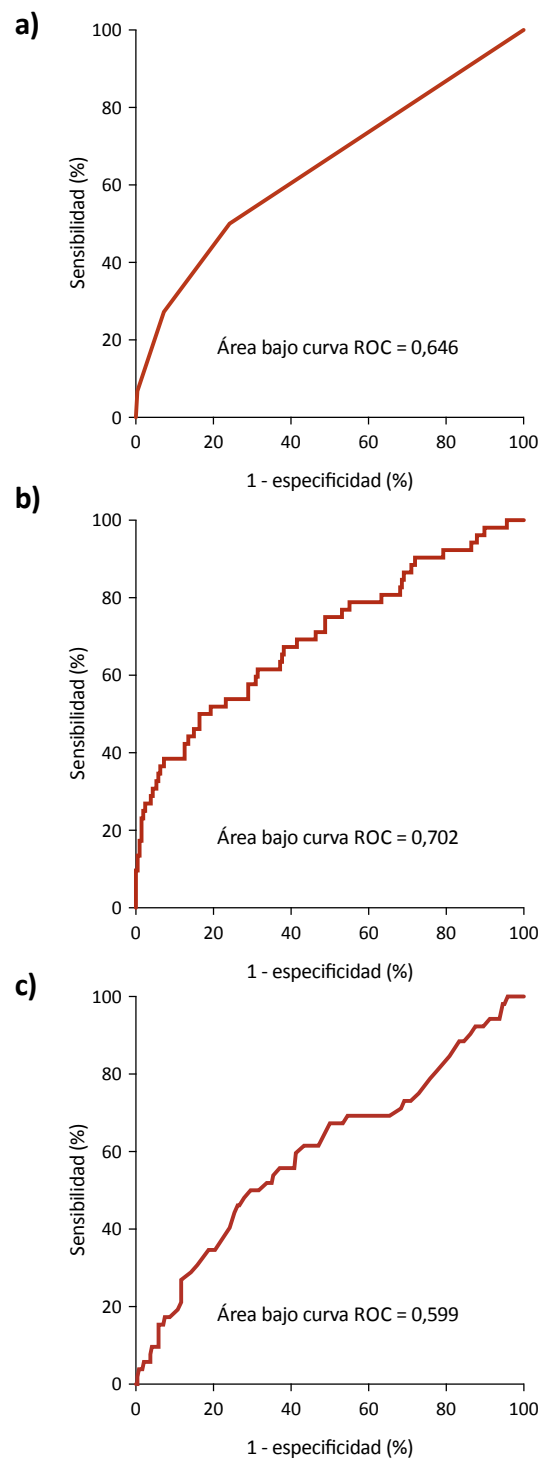
predicción de infección global en el periodo intermedio (área bajo la curva ROC: 0,709; IC 95%: 0,641 - 0,777; $P < 0,0001$), y volvió a empeorar hasta cierto punto en el modelo de predicción de infección global en el periodo tardío (área bajo la curva ROC: 0,617; IC 95%: 0,531 - 0,688; $P = 0,005$).

Figura 15. Áreas bajo la curva ROC de los modelos de predicción clínica para infección global en la cohorte de derivación en el periodo post-trasplante precoz **(a)**, intermedio **(b)** y tardío **(c)**. ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



El modelo clínico de predicción de infección bacteriana presentó una capacidad de discriminación modesta tanto en el periodo precoz (área bajo la curva ROC: 0,646; IC 95%: 0,549 - 0,743; $P = 0,002$) como en el tardío (área bajo la curva ROC: 0,599; IC 95%: 0,509 - 0,689; $P = 0,024$), y mejoró algo en el periodo intermedio (área bajo la curva ROC: 0,702; IC 95%: 0,616 - 0,787; $P < 0,0001$) (**Figura 16**).

Figura 16. Áreas bajo la curva ROC de los modelos de predicción clínica para infección bacteriana en la cohorte de derivación en el periodo post-trasplante precoz (**a**), intermedio (**b**) y tardío (**c**). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).

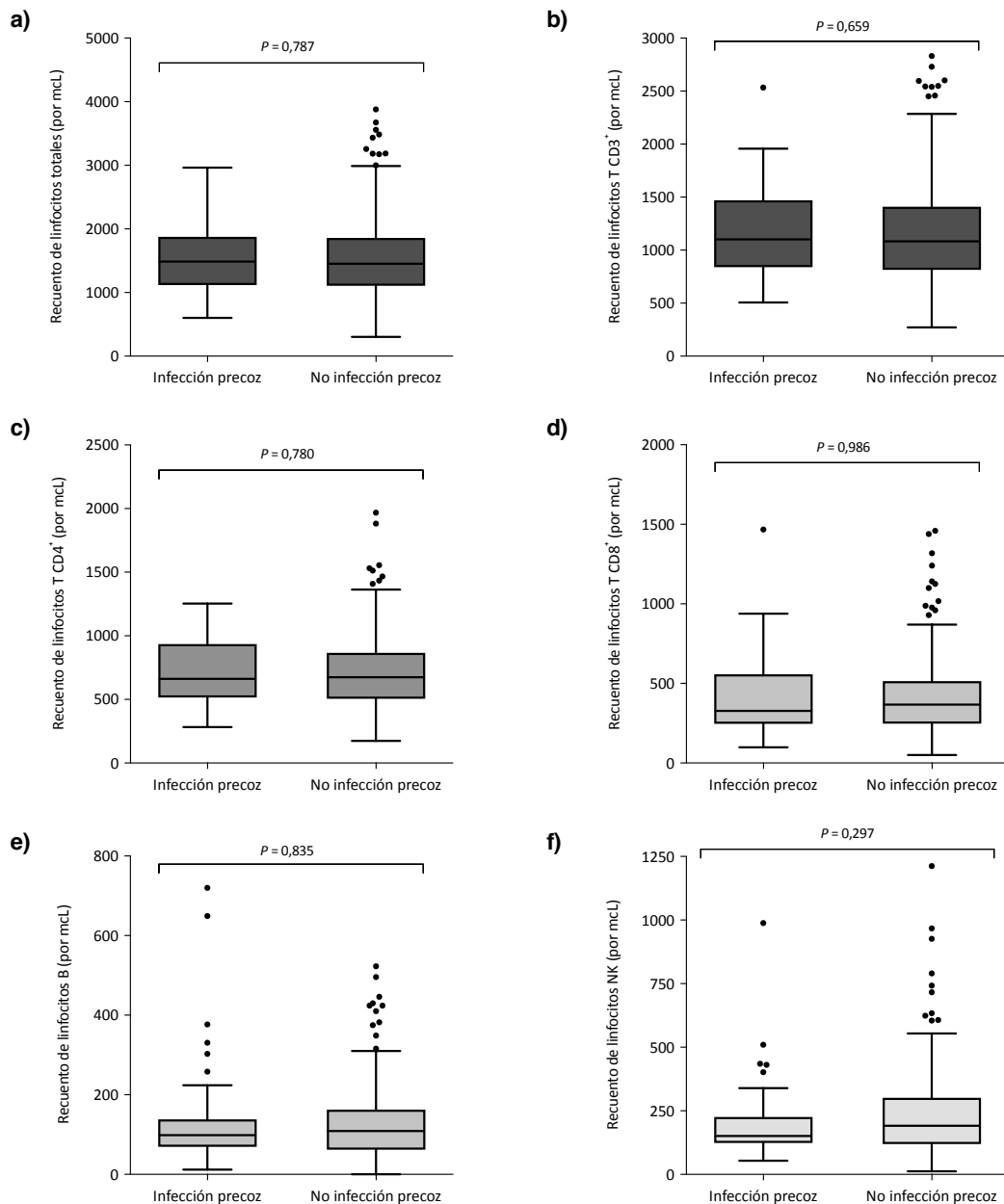


7.7. Relación entre parámetros inmunológicos y riesgo de infección

7.7.1. Parámetros inmunológicos basales y riesgo de infección durante el periodo precoz

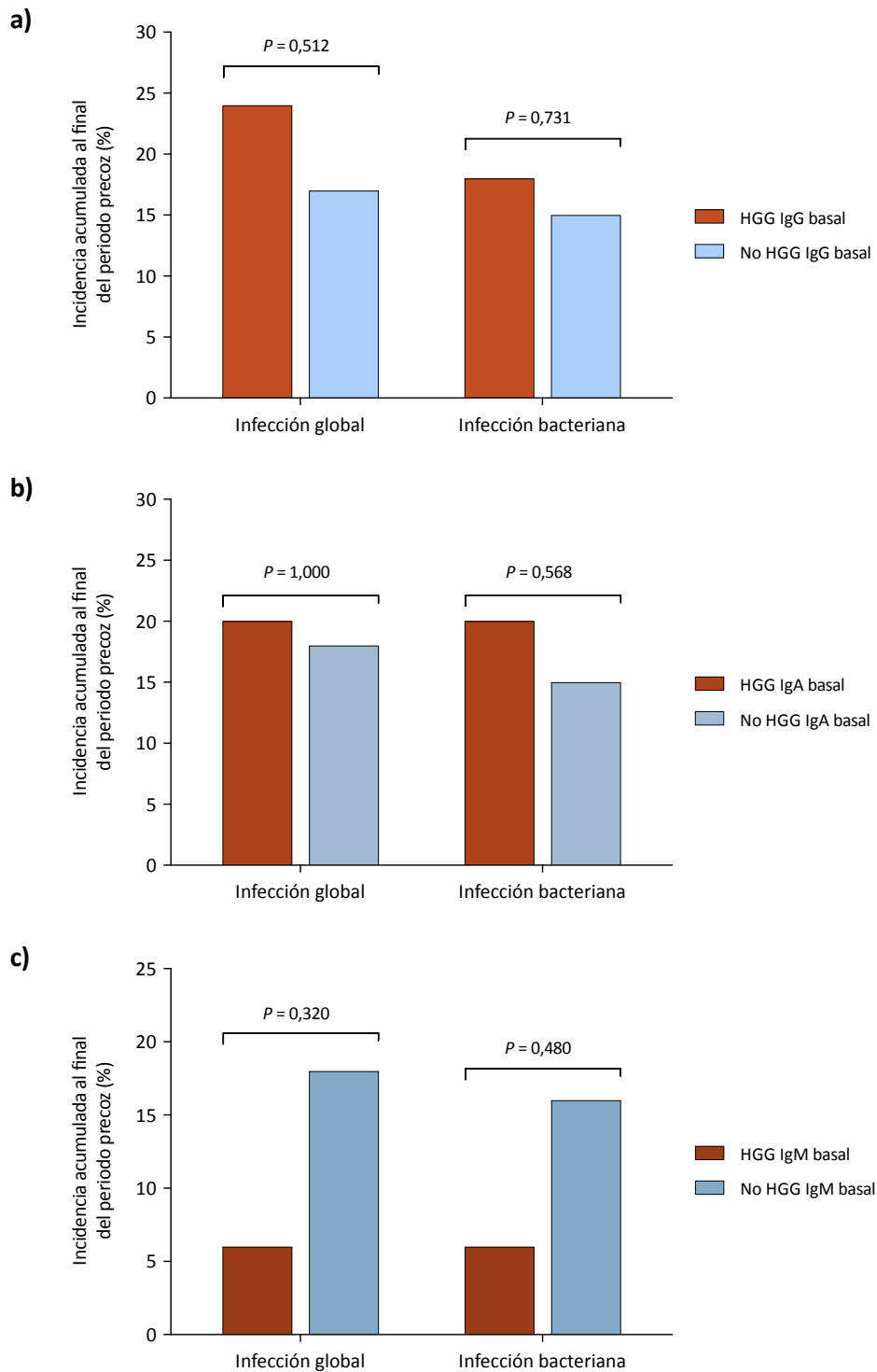
En primer lugar analizamos la capacidad de los parámetros inmunológicos medidos en el momento basal para predecir el desarrollo de infección durante el periodo post-trasplante precoz en la cohorte de derivación. No observamos diferencias significativas en las distintas subpoblaciones linfocitarias entre los pacientes que presentaron o no infección global o bacteriana a lo largo de dicho periodo (**Figura 17**).

Figura 17. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (**a**), linfocitos T CD3 (**b**), linfocitos T CD4 (**c**), linfocitos T CD8 (**d**), linfocitos B (**e**) y linfocitos NK (**f**) medidos en la evaluación basal entre pacientes con o sin infección global en el periodo post-trasplante precoz. NK: *natural killer* (asesino natural).



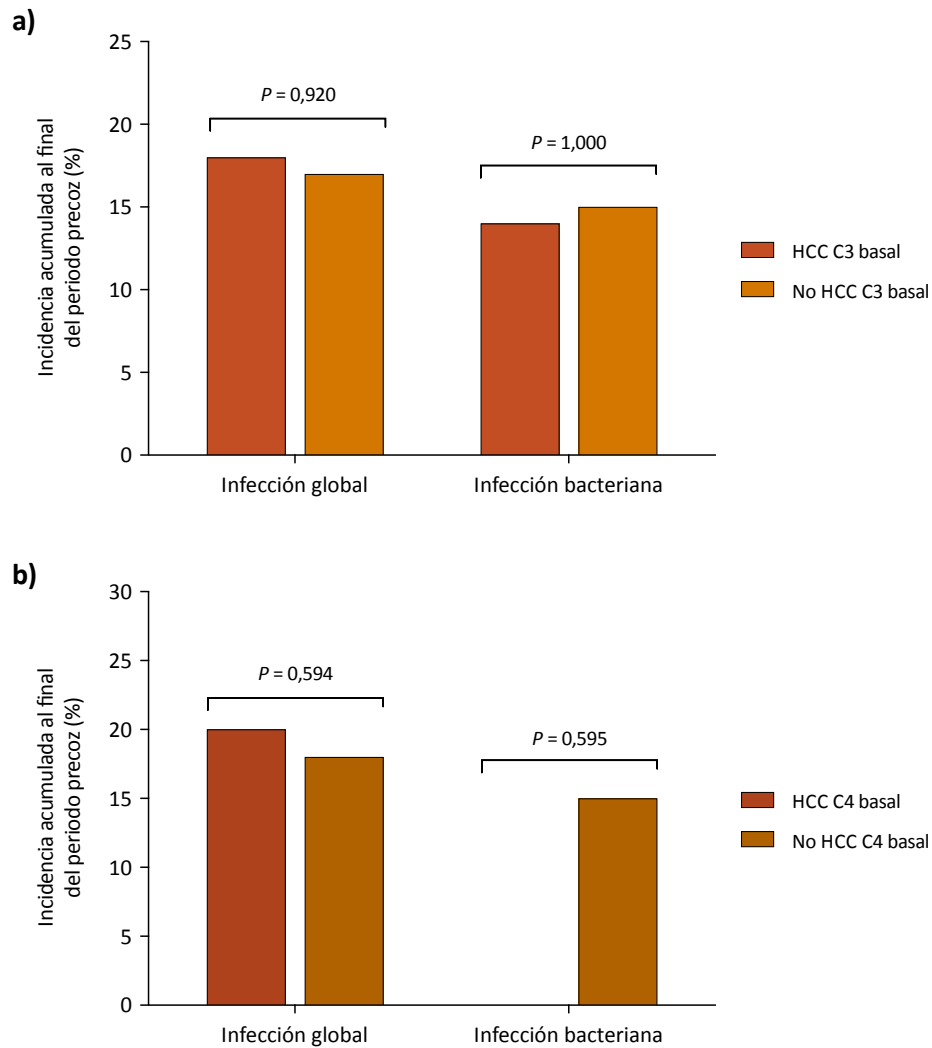
Tampoco observamos diferencias significativas en la incidencia acumulada de infección global al final del primer mes entre los pacientes con o sin HGG basal, con independencia de la clase de inmunoglobulina deficitaria. El análisis centrado en la infección bacteriana ofreció resultados similares (**Figura 18**).

Figura 18. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante precoz en pacientes con o sin hipogammaglobulinemia IgG (**a**), IgA (**b**) o IgM (**c**) en la evaluación basal en la cohorte de derivación. HGG: hipogammaglobulinemia.



Finalmente, tampoco hubo diferencias significativas en la incidencia acumulada de infección global al final del periodo precoz entre los pacientes con o sin HCC C3 o C4 en la evaluación basal. La incidencia de infección bacteriana precoz ofreció una distribución básicamente superponible (**Figura 19**).

Figura 19. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante precoz en pacientes con o sin hipocomplementemia C3 (**a**) y C4 (**b**) en la evaluación basal en la cohorte de derivación. HCC: hipocomplementemia.



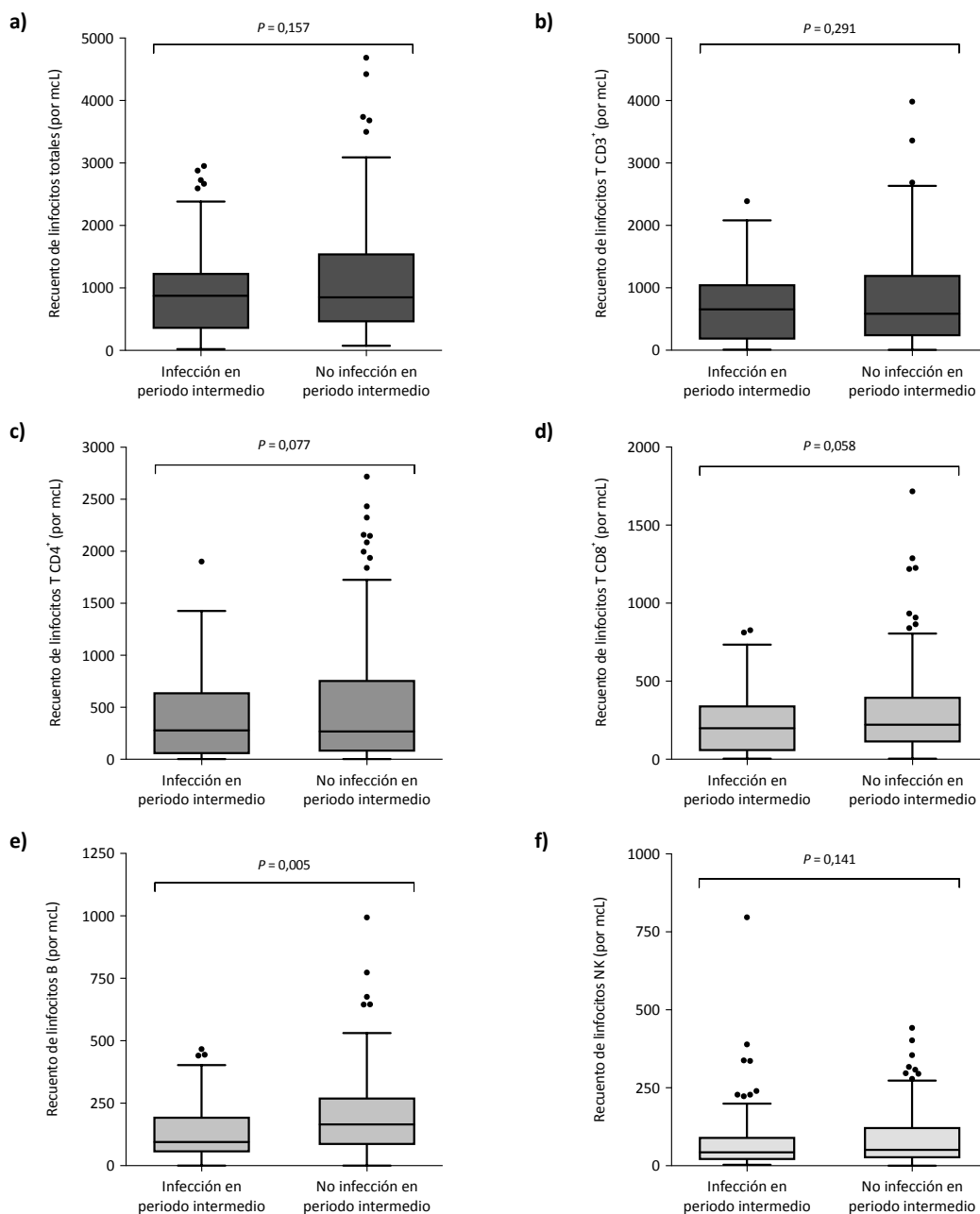
En vista de estos resultados no se pudo desarrollar ningún modelo basado en parámetros inmunológicos basales que permitiera predecir el riesgo de infección durante el periodo post-trasplante precoz.

7.7.2. Parámetros inmunológicos en el mes 1 y riesgo de infección durante el periodo intermedio

A continuación analizamos la asociación entre los parámetros inmunológicos medidos en el mes 1 post-trasplante y el riesgo de infección durante el periodo intermedio (meses 1 a 6). En este caso observamos diferencias estadísticamente significativas (o muy próximas a la significación) entre los pacientes con o

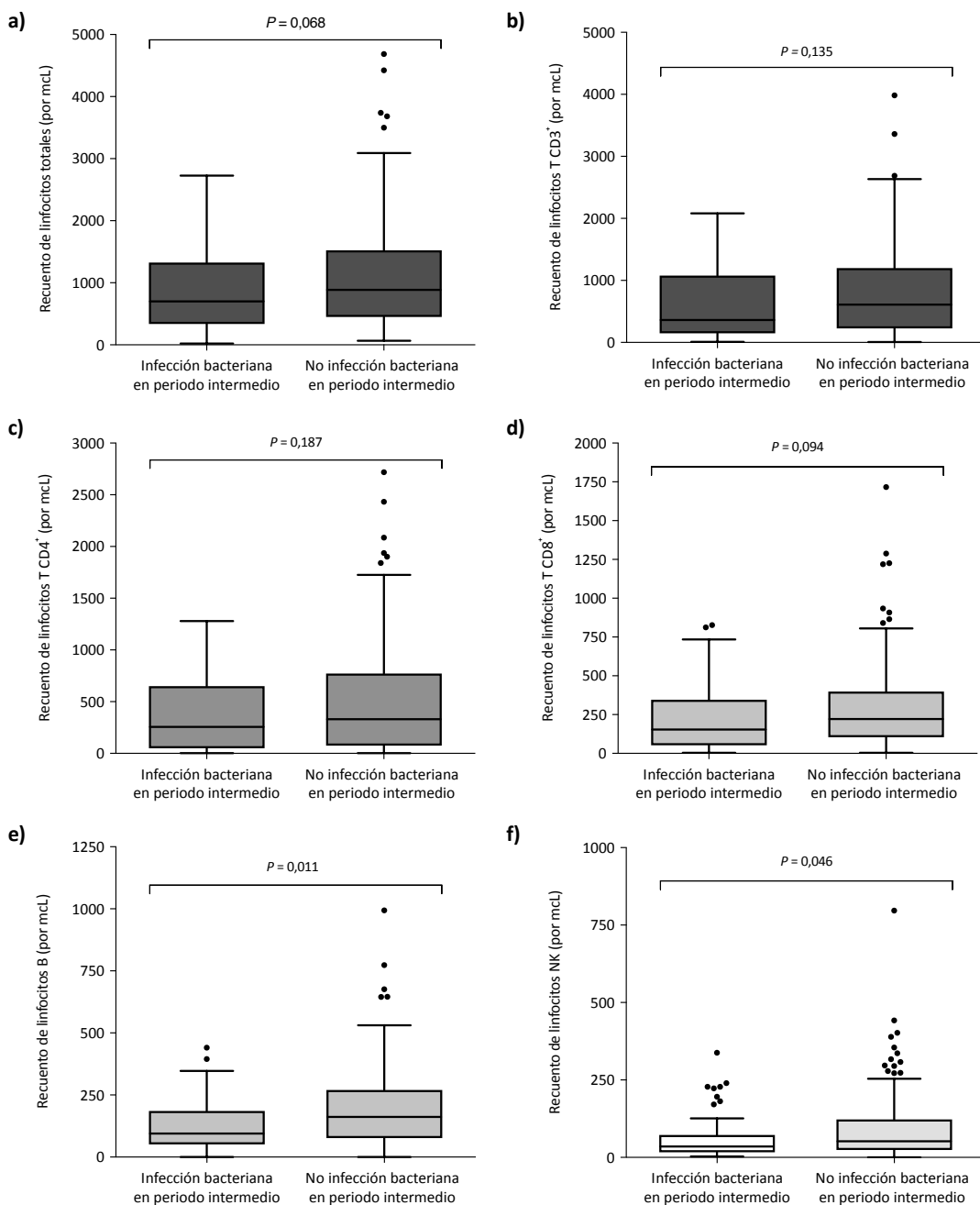
sin infección a lo largo de dicho periodo en los recuentos de linfocitos T CD4⁺ (mediana: 279 [50,5 - 645] versus 311 [80 - 680] céls/mcL; $P = 0,077$), linfocitos T CD8⁺ (mediana: 199 [52 - 346] versus 221 [107,5 - 400,5] céls/mcL; $P = 0,058$), y linfocitos B (mediana: 95 [53 - 196] versus 165 [83 - 273,3] céls/mcL; $P = 0,005$). No hubo diferencias, por otra parte, en el recuento linfocitario total o en de las restantes subpoblaciones en sangre periférica (**Figura 20**).

Figura 20. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (**a**), linfocitos T CD3 (**b**), linfocitos T CD4 (**c**), linfocitos T CD8 (**d**), linfocitos B (**e**) y linfocitos NK (**f**) medidos en el mes 1 entre pacientes con o sin infección global en el periodo post-trasplante intermedio. NK: *natural killer* (asesino natural).



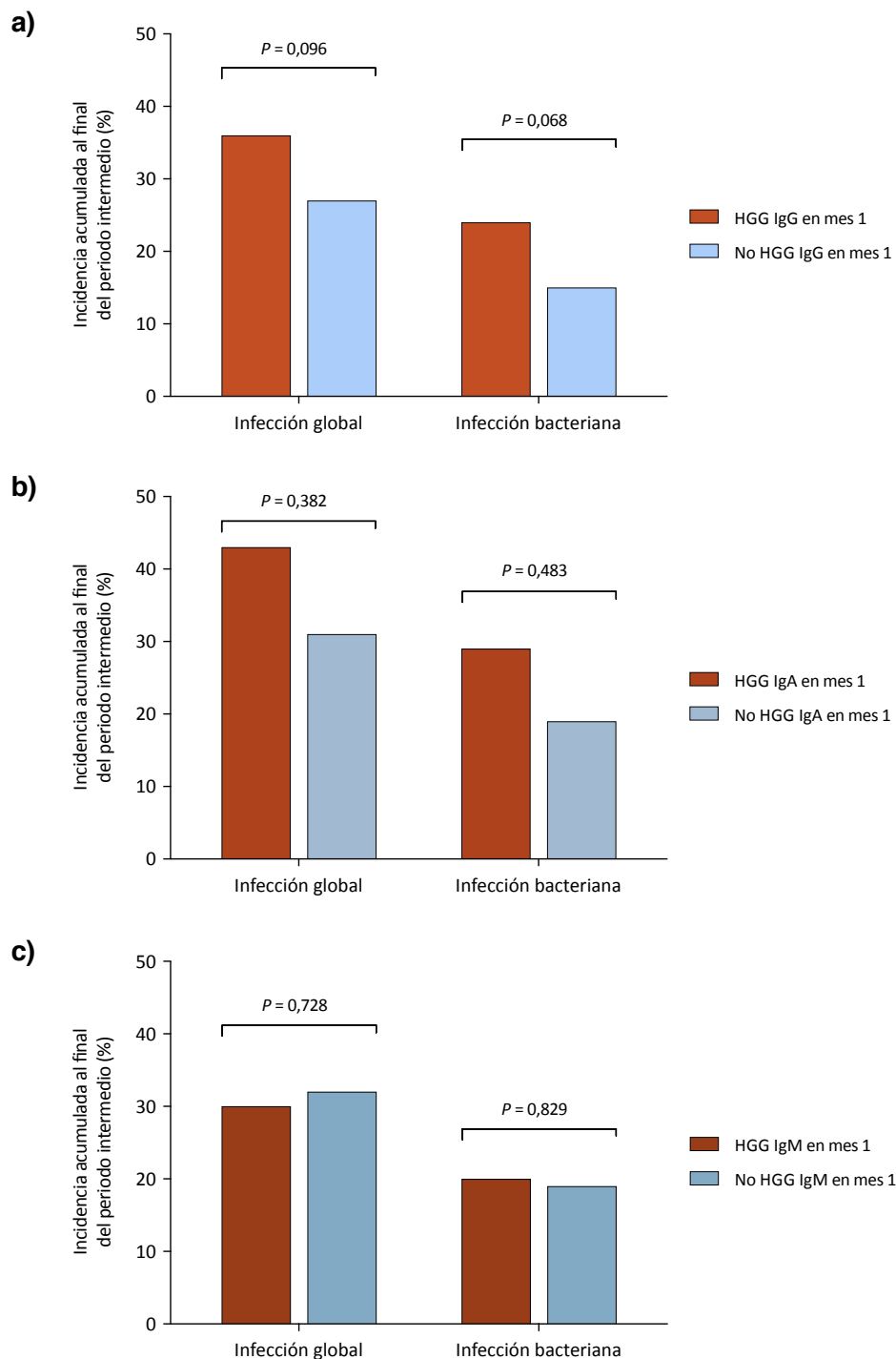
Al centrar el análisis en la infección bacteriana, encontramos diferencias significativas (o próximas a la significación) en el recuento linfocitario total (mediana: 700,5 [337,5 - 1.325,5] versus; $P = 0,068$), de linfocitos T CD8⁺ (mediana: 154 [52 - 346] versus 221 [107,5 - 400,5] céls/mcL; $P = 0,094$), de linfocitos B (mediana: 95 [51 - 186] versus 165 [83 - 273,3] céls/mcL; $P = 0,011$) y de linfocitos NK (mediana: 35 [16,5 - 72,5] versus 221 [107,5 - 400,5] céls/mcL; $P = 0,046$) (**Figura 21**).

Figura 21. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales (**a**), linfocitos T CD3 (**b**), linfocitos T CD4 (**c**), linfocitos T CD8 (**d**), linfocitos B (**e**) y linfocitos NK (**f**) medidos en el mes 1 entre pacientes con o sin infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio. NK: *natural killer* (asesino natural).



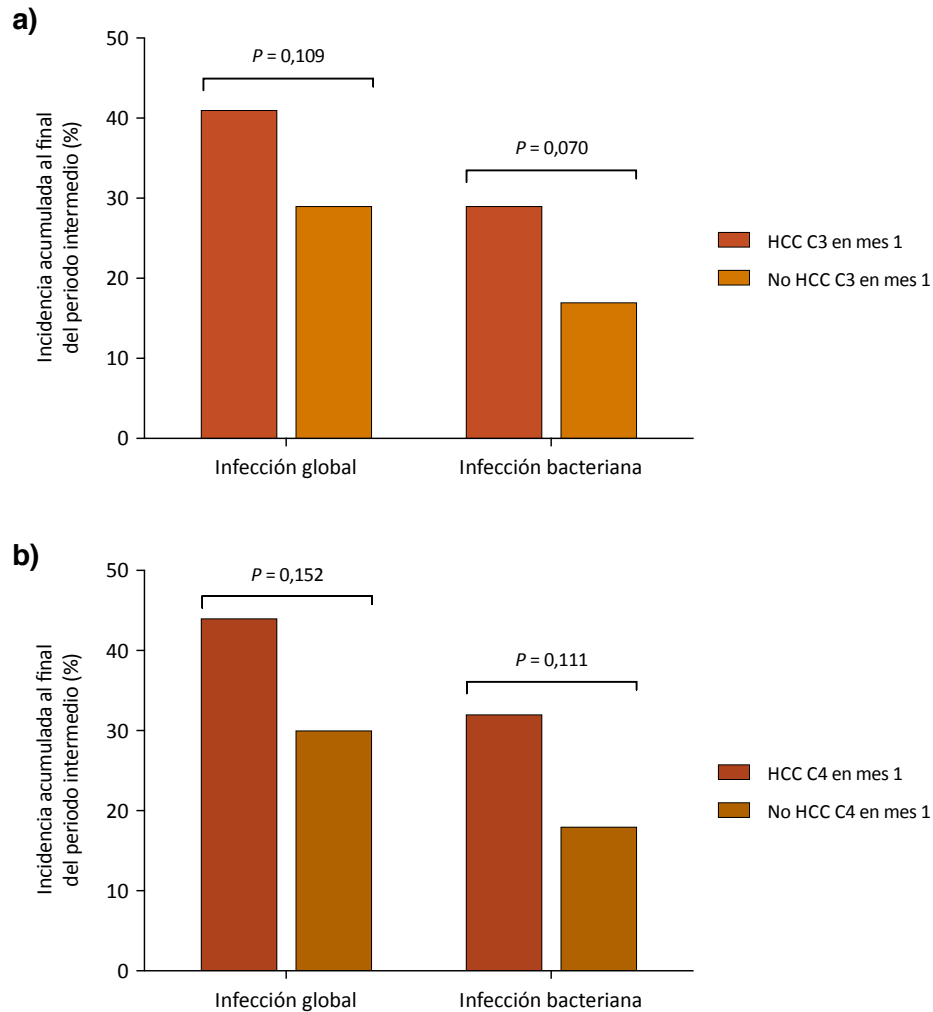
Los pacientes con HGG IgG en el mes 1 presentaron una tendencia hacia una mayor incidencia acumulada tanto de infección global (36,3% versus 26,9%; $P = 0,096$) como bacteriana (42,9% versus 31,0%; $P = 0,068$). A pesar de existir una diferencia numérica en la incidencia de ambos eventos entre los pacientes con o sin HGG IgA, las diferencias no alcanzaron la significación estadística (**Figura 22**).

Figura 22. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante intermedio (mes 6) en pacientes con o sin hipogammaglobulinemia IgG (**a**), IgA (**b**) o IgM (**c**) en el mes 1 en la cohorte de derivación. HGG: hipogammaglobulinemia.



Por último, también existió una tendencia hacia una mayor incidencia de infección global (40,8% versus 29,1%; $P = 0,101$) y bacteriana (28,6% versus 17,3%; $P = 0,070$) en pacientes con HCC C3. Esta tendencia, si bien atenuada, estuvo igualmente presente para la HCC C4 (**Figura 23**).

Figura 23. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante intermedio (mes 6) en pacientes con o sin hipocomplementemia C3 (**a**) y C4 (**b**) en el mes 1 en la cohorte de derivación. HCC: hipocomplementemia.



En vista de estos hallazgos, que apuntan hacia un papel predictor de ciertos parámetros inmunológicos medidos en el mes 1 post-trasplante respecto al riesgo de infección global y bacteriana en el periodo subsiguiente, tratamos de establecer los valores óptimos en términos de sensibilidad y especificidad mediante el estadístico J de Youden.

De este modo se seleccionaron una serie de puntos de corte para los recuentos de linfocitos T CD4⁺ (30 céls/mcL), T CD8⁺ (85 céls/mcL) y B (110 céls/mcL), así como para los niveles séricos de IgG (690 mg/dL), IgA (115 mg/dL) y C3 (76 mg/dL). Con la excepción del nivel de IgG <690 mg/dL, en todos los demás

parámetros se alcanzó la significación estadística aplicando los referidos puntos de corte en el análisis univariante (es decir, no ajustado) de regresión de Cox (**Tabla 23**).

Tabla 23. Puntos de corte óptimos (estadístico J de Youden) de los parámetros inmunológicos en el mes 1 seleccionados para la predicción del desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Parámetro (en mes 1)	Punto de corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	HR (IC 95%) ^a	P
Linfocitos T CD4 ⁺	30 céls/mcL	19,3% (11,4 - 29,4)	89,9% (84,5 - 93,9)	47,1% (32,3 - 62,3)	70,5% (68,0 - 72,8)	1,68 (0,97 - 2,90)	0,062
Linfocitos T CD8 ⁺	85 céls/mcL	33,7% (23,7 - 44,9)	80,3% (73,7 - 85,9)	44,4% (34,4 - 54,9)	72,2% (68,7 - 75,5)	1,73 (1,09 - 2,73)	0,019
Linfocitos B	110 céls/mcL	54,3% (42,9 - 65,4)	65,3% (57,6 - 72,4)	42,7% (35,9 - 49,8)	75,0% (69,8 - 79,6)	1,88 (1,22 - 2,91)	0,005
Niveles de IgG	690 mg/dL	56,5% (45,3 - 67,2)	55,4% (47,9 - 62,8)	36,9% (31,4 - 42,8)	73,4% (67,7 - 78,4)	1,48 (0,96 - 2,27)	0,074
Niveles de IgA	115 mg/dL	32,9% (23,1 - 43,9)	79,4% (72,8 - 84,9)	42,2% (32,7 - 52,7)	71,9% (68,5 - 75,2)	1,59 (1,02 - 2,51)	0,043
Niveles de C3	76 mg/dL	22,6% (14,2 - 33,1)	92,9% (88,3 - 96,2)	59,4% (43,1 - 73,8)	72,6% (70,1 - 74,9)	2,68 (1,61 - 4,78)	0,000

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^aAnálisis univariado no ajustado por otras covariables.

En el análisis restringido a la infección bacteriana se determinaron igualmente una serie de puntos de corte óptimos para los recuentos de linfocitos T CD8⁺ (155 céls/mcL), B (85 céls/mcL) y NK (68 céls/mcL), así como para los niveles séricos de IgG (500 mg/dL), IgA (147 mg/dL) y C3 (78 mg/dL). En todos los análisis univariantes se demostró la significación estadística tras dicotomizar el parámetro con arreglo a estos puntos, con la excepción de los niveles de IgA <147 mg/dL (**Tabla 24**).

7.7.3. Parámetros inmunológicos en el mes 6 y riesgo de infección durante el periodo tardío

Finalmente analizamos la capacidad predictiva de los parámetros inmunológicos medidos en el mes 6 post-trasplante. Observamos diferencias estadísticamente significativas en el recuento linfocitario total (mediana: 1.026,5 [596,3 - 1.652,5] versus 1.286 [781 - 1.826] céls/mcL; $P = 0,032$) y el de linfocitos NK (mediana: 108 [39 - 168] versus 129 [68,8 - 236,5] céls/mcL; $P = 0,009$) entre los pacientes con o sin infección global tardía (**Figura 24**). No hubo, en cambio, diferencias significativas en el recuento linfocitario total o en el de las distintas subpoblaciones en relación con el desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío.

Tabla 24. Puntos de corte óptimos (estadístico J de Youden) de los parámetros inmunológicos en el mes 1 seleccionados para la predicción del desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Parámetro (en mes 1)	Punto de corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	HR (IC 95%) ^a	P
Linfocitos T CD8 ⁺	155 céls/mcL	50,9% (36,6 - 65,3)	67,1% (60,3 - 73,5)	27,4% (21,3 - 34,4)	84,9% (80,8 - 88,3)	1,89 (1,09 - 3,27)	0,023
Linfocitos B	85 céls/mcL	46,9% (32,5 - 61,7)	72,8% (66,1 - 78,8)	29,5% (22,4 - 37,8)	84,9% (81,1 - 88,2)	2,13 (1,22 - 3,73)	0,008
Linfocitos NK	68 céls/mcL	75,5% (61,1 - 86,7)	43,6% (36,6 - 50,7)	24,5% (20,9 - 28,4)	88,0% (81,4 - 92,5)	2,18 (1,14 - 4,19)	0,019
Niveles de IgG	500 mg/dL	21,2% (11,1 - 34,7)	93,1% (88,9 - 96,1)	42,3% (26,4 - 60,0)	88,1% (80,9 - 85,1)	2,99 (1,53 - 5,82)	0,001
Niveles de IgA	147 mg/dL	50,0% (35,8 - 64,2)	55,8% (48,9 - 62,5)	21,3% (16,6 - 26,9)	82,3% (77,6 - 86,2)	1,19 (0,69 - 2,06)	0,538
Niveles de C3	78 mg/dL	26,9% (15,6 - 41,0)	89,9% (85,1 - 93,5)	38,9% (25,9 - 53,6)	83,7% (81,2 - 85,9)	2,87 (1,55 - 5,32)	0,001

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza; NK: *natural killer*; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

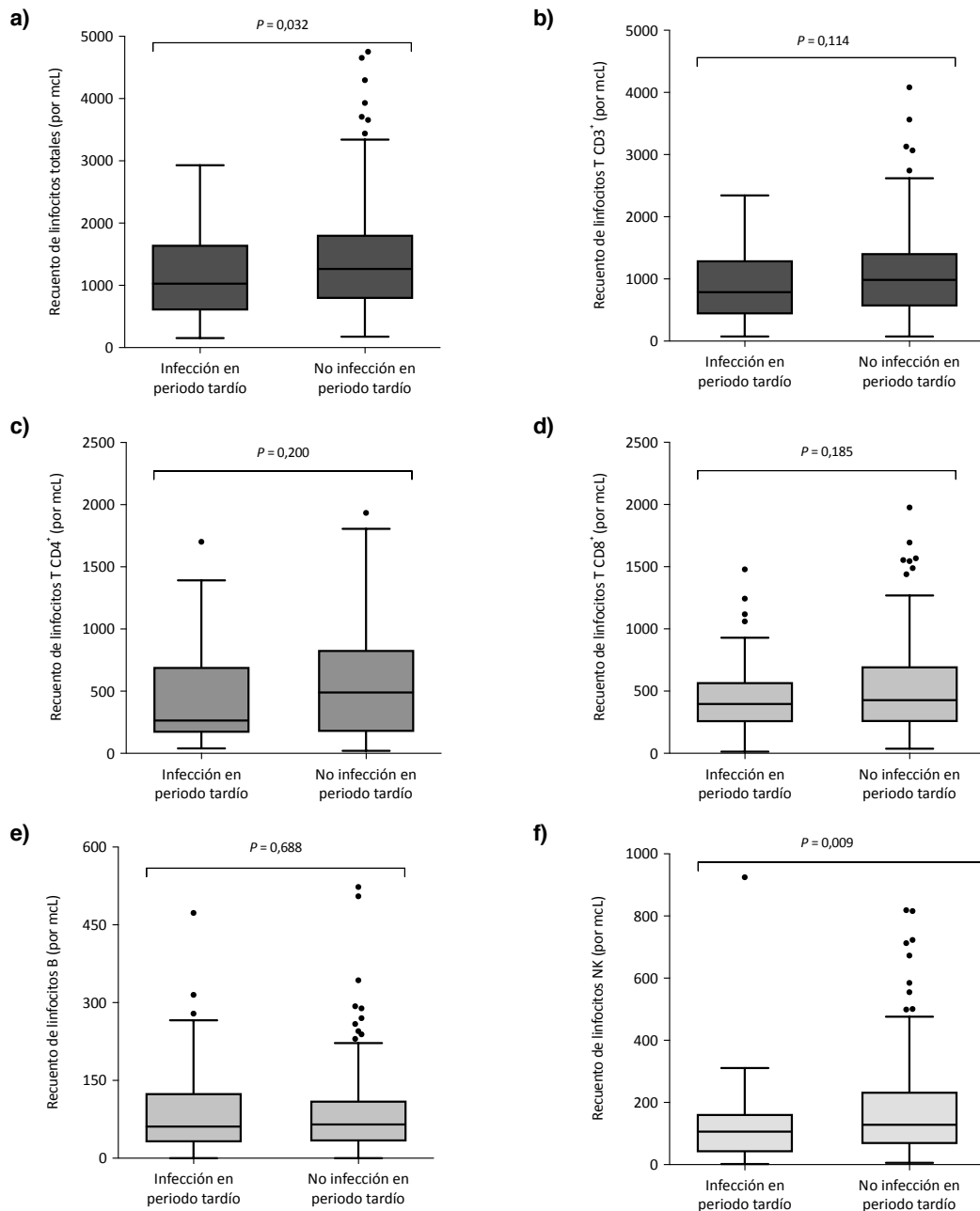
^aAnálisis univariado *n* ajustado por otras covariables.

Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la incidencia acumulada de infección global o bacteriana entre los pacientes con HGG de cualquier clase en el mes 6 y los que presentaron niveles séricos de inmunoglobulinas normales en dicho punto (**Figura 25**).

Por último, los pacientes con HCC C3 en el mes 6 presentaron mayor incidencia acumulada de infección global (43,5% versus 24,3%; $P = 0,049$) y de infección bacteriana (34,8% versus 15,3%; $P = 0,020$) al final del periodo de seguimiento respecto a los pacientes con niveles séricos normales de este factor del complemento. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la incidencia acumulada al final del periodo de seguimiento en ninguno de estos dos eventos entre los pacientes con o sin HCC C4 en el mes 6 post-trasplante (**Figura 26**).

Un vez más fueron calculados los puntos de corte óptimos para estos parámetros medidos en el mes 6 según el estadístico J de Youden. En el caso del recuento linfocitario total y el de linfocitos NK los puntos con mejor combinación de sensibilidad y especificidad fueron 1038 y 232 céls/mcL, respectivamente (**Tabla 25**). Para los niveles séricos de C3 el punto óptimo elegido fue de 103 mg/dL, tanto para infección global como para infección bacteriana (**Tablas 25 y 26**).

Figura 24. Gráficos de caja y bigotes tipo Tukey comparando, en la cohorte de derivación, los recuentos de linfocitos totales **(a)**, linfocitos T CD3 **(b)**, linfocitos T CD4 **(c)**, linfocitos T CD8 **(d)**, linfocitos B **(e)** y linfocitos NK **(f)** medidos en el mes 6 entre pacientes con o sin infección global en el periodo post-trasplante tardío. NK: *natural killer*.

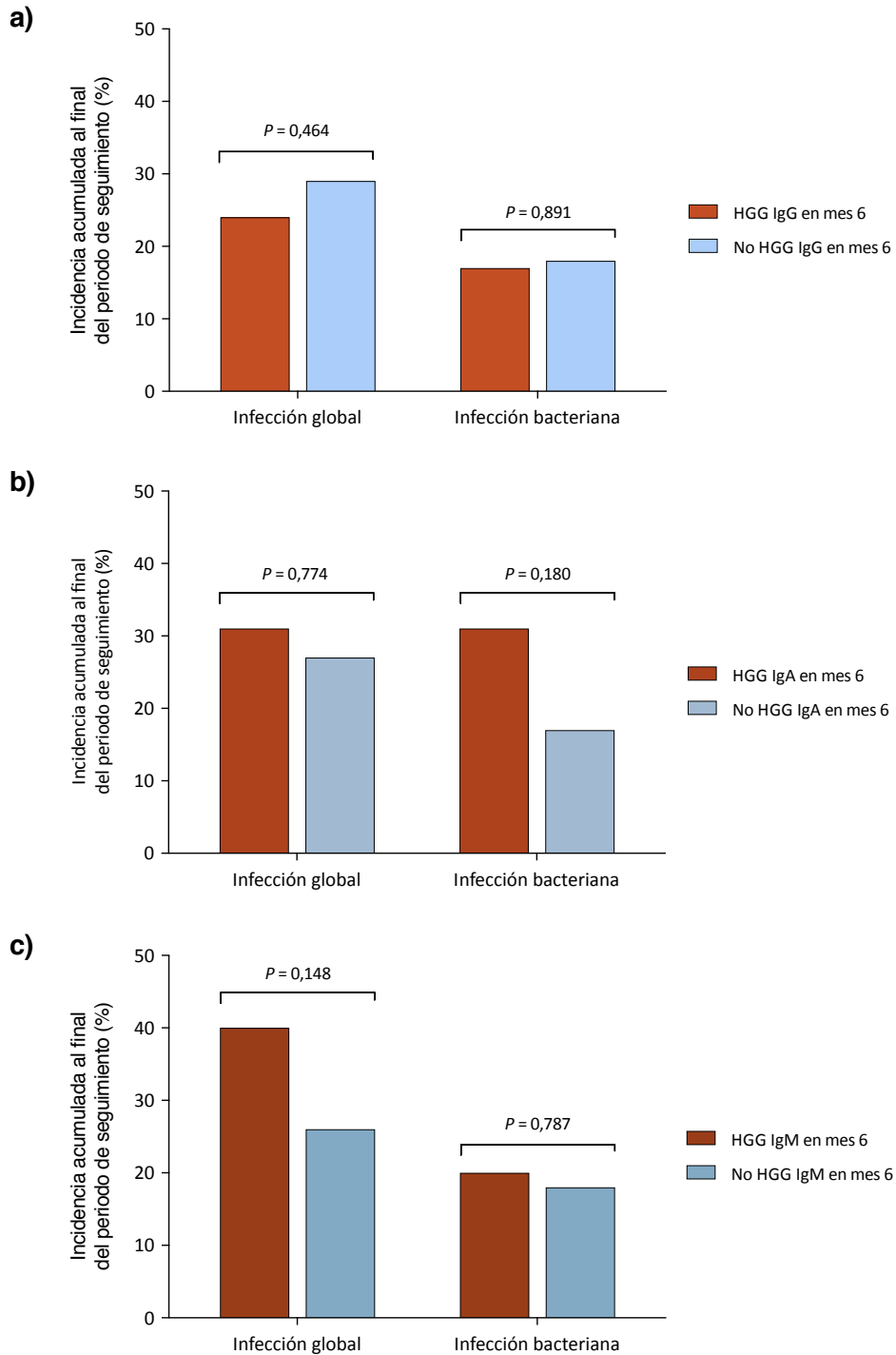


7.8. Construcción de los modelos inmunológicos y combinados de predicción

7.8.1. Modelos de predicción de infección global en el periodo intermedio

A fin de ponderar en el modelo el peso relativo de cada uno de los parámetros se llevó a cabo un análisis multivariante de regresión logística en la cohorte de derivación para predecir el evento de interés.

Figura 25. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante tardío (final de seguimiento) en pacientes con o sin hipogammaglobulinemia IgG **(a)**, IgA **(b)** o IgM **(c)** en el mes 6 en la cohorte de derivación. HGG: hipogammaglobulinemia.



Las variables independientes introducidas en este modelo fueron los parámetros inmunológicos medidos en el mes 1 post-trasplante que ya había sido identificados, dicotomizados con arreglo al punto de corte óptimo previamente establecido (**Tabla 23**).

Figura 26. Incidencia acumulada de infección global y de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante tardío (final de seguimiento) en pacientes con o sin hipocomplementemia C3 (a) y C4 (b) en el mes 6 en la cohorte de derivación. HCC: hipocomplementemia.

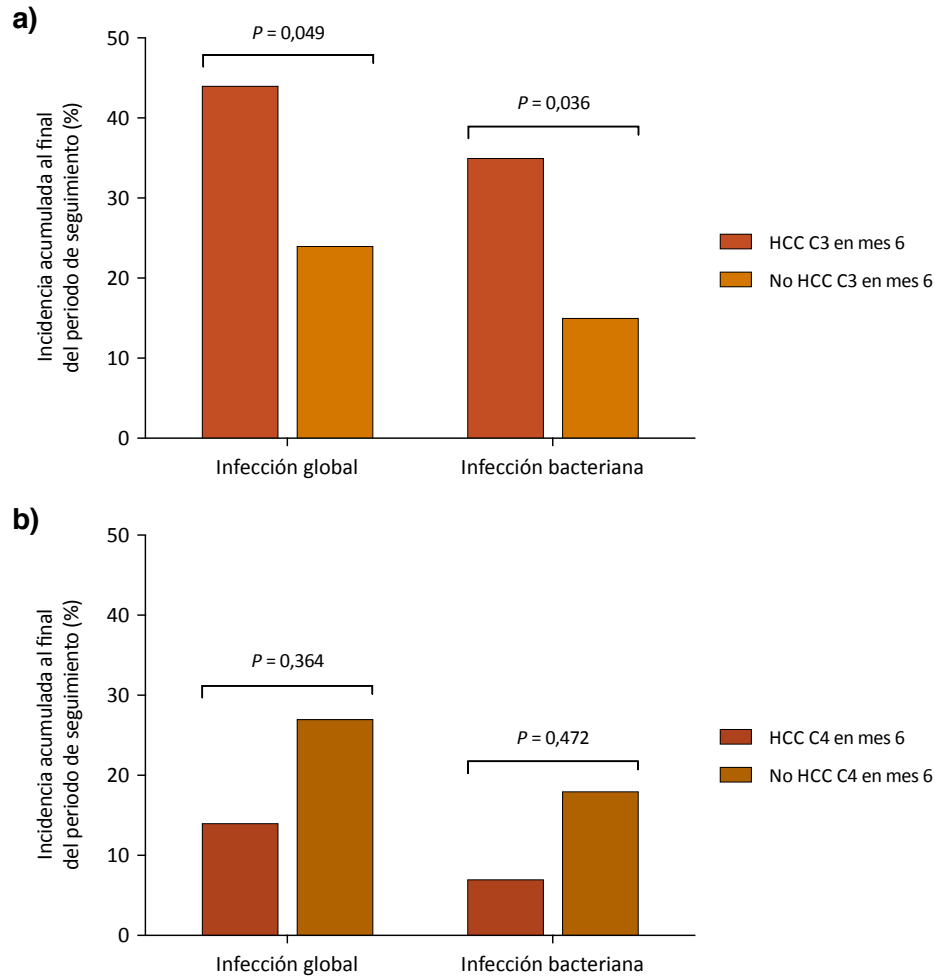


Tabla 25. Puntos de corte óptimos (estadístico J de Youden) de los parámetros inmunológicos en el mes 6 seleccionados para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación (n = 276 [pacientes vivos y con injerto funcional en el mes 6]).

Parámetro (en mes 6)	Punto de corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	HR (IC 95%) ^a	P
Linfocitos totales	1038 céls/mcL	51,4% (39,3 - 63,4)	64,9% (57,7 - 71,7)	35,6% (29,1 - 52,6)	77,9% (73,2 - 82,1)	1,76 (1,11 - 2,79)	0,017
Linfocitos NK	232 céls/mcL	92,9% (83,0 - 98,1)	27,0% (20,0 - 34,9)	32,9% (30,3 - 35,7)	90,9% (78,9 - 96,4)	4,43 (1,60 - 12,25)	0,004
Niveles de C3	103 mg/dL	58,9% (44,9 - 71,9)	62,2% (54,1 - 69,8)	35,9% (29,4 - 42,9)	80,8% (75,1 - 85,5)	2,04 (1,19 - 3,47)	0,009

HR: hazard IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^aAnálisis univariado no ajustado por otras covariables.

Tabla 26. Punto de corte óptimo (estadístico J de Youden) del parámetro inmunológico en el mes 6 seleccionado para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación (n = 276 [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 6]).

Parámetro (en mes 6)	Punto de corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	HR (IC 95%) ^a	P
Niveles de C3	103 mg/dL	64,9% (47,5 - 79,8)	61,1% (53,5 - 68,4)	26,1% (20,7 - 32,3)	89,2% (83,9 - 92,8)	2,68 (1,37 - 5,27)	0,004

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^aAnálisis univariado no ajustado por otras covariables.

De este modo, el recuento de linfocitos T CD4⁺ <30 céls/mcL (OR ajustado: 2,04; IC 95%: 0,91 - 4,59; P = 0,085), el de linfocitos B <110 céls/mcL (OR ajustado: 2,19; IC 95%: 1,22 - 3,92; P = 0,009), el nivel sérico de IgA <115 mg/dL (OR ajustado: 1,81; IC 95%: 0,95 - 3,44; P = 0,071), y el nivel sérico de C3 <76 mg/dl (OR ajustado: 2,86; IC 95%: 1,22 - 3,92; P = 0,017) en el mes 1 se mantuvieron en el modelo final tras un proceso de selección de variables por pasos hacia atrás (**Tabla 27**).

Tabla 27. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo inmunológicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Variables inmunológicas (medidas en el mes 1 post-trasplante)	OR ajustado	IC 95%	P	Coficiente β	Puntuación en el modelo
Linfocitos T CD4 ⁺ <30 céls/mcL	2,04	0,91 - 4,59	0,085	0,712	2
Linfocitos T CD8 ⁺ <85 céls/mcL	1,36	0,61 - 3,00	0,452	-	-
Linfocitos B <110 céls/mcL	2,19	1,22 - 3,92	0,009	0,782	2
Niveles séricos de IgG <690 mg/dL	1,51	0,84 - 2,71	0,171	-	-
Niveles séricos de IgA <115 mg/dL	1,81	0,95 - 3,44	0,071	0,592	2
Niveles séricos de C3 <76 mg/dL	2,86	1,22 - 3,92	0,017	1,052	3

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*.

Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,333.

Dicho modelo demostró una aceptable bondad de ajuste (P de Hosmer-Lemeshow = 0,333). A continuación asignamos una puntuación a cada una de estas variables mediante el redondeo de su OR al número entero más próximo: linfocitos T CD4⁺ <30 céls/mcL (2 puntos), linfocitos B <110 céls/mcL (2 puntos), IgA <115 mg/dL (2 puntos) y C3 <76 mg/dl (3 puntos). Así obtuvimos un modelo exclusivamente

inmunológico de predicción de infección global en el periodo intermedio, con un área bajo la curva ROC de 0,646 (IC 95%: 0,573 - 0,719; $P = 0,037$).

Como puede observarse, la capacidad de discriminación del modelo inmunológico resultó subóptima y sensiblemente menor a la obtenida en el modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,709; IC 95%: 0,641 - 0,777; $P < 0,0001$) (**Figura 15**). Por este motivo construimos un tercer modelo que combinara parámetros inmunológicos y clínicos. Realizamos un análisis multivariante de regresión logística que incorporó como variables independientes los parámetros inmunológicos en el mes 1 post-trasplante (linfocitos T CD4⁺ <30 céls/mcL, linfocitos B <110 céls/mcL, IgA <115 mg/dL y C3 <76 mg/dl) y las tres variables clínicas que ya habían sido incluidas en el modelo clínico (edad del receptor en el momento del trasplante, necesidad de reintervención quirúrgica durante el primer mes y FGe en el mes 1) (**Tabla 18**). A fin de obtener un modelo más fácilmente aplicable en la práctica clínica, dicotomizamos la edad del receptor según el punto de corte óptimo con arreglo al estadístico J de Youden (≥ 63 años) y estratificamos el FGe en intervalos de 10 mL/min. A partir de este modelo de regresión logística (**Tabla 28**), que presentó una adecuada bondad de ajuste (P de Hosmer-Lemeshow = 0,611), asignamos una serie de puntuaciones a cada variable: edad del receptor ≥ 63 años (4 puntos), reintervención en el primer mes (3 puntos), FGe en el mes 1 (-0,3 puntos por cada intervalo de 10 mL/min), linfocitos T CD4⁺ <30 céls/mcL (3 puntos), linfocitos B <110 céls/mcL (2 puntos), IgA <115 mg/dL (3 puntos) y C3 <76 mg/dL (2 puntos).

Tabla 28. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como no inmunológicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación ($n = 292$).

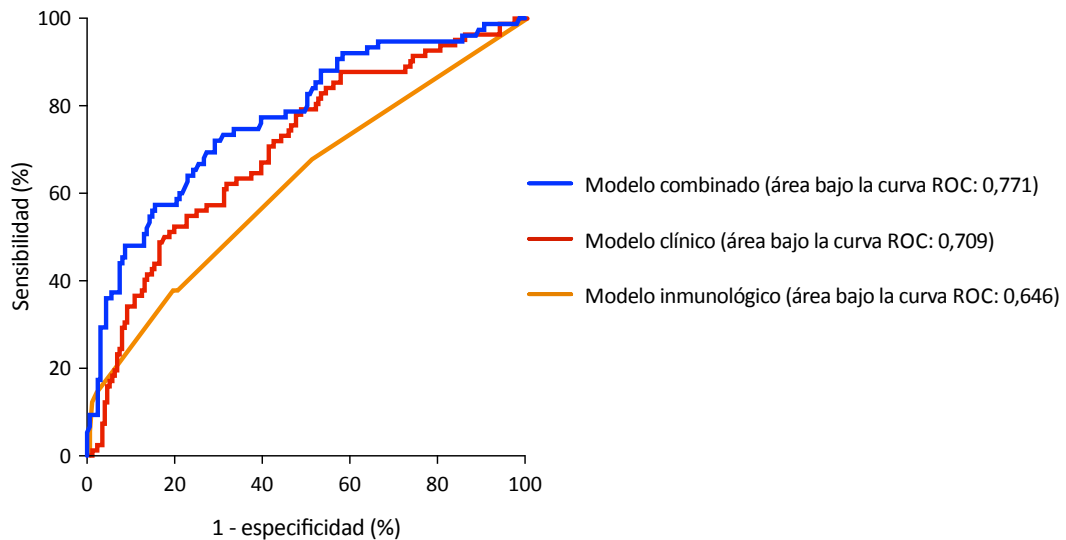
Variables predictivas	OR ajustado	IC 95%	P	Coficiente β	Puntuación en el modelo
Edad del receptor ≥ 63 años	4,09	2,07 - 8,08	<0,0001	1,410	4
Reintervención en el primer mes	2,51	0,97 - 6,50	0,059	0,919	3
FGe en el mes 1 [por 10 mL/min]	0,84	0,71 - 1,00	0,051	-0,173	-0,3
Linfocitos T CD4 ⁺ <30 céls/mcL	2,78	1,12 - 6,90	0,028	1,022	3
Linfocitos B <110 céls/mcL	1,75	0,93 - 3,30	0,082	0,562	2
Niveles séricos de IgA <115 mg/dL	2,56	1,23 - 5,33	0,012	0,941	3
Niveles séricos de C3 <76 mg/dL	2,34	0,91 - 6,00	0,078	0,849	2

FGe: filtrado glomerular estimado; IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*.

Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,611.

Este modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción de infección global en el periodo intermedio exhibió un área bajo la curva ROC de 0,771 (IC 95%: 0,705 - 0,837; $P = 0,034$), que fue sustancialmente superior a las de los modelos clínico e inmunológico (**Figura 27**).

Figura 27. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación ($n = 292$). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



7.8.2. Modelos de predicción de infección bacteriana en el periodo intermedio

De forma análoga al modelo de infección global, establecimos mediante un análisis multivariante de regresión logística el peso relativo de los parámetros inmunológicos en el mes 1 que habían sido previamente seleccionados como predictores del desarrollo de infección bacteriana durante el periodo intermedio en la cohorte de derivación (**Tabla 24**). El recuento de linfocitos B <85 céls/mcL (OR ajustado: 1,92; IC 95%: 0,96 - 3,84; $P = 0,066$), el de linfocitos NK <68 céls/mcL (OR ajustado: 2,14; IC 95%: 0,97 - 4,71; $P = 0,060$), el nivel sérico de IgG <500 mg/dL (OR ajustado: 3,19; IC 95%: 1,28 - 7,99; $P = 0,013$) y el de C3 <78 mg/dl (OR ajustado: 2,89; IC 95%: 1,22 - 6,85; $P = 0,016$) permanecieron tras un proceso de selección de variables por pasos hacia atrás (**Tabla 29**). El modelo presentó una excelente bondad de ajuste (P de Hosmer-Lemeshow = 0,643). Asignamos una puntuación a cada una de estas variables mediante el redondeo del correspondiente OR ajustado al número entero más próximo: linfocitos B <85 céls/mcL (2 puntos), linfocitos NK <68 céls/mcL (2 puntos), IgG <500 mg/dL (3 puntos) y C3 <78 mg/dl (3

puntos). Este modelo inmunológico de infección bacteriana en el periodo intermedio exhibió un área bajo la curva ROC de 0,674 (IC 95%: 0,590 - 0,759; $P = 0,043$).

Tabla 29. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo inmunológicos para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Variables inmunológicas (medidas en el mes 1 post-trasplante)	OR ajustado	IC 95%	P	Coefficiente β	Puntuación en el modelo
Linfocitos T CD8 ⁺ <155 céls/mcL	1,49	0,70 - 3,17	0,302	-	-
Linfocitos B <85 céls/mcL	1,92	0,96 - 3,84	0,066	0,651	2
Linfocitos NK <68 céls/mcL	2,14	0,97 - 4,71	0,060	0,760	2
Niveles séricos de IgG <500 mg/dL	3,19	1,28 - 7,99	0,013	1,162	3
Niveles séricos de IgA <147 mg/dL	0,96	0,46 - 1,99	0,909	-	-
Niveles séricos de C3 <78 mg/dL	2,89	1,22 - 6,85	0,016	1,061	3

IC: intervalo de confianza; NK: *natural killer* (asesino natural); OR: *odds ratio* (razón de ventajas).

Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,643.

Una vez más la capacidad predictiva del modelo exclusivamente inmunológico fue subóptima y menor a la obtenida en el modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,702; IC 95%: 0,616 - 0,787; $P < 0,0001$) (**Figura 16**). Construimos el modelo combinado mediante la incorporación de los parámetros inmunológicos en el mes 1 post-trasplante (linfocitos b <85 céls/mcL, linfocitos NK <68 céls/mcL, IgG <500 mg/dL y C3 <78 mg/dl) y las cuatro variables clínicas que habían sido incluidas en el modelo clínico (edad del receptor en el momento del trasplante, retraso en la función del injerto, desarrollo previo de infección bacteriana en el primer mes y concentración sérica de albúmina en el mes 1) (**Tabla 21**). La edad del receptor fue igualmente dicotomizada según el punto de corte óptimo (≥ 65 años). A partir de este modelo de regresión logística (**Tabla 30**), que presentó una adecuada bondad de ajuste (P de Hosmer-Lemeshow = 0,514), asignamos las siguientes puntuaciones a cada variable: edad del receptor ≥ 65 años (3 puntos), retraso en la función del injerto (2 puntos), desarrollo de infección bacteriana durante el primer mes (4 puntos), recuento de linfocitos NK <68 céls/mcL (2 puntos) y niveles de IgG <500 mg/dL (3 puntos).

El resultante modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio presentó, en la cohorte de derivación, un área bajo la curva ROC de 0,765 (IC 95%: 0,686 - 0,844; $P = 0,040$) (**Figura 28**).

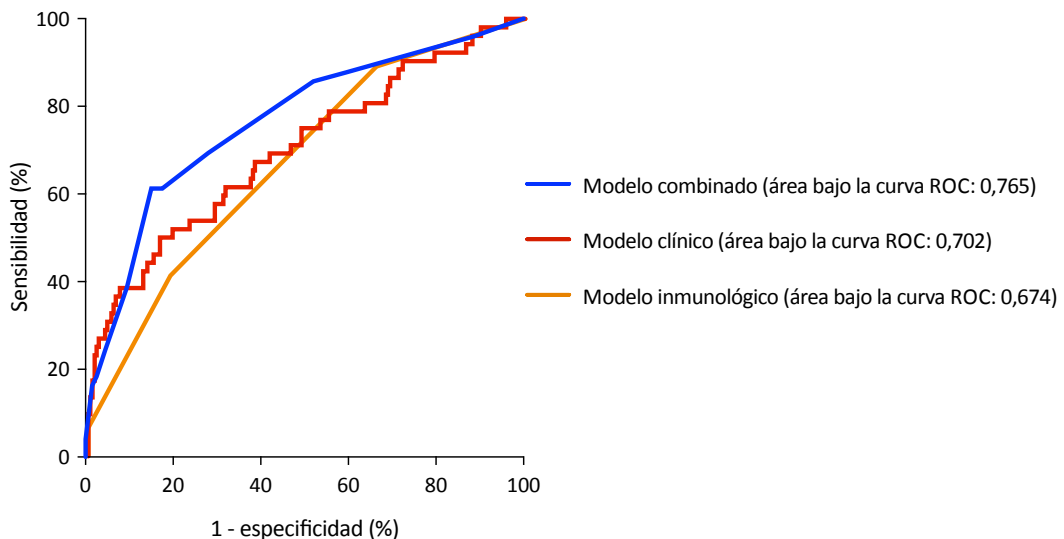
Tabla 30. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como clínicos para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

VARIABLES PREDICTIVAS	OR AJUSTADO	IC 95%	P	COEFICIENTE β	PUNTUACIÓN EN EL MODELO
Edad del receptor ≥ 65 años	3,09	1,42 - 6,75	0,005	1,129	3
Retraso en la función del injerto	2,08	0,91 - 4,74	0,082	0,731	2
Infección bacteriana en el primer mes	3,68	1,55 - 8,75	0,003	1,303	4
Albúmina sérica en el mes 1	0,71	0,32 - 1,59	0,411	-	-
Linfocitos B < 85 céls/mcL	1,76	0,81 - 3,84	0,152	-	-
Linfocitos NK < 68 céls/mcL	2,32	0,97 - 5,56	0,060	0,840	2
Niveles séricos de IgG < 500 mg/dL	2,54	0,91 - 7,08	0,075	0,932	3
Niveles séricos de C3 < 78 mg/dL	1,79	0,67 - 4,83	0,245	-	-

IC: intervalo de confianza; NK: *natural killer* (asesino natural); OR: *odds ratio* (razón de ventajas).

Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,514.

Figura 28. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



7.8.3. Modelos de predicción de infección global en el periodo tardío

Una vez más realizamos un análisis multivariante de regresión logística en la cohorte de derivación para predecir el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío a partir de los parámetros inmunológicos previamente establecidos (**Tabla 25**). Las siguientes variables determinadas en el mes 6

fueron seleccionadas en el modelo: linfocitos NK <232 céls/mcL (OR ajustado: 7,07; IC 95%: 2,04 - 24,47; $P = 0,009$) y niveles séricos de C3 <103 mg/dL (OR ajustado: 2,91; IC 95%: 1,48 - 5,73; $P = 0,017$). La bondad de ajuste fue excelente (P de Hosmer-Lemeshow = 0,965). La puntuación de cada una de estas variables en base a su OR ajustado fue: linfocitos NK <232 céls/mcL (7 puntos) y nivel de C3 <103 mg/dl (3 puntos) (**Tabla 31**). Este modelo inmunológico de predicción de infección global en el periodo tardío exhibió un área bajo la curva ROC de 0,700 (IC 95%: 0,620 - 0,780; $P = 0,041$), superior a la del modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,609; IC 95%: 0,531 - 0,688; $P = 0,005$) (**Figura 15**).

Tabla 31. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo inmunológicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación ($n = 276$ [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 6]).

Variables inmunológicas (medidas en el mes 6 post-trasplante)	OR ajustado	IC 95%	P	Coefficiente β	Puntuación en el modelo
Linfocitos totales <1038 céls/mcL	2,04	0,91 - 4,59	0,085	-	-
Linfocitos NK <232 céls/mcL	7,07	2,04 - 24,47	0,009	1,956	7
Niveles séricos de C3 <103 mg/dL	2,91	1,48 - 5,73	0,017	1,068	3

IC: intervalo de confianza; NK: *natural killer* (asesino natural); OR: *odds ratio* (razón de ventajas).

Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,965.

Realizamos a continuación un modelo combinado mediante la incorporación de las variables clínicas que habían sido identificadas como predictoras de infección global tardía (**Tabla 19**).

Tabla 32. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como clínicos para el desarrollo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación ($n = 276$ [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 6]).

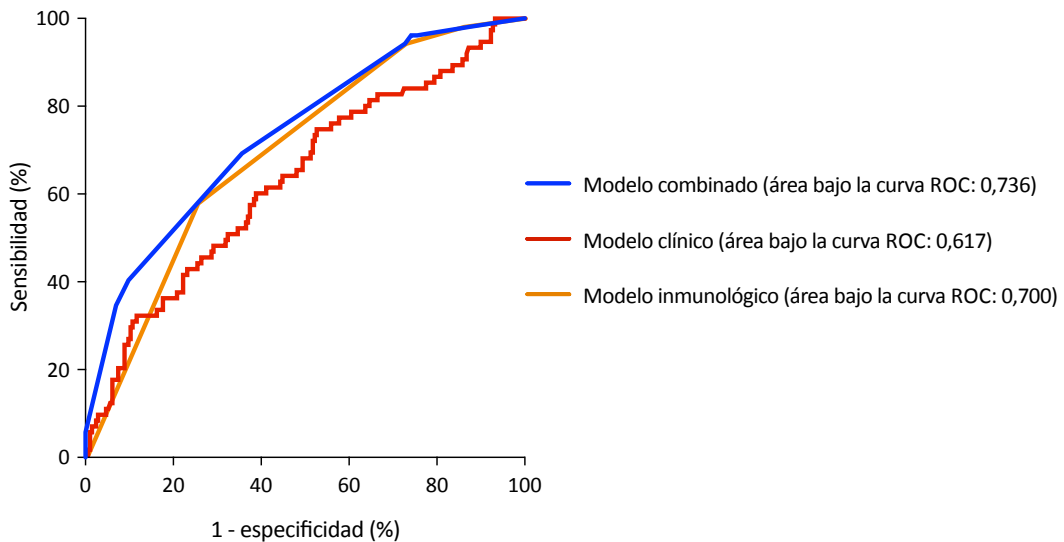
Variables predictivas	OR ajustado	IC 95%	P	Coefficiente β	Puntuación en el modelo
Enfermedad aterotrombótica (diagnóstico pre-trasplante)	3,00	1,07 - 8,42	0,037	1,099	3
Tiempo en diálisis [por mes]	1,00	0,99 - 1,01	0,972	-	-
Rechazo agudo del injerto en los 6 primeros meses	2,14	0,95 - 4,82	0,067	0,759	2
Linfocitos totales <1038 céls/mcL	1,29	0,61 - 2,73	0,498	-	-
Linfocitos NK <232 céls/mcL	5,81	1,63 - 20,69	0,016	0,873	6
Niveles séricos de C3 <103 mg/dL	2,39	1,18 - 4,86	0,016	0,873	2

IC: intervalo de confianza; NK: *natural killer* (asesino natural); OR: *odds ratio* (razón de ventajas).

Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,785.

El nuevo modelo de regresión logística (**Tabla 32**), que presentó igualmente una excelente bondad de ajuste (P de Hosmer-Lemeshow = 0,785), permitió asignar las siguientes puntuaciones: diagnóstico pre-trasplante de enfermedad aterotrombótica (definida por la presencia de cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y/o accidente cerebrovascular) (3 puntos), rechazo agudo del injerto en los 6 primeros meses (2 puntos), recuento de linfocitos NK <232 céls/mcL (6 puntos) y niveles séricos de C3 <103 mg/dL (2 puntos). El modelo caminado así obtenido exhibió un área bajo la curva ROC de 0,736 (IC 95%: 0,657 - 0,815; $P = 0,040$) (**Figura 29**).

Figura 29. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación ($n = 276$ [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 6]). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



7.8.4. Modelos de predicción de infección bacteriana en el periodo tardío

Finalmente realizamos un análisis multivariante para establecer el peso relativo de los parámetros clínicos e inmunológicos que se habían revelado predictores del desarrollo de infección bacteriana durante el periodo tardío (**Tablas 22 y 26**). Además, debido a su relevancia clínica y a la significación demostrada en el análisis univariante, forzamos la inclusión en el modelo del rechazo agudo del injerto en los 6 primeros meses (**Tabla 33**). No se pudo elaborar un modelo exclusivamente inmunológico debido a que sólo identificamos un parámetro (los niveles séricos de C3) que estuviera asociada al evento de interés. En este caso las variables seleccionadas fueron: estado serológico pre-trasplante VHC positivo (OR ajustado: 2,96; IC 95%: 0,96 - 9,15; $P = 0,059$), rechazo agudo en los 6 primeros meses (OR

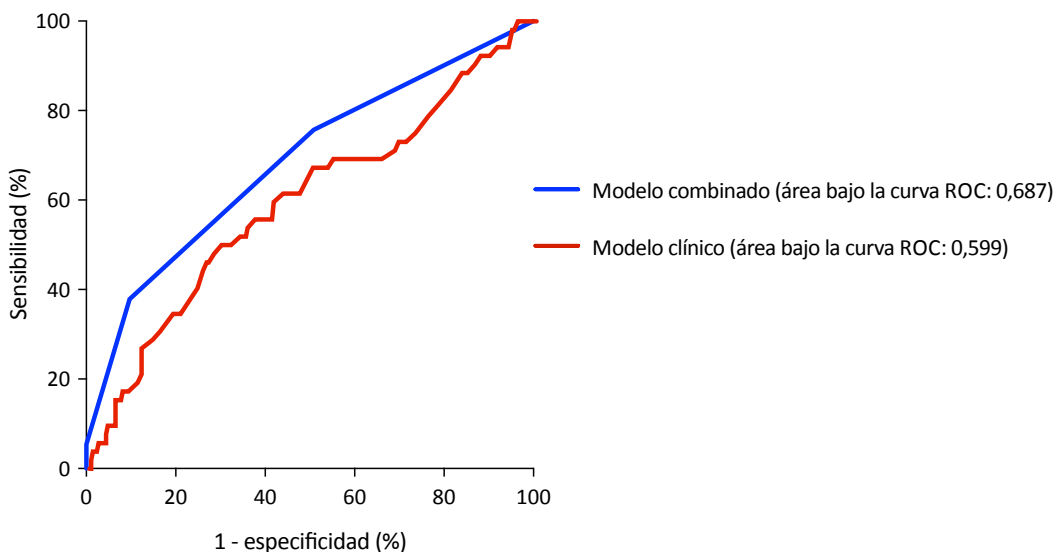
ajustado: 3,04; IC 95%: 1,24 - 7,34; $P = 0,015$) y niveles de C3 <103 mg/dL en el mes 6 (OR ajustado: 2,77; IC 95%: 1,21 - 6,34; $P = 0,016$). El modelo exhibió una adecuada bondad de ajuste (P de Hosmer-Lemeshow = 0,887). Conforme a sus correspondientes OR ajustados asignamos 3 puntos a cada variable. El área bajo la curva ROC de este modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción de infección bacteriana tardía fue de 0,687 (IC 95%: 0,585 - 0,787; $P = 0,051$), superior a la obtenida en el modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,599; IC 95%: 0,509 - 0,689; $P = 0,024$) (Figura 30).

Tabla 33. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo tanto inmunológicos como clínicos para el desarrollo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación ($n = 276$ [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]).

VARIABLES PREDICTIVAS	OR AJUSTADO	IC 95%	P	COEFICIENTE β	PUNTAJACIÓN EN EL MODELO
Estado serológico VHC (IgG) positivo	2,96	0,96 - 9,15	0,059	1,086	3
Rechazo agudo del injerto en los 6 primeros meses	3,04	1,24 - 7,43	0,015	1,111	3
FGe en el mes 6 [por 10 mL/min]	0,94	0,74 - 1,19	0,614	-	-
Albúmina sérica en el mes 6	0,68	0,24 - 1,94	0,474	-	-
Niveles séricos de C3 <103 mg/dL	2,77	1,21 - 6,34	0,016	1,019	3

FGe: filtrado glomerular estimado; IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio* VHC: virus de la hepatitis C.
Bondad de ajuste del modelo: P de Hosmer-Lemeshow = 0,887.

Figura 30. Áreas bajo las curvas ROC de los modelos de predicción (clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección bacteriana en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación ($n = 276$ [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



7.9. Rendimiento de los modelos combinados de predicción en la cohorte de derivación

En primer lugar analizamos el rendimiento de los modelos definitivos (es decir, los que combinan parámetros clínicos e inmunológicos) en la predicción del desarrollo de infección en la cohorte de derivación a lo largo de los distintos periodos post-trasplante.

7.9.1. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección global en el periodo intermedio

La **Tabla 34** detalla la exactitud diagnóstica (sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y precisión) del modelo de predicción de infección global en el periodo post-trasplante intermedio, estratificado con arreglo a los valores correspondientes a los distintos cuartiles (Q) y al punto de corte óptimo según el estadístico J de Youden (>4 puntos). Empleando como punto de corte el percentil (P) 25 (es decir, tomando el primer cuartil [Q1] de la cohorte) se obtuvieron excelentes valores de sensibilidad (89,3%; IC 95%: 81,1 - 94,7) y VPN (86,1%; IC 95%: 76,9 - 92,0). El punto de corte óptimo demostró unos valores de sensibilidad (54,8%, IC 95%: 44,2 - 65,2) y especificidad (83,2%; IC 95%: 77,2 - 88,1) notables, traducidos en un VPP del 60,7% (IC 95: 51,8 - 68,9) y un VPN del 79,5% (IC 95%: 75,5 - 83,0). La comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada demostró diferencias significativas tanto en la estratificación por el punto de corte óptimo (20,2% [≤ 4 puntos] versus 61,3% [> 4 puntos]; $P < 0,00001$) como por cuartiles (13,3% [Q1] versus 22,1% [Q2] versus 32,9% [Q3] versus 60,2% [Q4]; $P < 0,00001$). También obtuvimos diferencias significativas en las tasas de incidencia acumulada en el mes 6 entre cuartiles (**Figura 31**).

Tabla 34. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

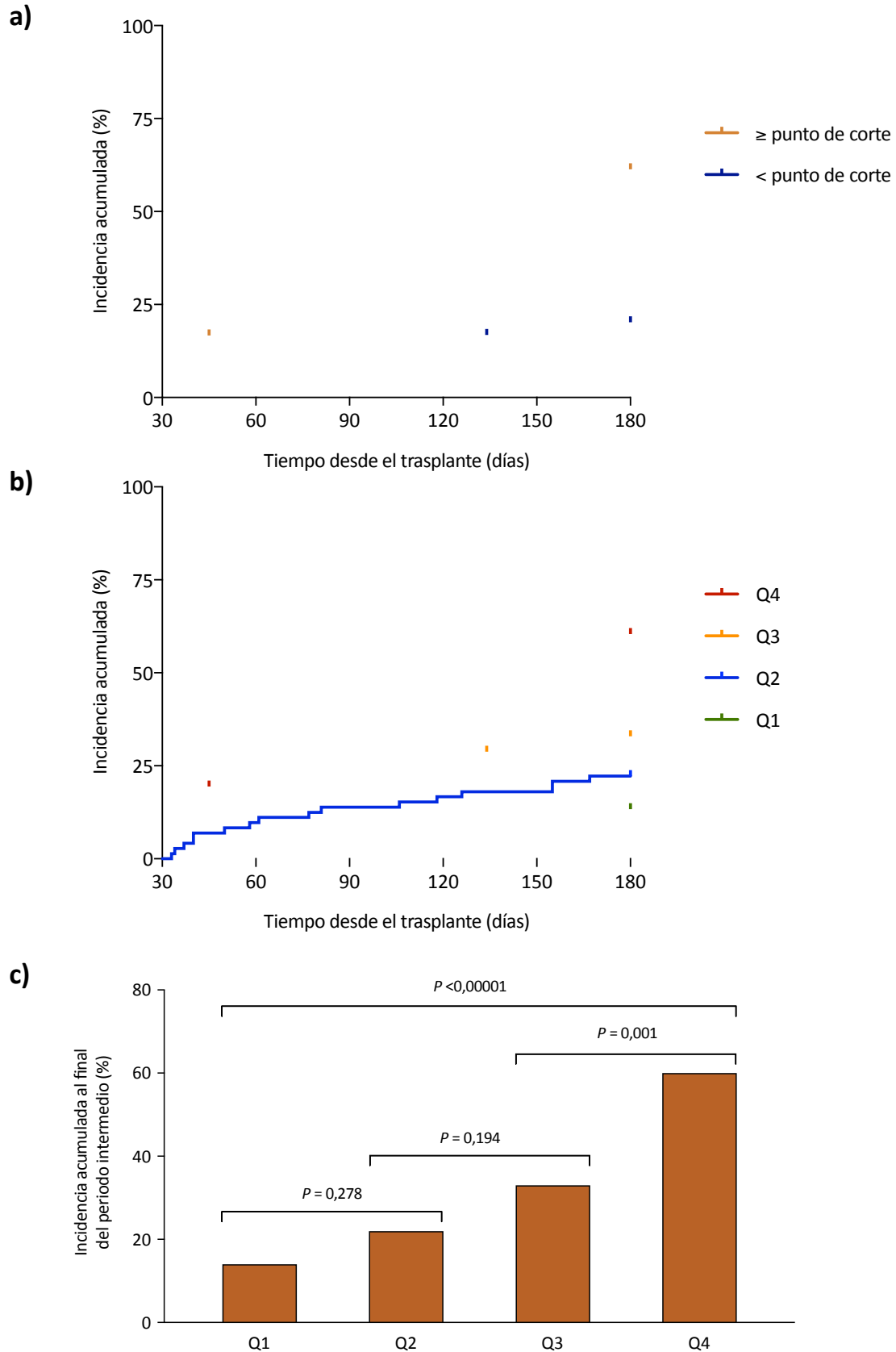
Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P25	89,3% (81,1 - 94,7)	31,6% (25,2 - 38,6)	38,3% (35,5 - 41,1)	86,1% (76,9 - 92,0)	50,2% (44,3 - 56,1)
P50	72,0% (61,2 - 80,9)	60,4% (53,2 - 67,3)	46,2% (40,9 - 51,6)	82,1% (76,4 - 86,6)	64,1% (58,3 - 69,7)
P75	46,2% (35,8 - 56,7)	85,2% (79,5 - 89,9)	59,7% (49,8 - 68,9)	76,9% (73,3 - 80,3)	72,7% (73,3 - 80,3)
Óptimo ^a	54,8% (44,2 - 65,2)	83,2% (77,2 - 88,1)	60,7% (51,8 - 68,9)	79,5% (75,5 - 83,0)	74,0% (68,6 - 79,0)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden (>4 puntos).

Aunque no había sido diseñado específicamente con tal finalidad, analizamos el rendimiento del modelo combinado de predicción de infección global obtenido tomando como evento de interés el desarrollo de

Figura 31. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.



enfermedad por CMV a lo largo del periodo intermedio. La comparación de las curvas Kaplan-Meier demostró igualmente diferencias significativas al estatificar el modelo por el punto de corte óptimo (10,8% [≤ 4 puntos] versus 33,9% [> 4 puntos]; $P < 0,0001$) o por cuartiles (7,0% [Q1] versus 12,7% [Q2] versus 17,8% [Q3] versus 32,4% [Q4]; $P < 0,0001$) (**Figura 32**).

7.9.2. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección bacteriana en el periodo intermedio

La exactitud diagnóstica del modelo de predicción de infección bacteriana durante el periodo post-trasplante intermedio es mostrada en la **Tabla 35**. Empleando como punto de corte el P25 (es decir, tomando el Q1) se obtuvieron valores de sensibilidad (92,9%; IC 95%: 83,0 - 98,1) y VPN (88,6%; IC 95%: 74,0 - 95,5) aún superiores a los reportados anteriormente para el modelo de predicción de infección global. El punto de corte óptimo ($> 6,5$ puntos) ofreció valores de sensibilidad y especificidad del 54,4% (IC 95%: 40,7 - 67,6) y el 85,4% (IC 95%: 80,2 - 89,7), respectivamente, con una precisión (i.e., probabilidad global de que un paciente sea adecuadamente clasificado) del 79,3% (IC 95%: 74,2 - 83,8).

Tabla 35. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de derivación (n = 292).

Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P25	92,9% (83,0 - 98,1)	13,3% (9,2 - 18,4)	20,8% (19,4 - 22,3)	88,6% (74,0 - 95,5)	28,9% (23,8 - 34,6)
P50	77,2% (64,2 - 87,3)	52,8% (46,2 - 59,3)	28,6% (24,8 - 32,7)	90,4% (85,3 - 93,9)	57,6% (51,7 - 63,3)
P75	54,4% (40,7 - 67,6)	83,3% (77,8 - 87,8)	44,3% (35,4 - 53,6)	88,2% (84,8 - 90,9)	77,6% (72,3 - 82,3)
Óptimo ^a	54,4% (40,7 - 67,6)	85,4% (80,2 - 89,7)	47,7% (38,1 - 57,4)	88,4% (85,2 - 91,1)	79,3% (74,2 - 83,8)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden ($> 6,5$ puntos).

La comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada hasta el día 180 post-trasplante demostró, una vez más, diferencias significativas tanto al estatificar el modelo de predicción según el punto de corte óptimo (11,0% [$\leq 6,5$ puntos] versus 48,3% [$> 6,5$ puntos]; $P < 0,0001$) como por cuartiles (5,6% [Q1] versus 12,3% [Q2] versus 15,6% [Q3] versus 44,8% [Q4]; $P < 0,0001$) (**Figura 33**). La comparación entre los distintos cuartiles del modelo de las tasas de incidencia acumulada para ciertos tipos específicos de infección bacteriana (pielonefritis aguda, bacteriemia de cualquier origen, infección del lecho quirúrgico, neumonía e infección por *C. difficile*) en el mes 6 reveló de forma global diferencias

Figura 32. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de enfermedad por CMV a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.

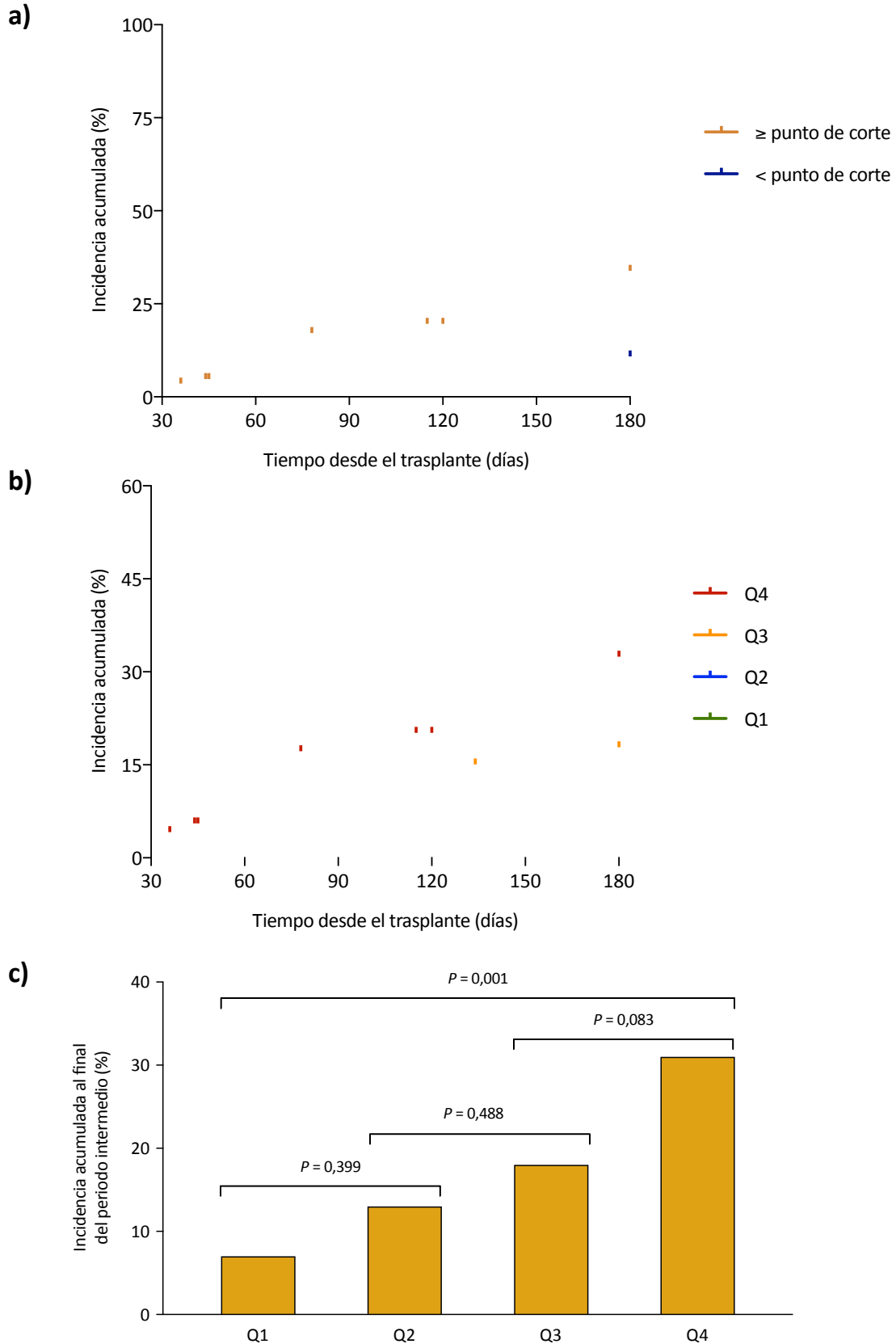
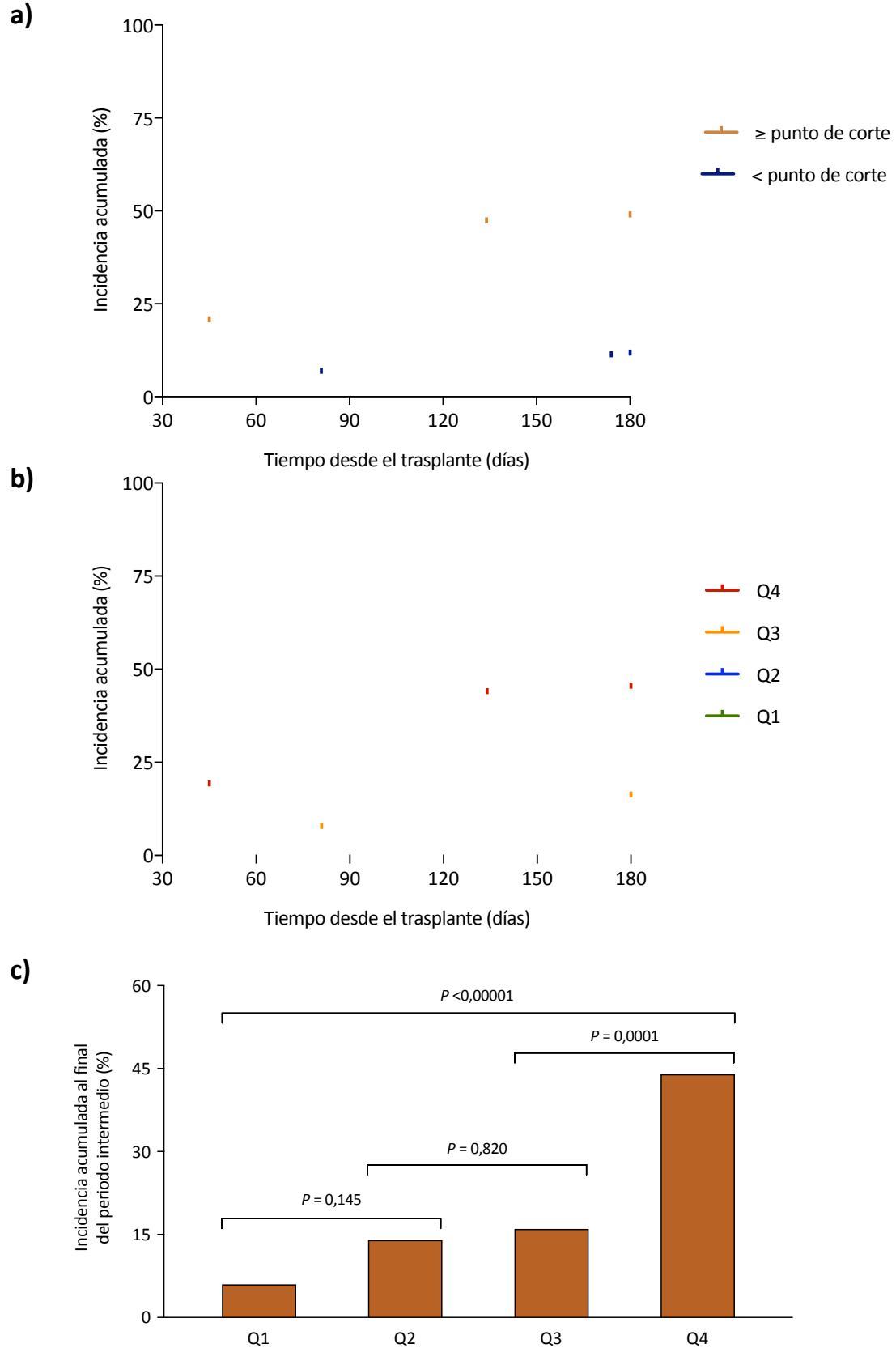
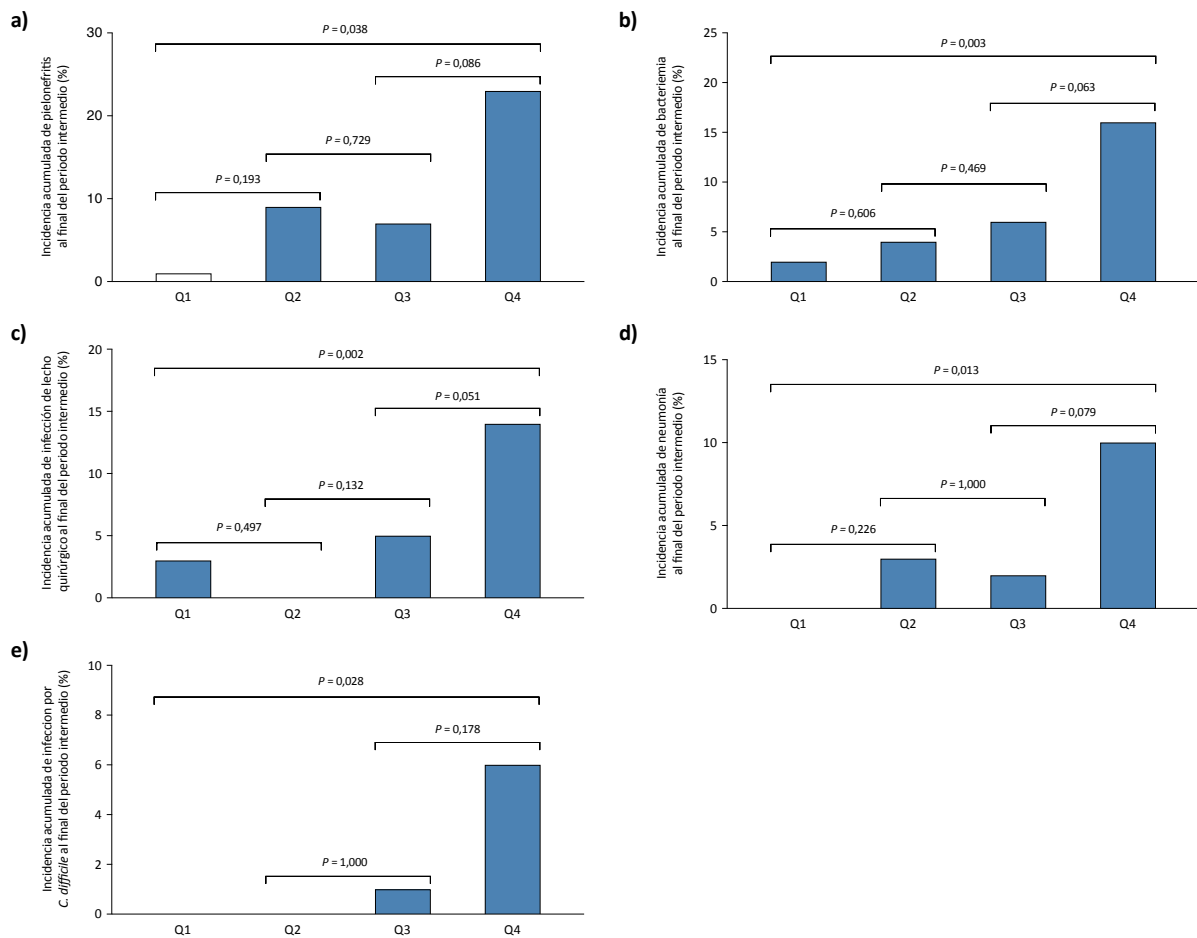


Figura 33. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.



estadísticamente significativas. Con la excepción de la infección por *C. difficile*, también hubo diferencias próximas a la significación en las incidencias acumuladas correspondientes a los Q3 y Q4, pero no así en otros cuartiles más bajos (**Figura 34**).

Figura 34. Tasas de incidencia acumulada para ciertos síndromes específicos según cuartiles del modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación: **(a)** pielonefritis aguda, **(b)** bacteriemia de cualquier foco, **(c)** infección de lecho quirúrgico, **(d)** neumonía y **(e)** infección por *Clostridium difficile*. Q: cuartil.



7.9.3. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección global en el periodo tardío

La **Tabla 36** expone, a su vez, los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y precisión correspondientes al modelo combinado de predicción de infección global durante el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6). La estratificación de la cohorte basada en el P25 (delimitando así el Q1) ofreció elevados valores de sensibilidad (94,2%; IC 95%: 84,1 - 98,8) y VPN (92,9%; IC 95%: 80,8 - 97,6). El punto de corte óptimo con arreglo al estadístico J de Youden (>7 puntos) arrojó, en este caso, unos valores de sensibilidad del 69,2% (IC 95%: 54,9 - 81,3), especificidad del 64,3% (IC 95%: 55,9 - 72,2)

y precisión del 65,6% (IC 95%: 58,5 - 72,3). La comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia de infección global tardía demostró diferencias significativas en la estratificación según el punto de corte óptimo (21,6% [≤ 7 puntos] versus 64,3% [> 7 puntos]; $P < 0,0001$) y según cuartiles (10,3% [Q1] versus 29,3% [Q2] versus 55,4% [Q3] versus 79,7% [Q4]; $P < 0,00001$) (Figura 35).

Tabla 36. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación (n = 276 [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]).

Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P25	94,2% (84,1 - 98,8)	27,3% (20,2 - 35,4)	32,0% (29,5 - 34,7)	92,9% (80,8 - 97,6)	45,1% (38,0 - 52,4)
P50	69,2% (54,9 - 81,3)	64,3% (55,9 - 72,2)	41,4% (34,7 - 48,4)	85,2% (78,9 - 89,8)	65,6% (58,5 - 72,3)
P75	40,4% (27,0 - 54,9)	90,2% (84,1 - 94,5)	60,0% (45,2 - 73,2)	80,6% (76,8 - 83,9)	76,9% (70,4 - 82,6)
Óptimo ^a	69,2% (54,9 - 81,3)	64,3% (55,9 - 72,2)	41,4% (34,7 - 48,4)	85,2% (78,9 - 89,8)	65,6% (58,5 - 72,3)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden (> 7 puntos).

7.9.4. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección bacteriana en el periodo tardío

Finalmente, procedimos a calcular la exactitud diagnóstica (sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y precisión) del modelo de predicción de infección bacteriana en el periodo tardío (Tabla 37). Debido a que el modelo presenta un limitado rango de valores posibles, se optó por estratificar por terciles (T) en lugar de cuartiles. Empleando como punto de corte el P33 (es decir, tomando el T1) se obtuvieron unos valores de sensibilidad (75,7%; IC 95%: 58,8 - 88,2) y VPN (90,5%; IC 95%: 84,2 - 94,5) elevados. El punto de corte óptimo ($> 4,5$ puntos) se acompañó de unos valores de sensibilidad del 37,8% (IC 95%: 22,5 - 55,2), especificidad del 90,3% (IC 95%: 84,9 - 94,2) y precisión del 81,1% (IC 95%: 75,2 - 86,2).

Tabla 37. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de derivación (n = 276 [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]).

Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P33	75,7% (58,8 - 88,2)	49,1% (41,5 - 56,8)	23,9% (19,9 - 28,4)	90,5% (84,2 - 94,5)	53,8% (46,8 - 60,3)
P66	37,8% (22,5 - 55,2)	90,3% (84,9 - 94,2)	45,2% (30,9 - 60,3)	87,3% (84,2 - 89,9)	81,1% (75,2 - 86,2)
Óptimo ^a	37,8% (22,5 - 55,2)	90,3% (84,9 - 94,2)	45,2% (30,9 - 60,3)	87,3% (84,2 - 89,9)	81,1% (75,2 - 86,2)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden ($> 4,5$ puntos).

Figura 35. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.

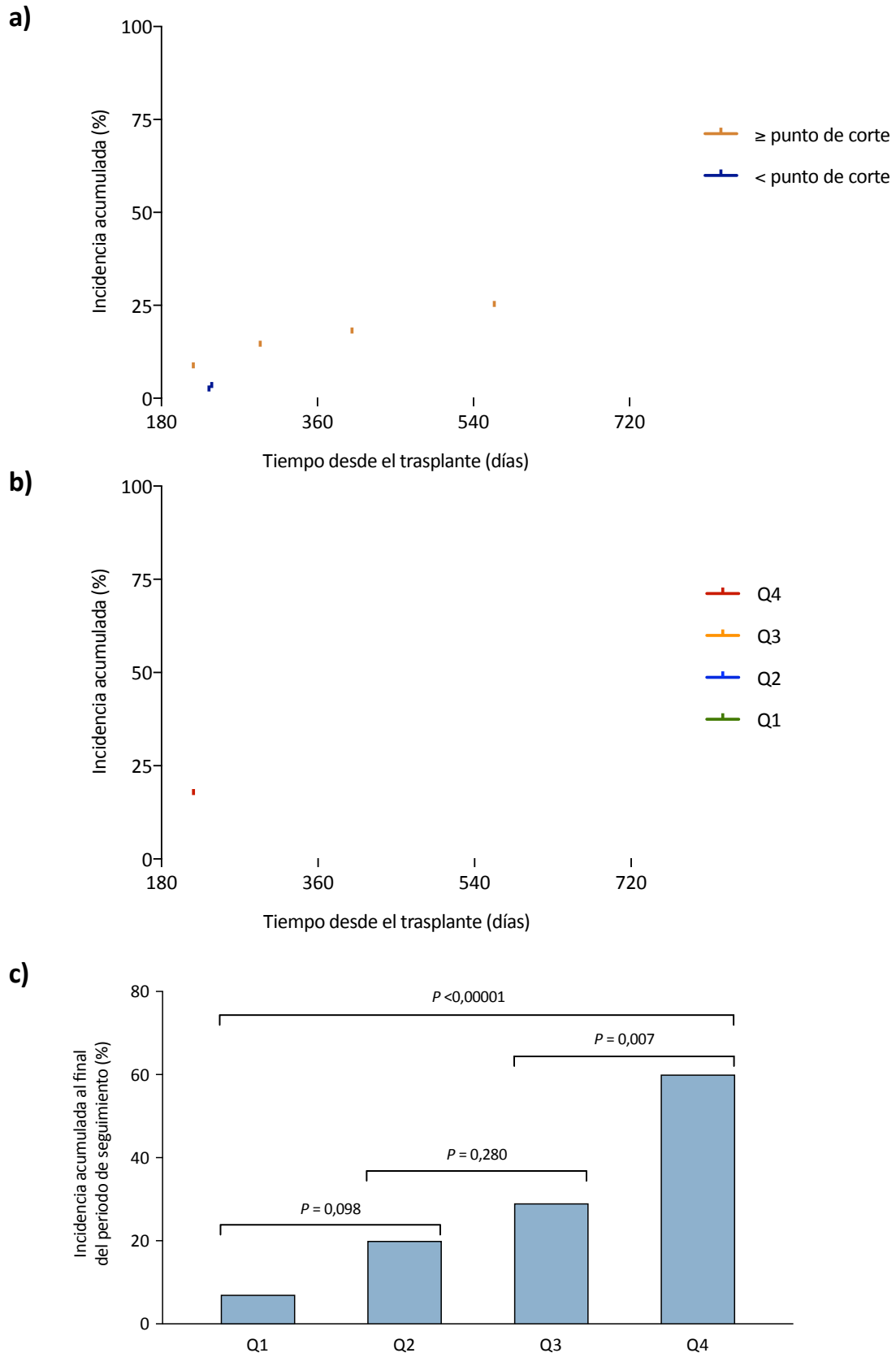
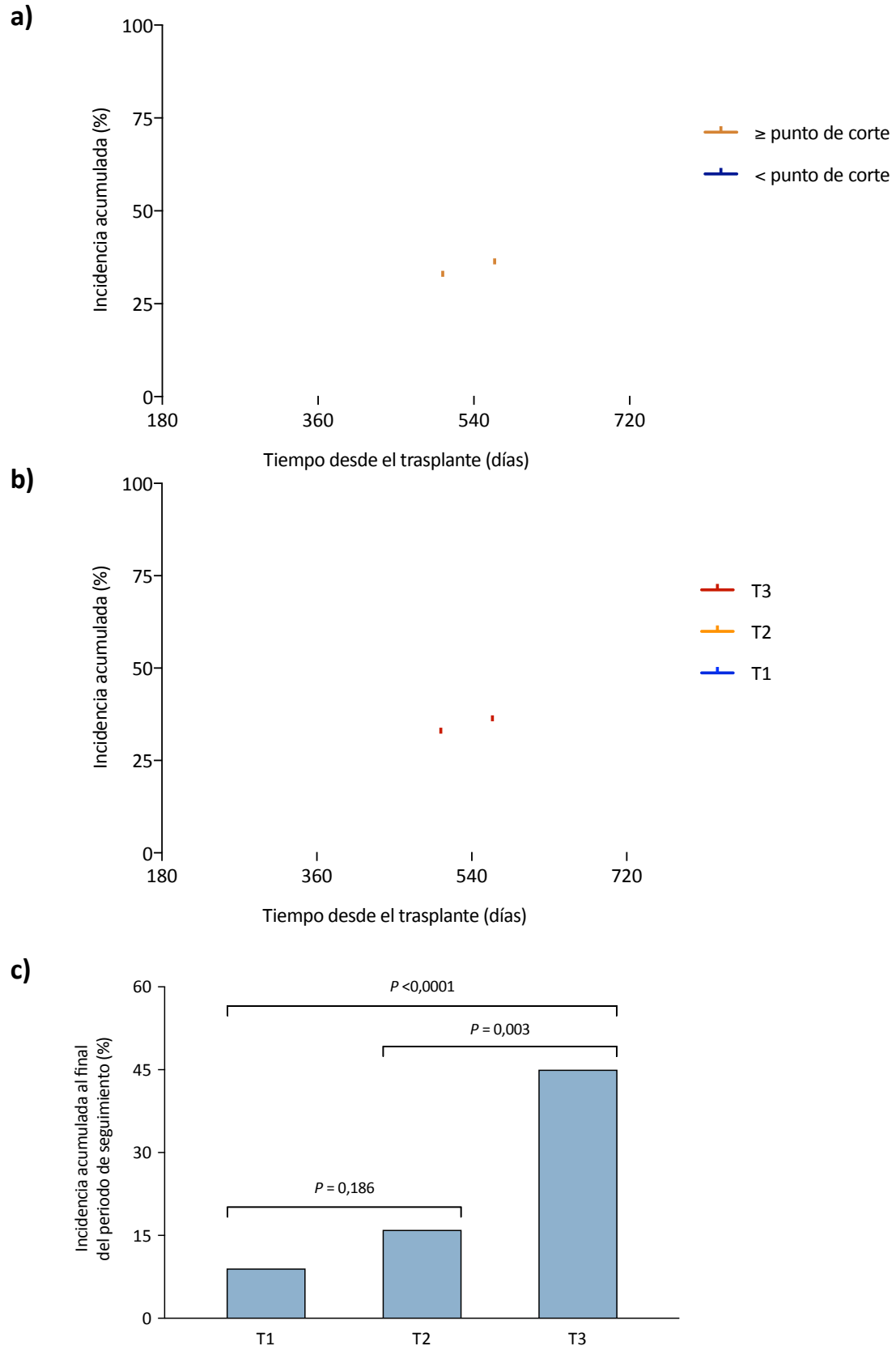


Figura 36. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o terciles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por terciles **(c)**. T: tercil.



La comparación de las curvas Kaplan-Meier también demostró diferencias significativas en la estratificación de la cohorte según el punto óptimo (14,7% [$\leq 4,5$ puntos] versus 54,6% [$> 4,5$ puntos]; $P < 0,00001$) y según los diferentes terciles del modelo (10,8% [T1] versus 19,9% [T2] versus 54,6% [T3]; $P < 0,00001$) (**Figura 36**).

7.9.5. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad en subgrupos

Como análisis complementario a los anteriores llevamos a cabo la estimación del HR correspondiente a cada incremento en un cuartil en el modelo combinado de predicción (o tercil en el caso de la infección bacteriana tardía), tanto de forma cruda (no ajustada) como ajustada en un modelo de regresión de Cox por covariables clínicamente relevantes (número de comorbilidades previas pre-trasplante, tiempo de isquemia fría o desarrollo de rechazo agudo del injerto [tratada como covariable tiempo-dependiente]). Además se realizaron una serie de análisis de sensibilidad restringidos a subgrupos específicos de pacientes: con o sin diagnóstico pre-trasplante de diabetes mellitus, en función del tipo de donante, y según el uso de ATG en el tratamiento de inducción o de profilaxis antiviral frente a CMV. En el análisis de los modelos de predicción de infección (tanto global como bacteriana) durante el periodo post-trasplante intermedio se obtuvieron valores de HR que oscilaron entre 1,718 y 4,954, alcanzando en todos los casos la significación estadística (**Figura 37**). En relación a los modelos combinados de predicción durante el periodo tardío, observamos igualmente la significación estadística en todos los HR excepto en el de infección bacteriana en pacientes que recibieron un órgano procedente de un donante en asistolia (HR [por incremento de un tercil]: 1,800; IC 95%: 0,774 - 4,189; $P = 0,172$) (**Figura 38**).

7.10. Rendimiento de los modelos combinados de predicción en la cohorte de validación

Por último fue evaluado en la cohorte de validación el rendimiento de los modelos combinados (clínicos e inmunológicos) a lo largo de los distintos periodos post-trasplante.

Durante el periodo intermedio la capacidad de discriminación del modelo combinado de infección global (área bajo la curva ROC: 0,753; IC 95%: 0,650 - 0,821; $P < 0,001$) fue ligeramente menor al obtenido en el modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,764; IC 95%: 0,685 - 0,853; $P < 0,001$). En el caso de la infección bacteriana observamos una relación análoga entre el modelo combinado (área bajo la curva ROC: 0,716; IC 95%: 0,600 - 0,797; $P < 0,001$) y el basado en variables exclusivamente clínicas (área bajo la curva ROC: 0,722; IC 95%: 0,615 - 0,820; $P < 0,001$) (**Figura 39**).

Figura 37. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: *hazard ratios* (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global **(a)** y bacteriana **(b)** a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de derivación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes. ATG: *antithymocyte globulin* (globulina antitimocítica policlonal); CMV: citomegalovirus; HR: *hazard ratio*.

^a Includida como variable tiempo-dependiente.

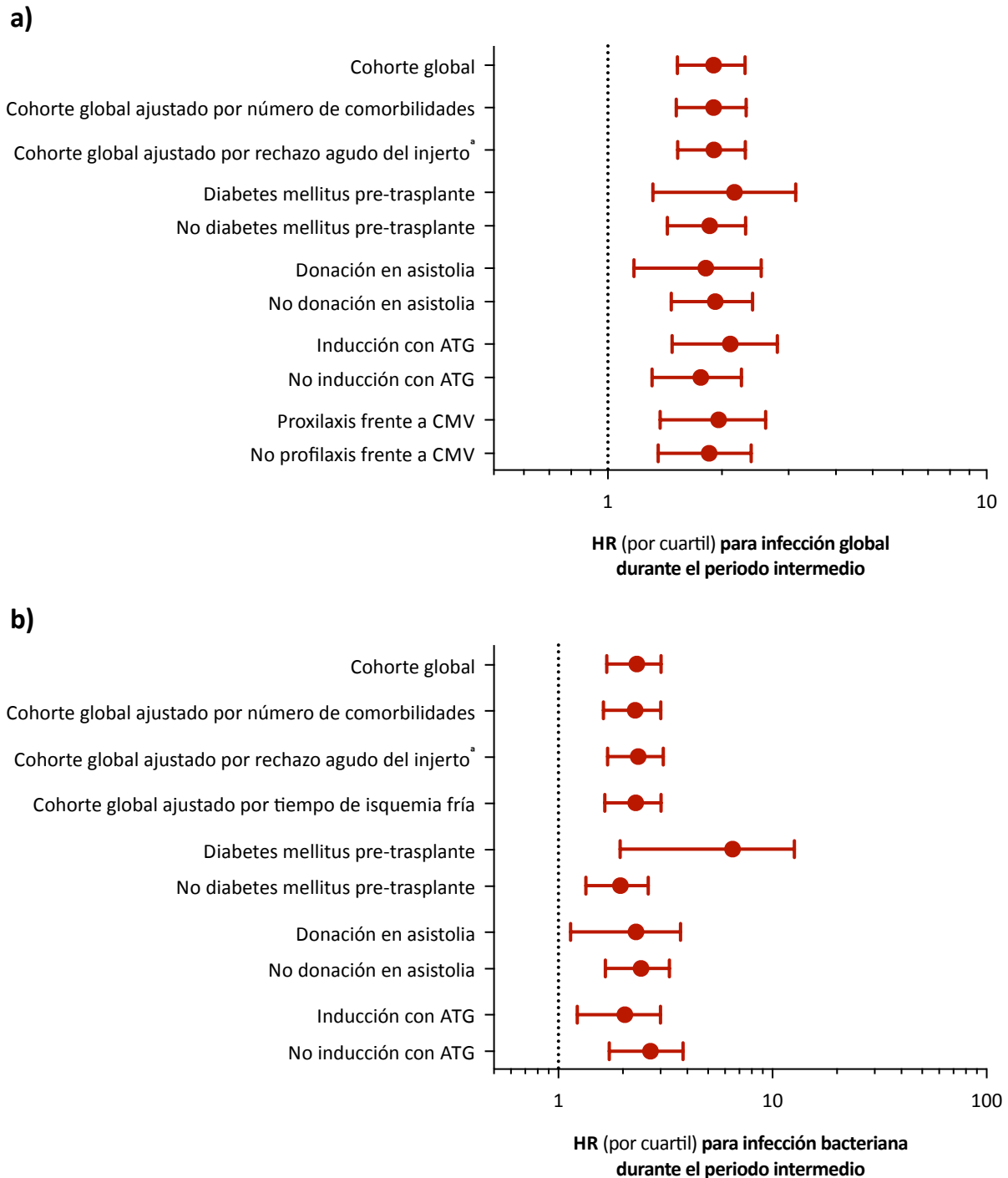
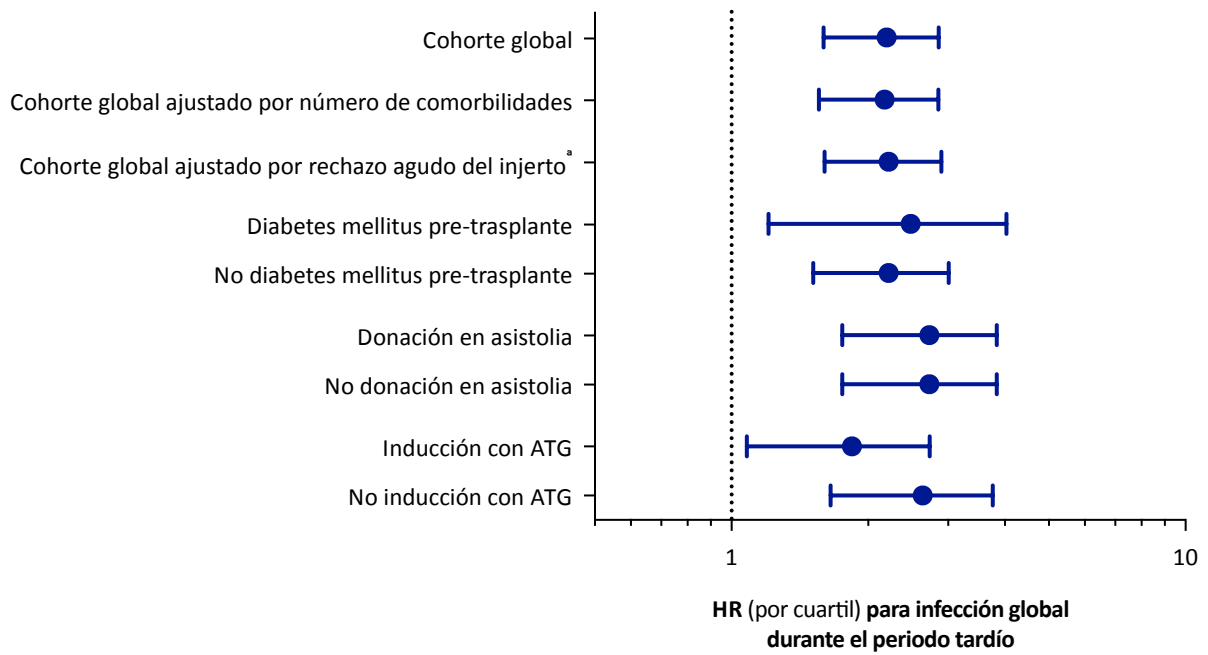


Figura 38. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: *hazard ratios* (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil o en un tercil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global **(a)** y bacteriana **(b)** a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes. ATG: *antithymocyte globulin* (globulina antitimocítica policlonal); CMV: citomegalovirus; HR: *hazard ratio*.

Incluida como variable tiempo-dependiente.

a)



b)

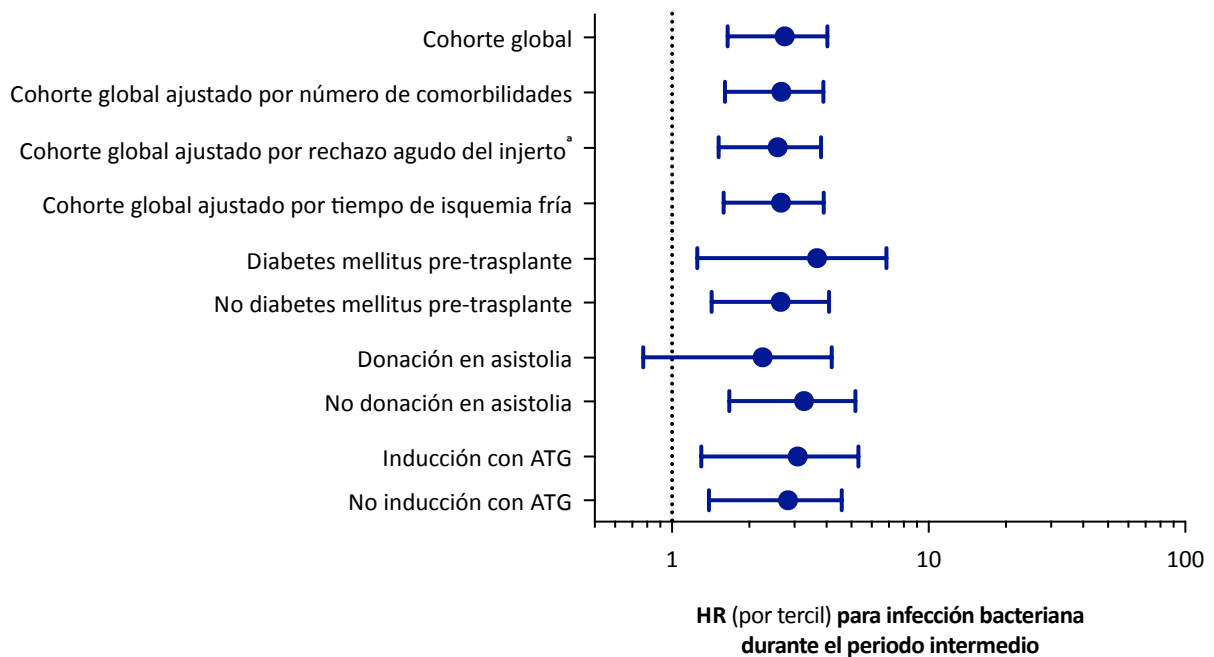
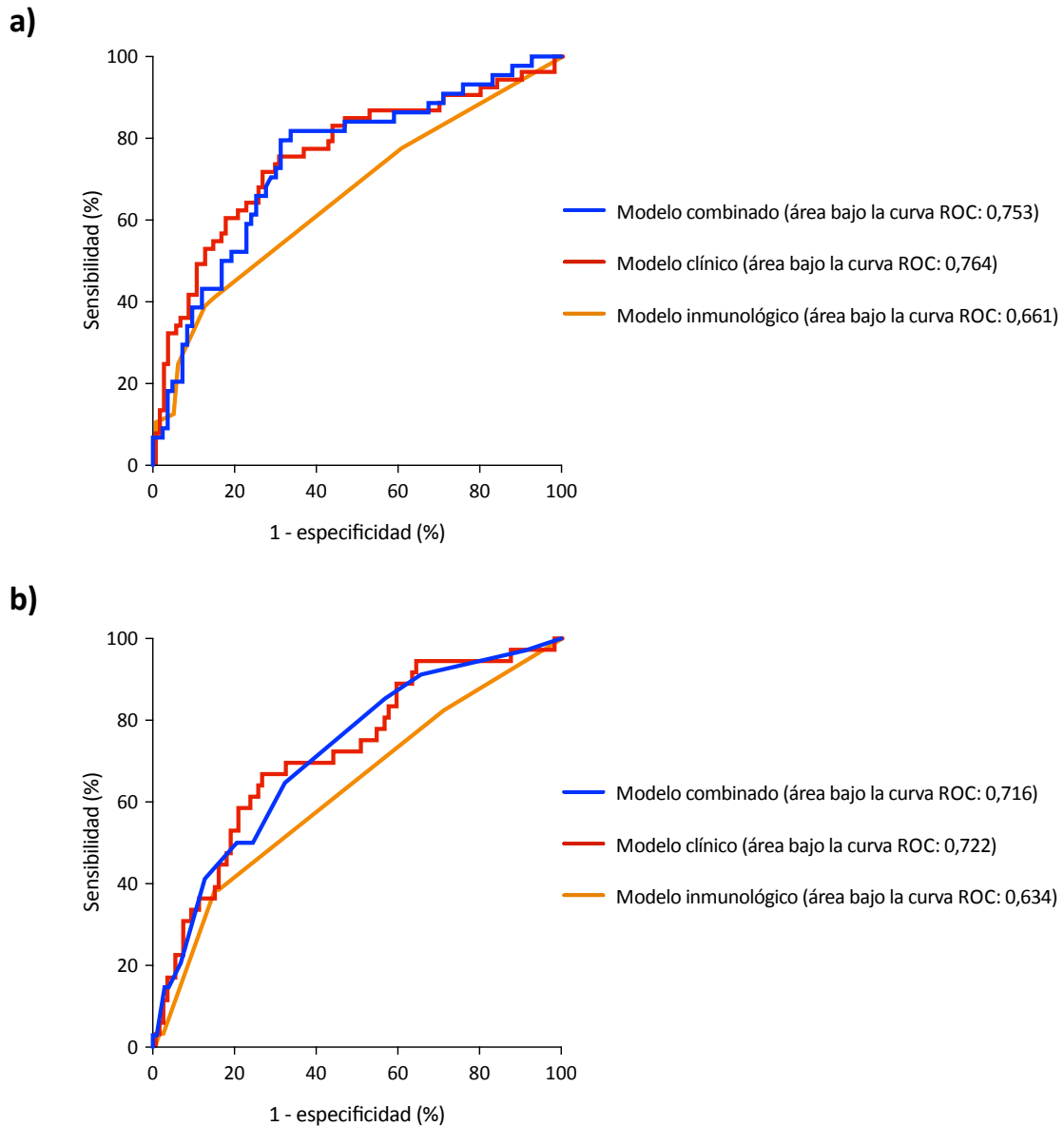
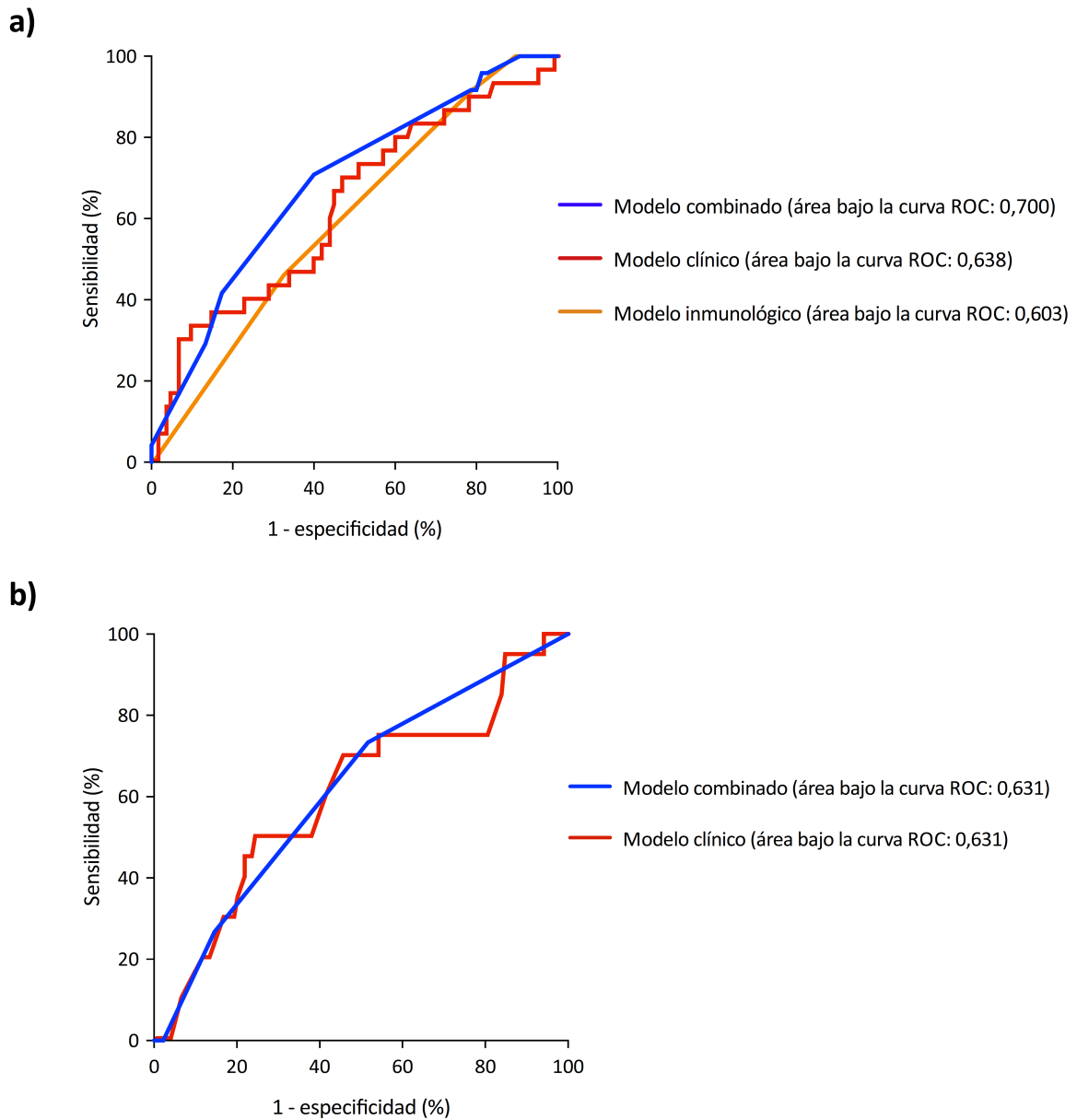


Figura 39. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global **(a)** y bacteriana **(b)** en el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de validación (n = 151 [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 1]). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



Respecto al período tardío, la capacidad de discriminación en la cohorte de validación del modelo combinado para infección global (área bajo la curva ROC: 0,700; IC 95%: 0,580 - 0,820; $P = 0,003$) fue superior a la del modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,638; IC 95%: 0,520 - 0,757; $P = 0,024$). Por otra parte, el rendimiento del modelo combinado para infección bacteriana tardía (área bajo la curva ROC: 0,631; IC 95%: 0,470 - 0,771; $P = 0,163$) fue virtualmente superponible al del modelo clínico (área bajo la curva ROC: 0,631; IC 95%: 0,467 - 0,747; $P = 0,126$) (**Figura 40**).

Figura 40. Áreas bajo las curvas ROC de los distintos modelos de predicción (inmunológico, clínico y combinado [clínico e inmunológico]) del riesgo de infección global **(a)** y bacteriana **(b)** en el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de validación (n = 138 [pacientes vivos y con injerto funcionando en el mes 6]). ROC: *receiver operating characteristic* (característica operativa del receptor).



7.10.1. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección global en el periodo intermedio

Los valores de exactitud diagnóstica correspondientes al modelo de predicción de infección global durante el periodo intermedio en la cohorte de validación son mostrados en la **Tabla 38**. El punto de corte óptimo (>3 puntos) exhibió una sensibilidad del 71,7% (IC 95%: 57,7 - 83,2) y especificidad del 72,2% (IC 95%: 62,1 - 80,8), clasificando correctamente al 72,0% (IC 95%: 64,1 - 79,0) de los pacientes

incluidos en la cohorte de validación. La comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada demostró diferencias significativas tanto al estatificar por el punto de corte óptimo (24,5% [≤ 3 puntos] versus 59,5% [> 3 puntos]; $P < 0,00001$) como por cuartiles (15,8% [Q1] versus 16,7% [Q2] versus 49,2% [Q3] versus 64,3% [Q4]; $P < 0,00001$). También observamos diferencias significativas al comparar la tasas de incidencia acumulada en el día 180 post-trasplante en cada cuartil (**Figura 41**).

Tabla 38. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de validación ($n = 151$ pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 1).

Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P25	88,7% (76,9 - 95,7)	32,9% (23,8 - 43,3)	41,9% (37,9 - 46,1)	84,2% (70,5 - 92,3)	52,7 (44,4 - 60,9)
P50	77,4% (63,8 - 87,7)	65,9% (55,7 - 75,3)	55,4% (47,6 - 62,9)	84,2% (76,1 - 89,9)	70,0% (61,9 - 77,2)
P75	43,4% (29,8 - 57,7)	83,9% (74,5 - 90,9)	62,2% (48,2 - 74,4)	70,9% (65,4 - 75,8)	68,6% (60,2 - 76,2)
Óptimo ^a	71,7% (57,7 - 83,2)	72,2% (62,1 - 80,8)	58,5% (49,5 - 66,9)	82,4% (74,9 - 87,9)	72,0% (64,1 - 79,0)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden (> 3 puntos).

7.10.2. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección bacteriana en el periodo intermedio

Los parámetros de exactitud diagnóstica correspondientes al modelo combinado de predicción de infección bacteriana en el periodo intermedio son detallados en la **Tabla 39**. Al estratifica la cohorte de validación en función del punto de corte óptimo ($> 4,5$ puntos) obtuvimos una sensibilidad del 57,9% (IC 95%: 40,8 - 73,7) y especificidad del 69,9% (IC 95%: 60,6 - 78,2).

Tabla 39. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) en la cohorte de validación ($n = 151$ pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 1).

Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P25	84,2% (68,8 - 93,4)	38,9% (29,9 - 48,6)	31,7% (27,5 - 36,2)	88,0 (77,3 - 94,1)	50,3% (42,1 - 58,6)
P50	76,7% (39,2 - 58,3)	48,7% (39,2 - 58,3)	33,3% (27,9 - 39,2)	85,9% (77,0 - 91,8)	55,6% (47,3 - 63,7)
P75	44,5% (28,2 - 61,7)	81,4% (73,0 - 88,1)	44,7% (32,4 - 57,5)	81,4% (76,5 - 85,5)	72,2% (64,3 - 79,2)
Óptimo ^a	57,9% (40,8 - 73,7)	69,9% (60,6 - 78,2)	39,3% (30,5 - 48,9)	83,2% (76,9 - 87,9)	66,9% (58,8 - 74,3)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden ($> 4,5$ puntos).

Figura 41. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.

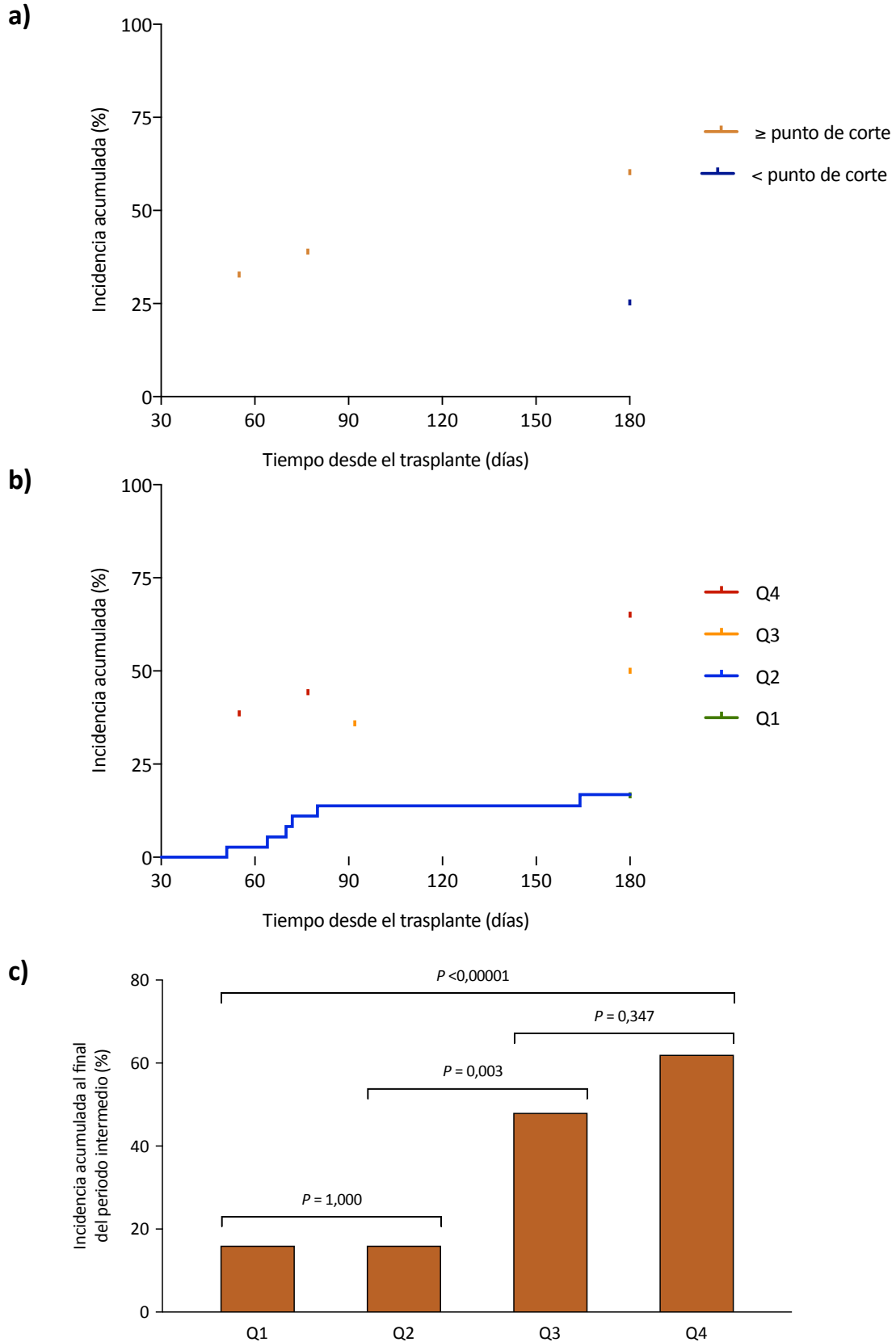
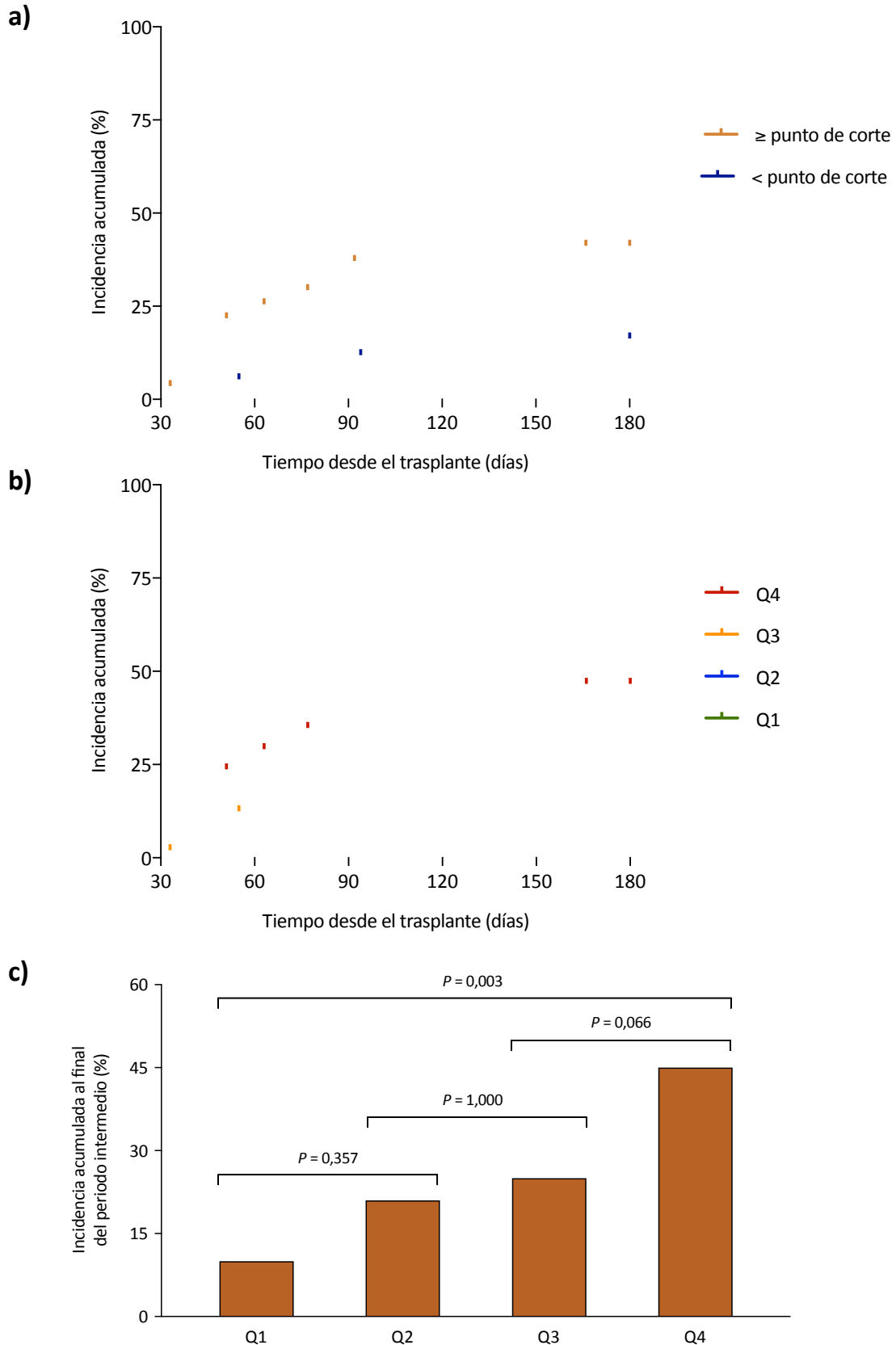


Figura 42. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del periodo estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.



En este caso la precisión (66,9%; IC 95%: 58,8 - 74,3) fue menor al observado en el modelo de infección global. La comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada hasta el día 180 post-trasplante volvieron a mostrar diferencias significativas al estatificar según el punto de corte óptimo (16,3% [$\leq 4,5$ puntos] versus 41,2% [$> 4,5$ puntos]; $P < 0,001$) o según cuartiles (10,5% [Q1] versus 21,4% [Q2] versus 25,8% [Q3] versus 46,7% [Q4]; $P = 0,001$) (**Figura 42**).

7.10.3. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección global en el periodo tardío

La **Tabla 40** ofrece los valores de exactitud diagnóstica (sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y precisión) con sus correspondientes IC 95% exhibidos por el modelo combinado de predicción de infección global tardía en la cohorte de validación. El punto de corte óptimo con arreglo al estadístico J de Youden (> 7 puntos) arrojó unos valores de sensibilidad del 70,8% (IC 95%: 48,9 - 87,4), especificidad del 61,1% (IC 95%: 48,9 - 72,4) y precisión del 65,5% (IC 95%: 53,1 - 73,1). De forma análoga al comportamiento del modelo previo, la estratificación según el P25 (es decir, seleccionado el Q1 de la cohorte) ofreció una sensibilidad (91,7%; IC 95%: 73,0 - 98,9) y VPN (88,9%; IC 95%: 65,5 - 97,0) muy elevados.

Tabla 40. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de validación ($n = 138$ [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]).

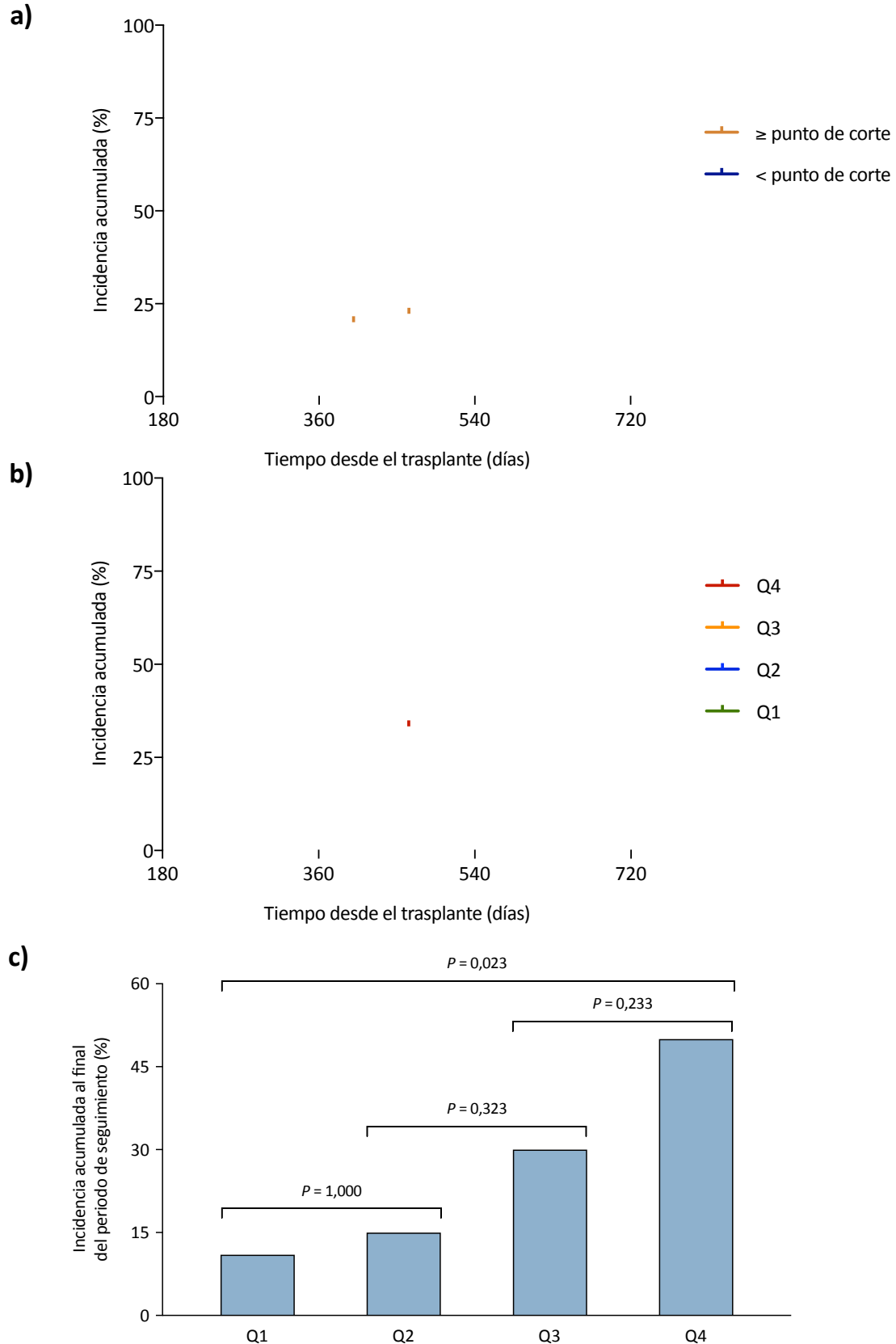
Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P25	91,7% (73,0 - 98,9)	22,2% (13,3 - 33,6)	28,2% (24,8 - 31,8)	88,9% (66,5 - 97,0)	39,6% (29,8 - 50,1)
P50	70,8% (48,9 - 87,4)	61,1% (48,9 - 72,4)	37,8% (29,2 - 47,2)	86,3% (76,6 - 92,3)	63,5% (53,1 - 73,1)
P75	41,7% (22,1 - 63,4)	84,7% (74,3 - 92,1)	47,6% (30,7 - 65,2)	81,3% (75,4 - 86,1)	73,9% (64,0 - 82,4)
Óptimo ^a	70,8% (48,9 - 87,4)	61,1% (48,9 - 72,4)	37,8% (29,2 - 47,2)	86,3% (76,6 - 92,3)	65,5% (53,1 - 73,1)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden (> 7 puntos).

Probablemente como consecuencia del número relativamente pequeño de eventos tardíos en la cohorte de validación, la comparación de las curvas Kaplan-Meier ofreció diferencias menos marcadas, si bien significativas, al estatificar el modelo por el punto de corte óptimo obtenido mediante el estadístico J de Youden (22,7% [≤ 7 puntos] versus 41,3% [> 7 puntos]; $P = 0,008$) o por los diferentes cuartiles (12,5% [Q1] versus 15,1% [Q2] versus 34,9% [Q3] versus 48,7% [Q4]; $P = 0,007$). En cualquier caso se mantuvo la progresividad en la estratificación del riesgo (**Figura 43**).

Figura 43. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección global a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o cuartiles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por cuartiles **(c)**. Q: cuartil.



7.10.4. Rendimiento del modelo combinado de predicción de infección bacteriana en el periodo tardío

Finalmente, en la **Tabla 41** se expone la exactitud diagnóstica en la cohorte de validación del modelo combinado de predicción de infección bacteriana tardía. El punto de corte óptimamente seleccionado (>1,5 puntos), que en este caso coincidió con el T1, se acompañó de unos valores de sensibilidad (73,3%; IC 95%: 44,9 - 92,2) y especificidad (48,8%; IC 95%: 37,9 - 59,9) más modestos, traducidos a su vez en una precisión de tan sólo el 52,5% (IC 95%: 42,3 - 62,5). No se observaron diferencias significativas al comparar las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada estratificadas por dicho punto de corte óptimo (14,9% [\leq 1,5 puntos] versus 21,3% [$>$ 1,5 puntos]; $P = 0,208$) ni por terciles (9,0% [T1] versus 18,9% [T2] versus 27,3% [T3]; $P = 0,141$) (**Figura 44**).

Tabla 41. Exactitud diagnóstica del modelo combinado (clínico e inmunológico) para la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) en la cohorte de validación (n = 138 [pacientes vivos y con injerto funcionante en el mes 6]).

Corte	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Precisión (%)
P33	73,3% (44,9 - 92,2)	48,8% (37,9 - 59,9)	20,0% (14,7 - 26,6)	91,3% (81,5 - 96,2)	52,5% (42,3 - 62,5)
P66	26,7% (7,8 - 55,1)	87,2% (78,3 - 93,4)	26,7% (11,8 - 49,8)	87,2% (83,3 - 90,3)	78,2% (68,9 - 85,8)
Óptimo ^a	73,3% (44,9 - 92,2)	48,8% (37,9 - 59,9)	20,0% (14,7 - 26,6)	91,3% (81,5 - 96,2)	52,5% (42,3 - 62,5)

IC: intervalo de confianza; P: percentil; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

^a Seleccionado con arreglo al estadístico J de Youden (>1,5 puntos).

7.10.5. Evaluación del valor incremental y análisis de sensibilidad en subgrupos

De forma análoga al análisis realizado en la cohorte de derivación, estimamos los HR correspondientes a cada incremento en un cuartil o en un tercil en el modelo de predicción (tanto de forma cruda como ajustada por covariables relevantes) en la cohorte de validación. Realizamos igualmente una serie de análisis de sensibilidad restringidos a subgrupos específicos de pacientes (con o sin diabetes mellitus, inducción con ATG, profilaxis frente a CMV u órgano procedente de un donante en asistolia).

En los modelos de predicción del desarrollo de infección global o bacteriana durante el periodo intermedio se obtuvieron valores de HR que oscilaron entre 1,525 y 2,776, alcanzando la significación estadística en todos los casos con la excepción del modelo de predicción de infección bacteriana en pacientes que recibieron un órgano procedente de un donante en asistolia (HR [por incremento de un cuartil]: 2,191; IC 95%: 0,994 - 4,830; $P = 0,052$) (**Figura 45**).

Figura 44. Rendimiento del modelo combinado (clínico e inmunológico) en la predicción del desarrollo de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de validación: comparación de curvas Kaplan-Meier estratificadas por el punto de corte óptimo **(a)** o terciles **(b)**, y de tasas de incidencia acumulada al final del seguimiento estratificadas por terciles **(c)**. T: tercil.

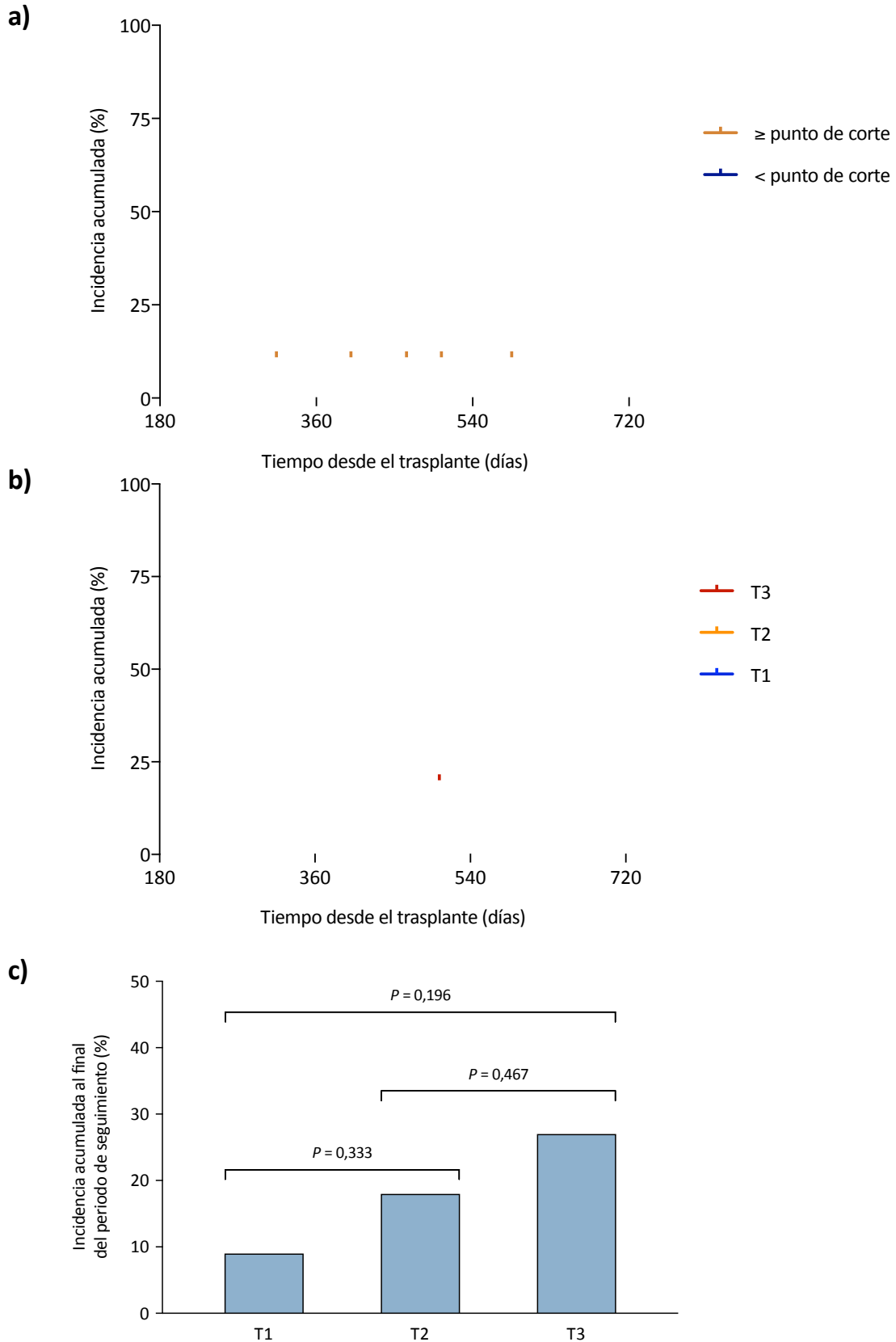


Figura 45. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: *hazard ratios* (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global **(a)** y bacteriana **(b)** a lo largo del periodo post-trasplante intermedio en la cohorte de validación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes. ATG: *antithymocyte globulin* (globulina antitímocítica policlonal); CMV: citomegalovirus; HR: *hazard ratio*.

^a Includida como variable tiempo-dependiente.

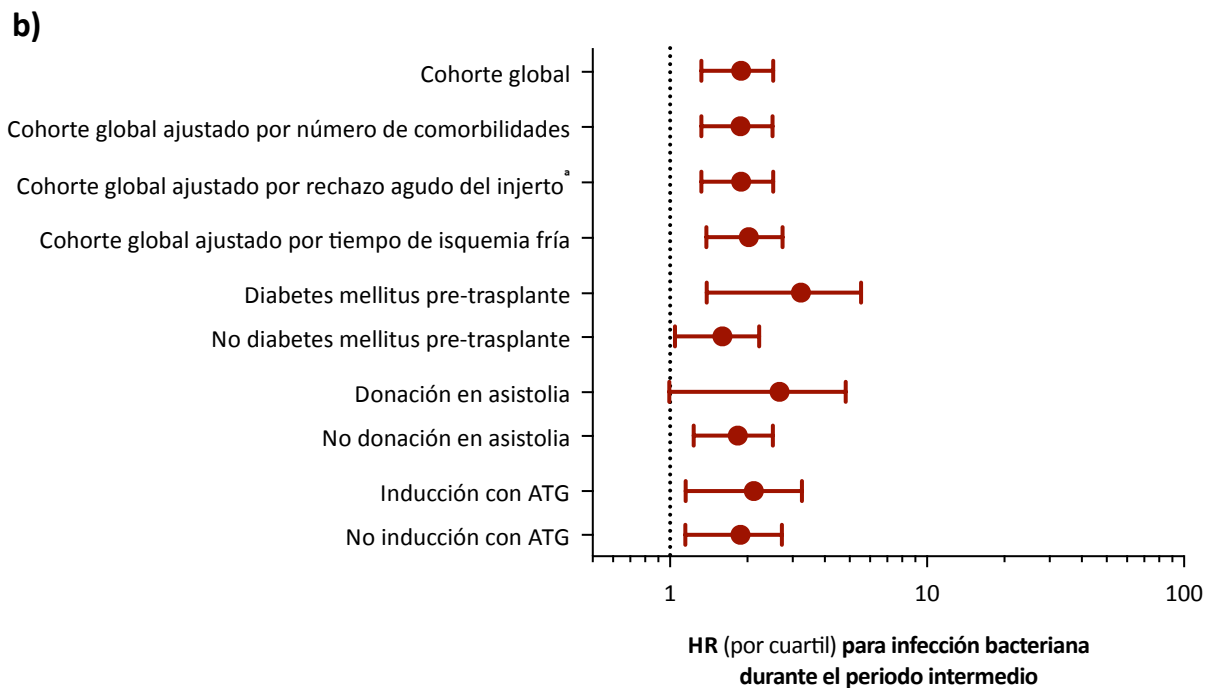
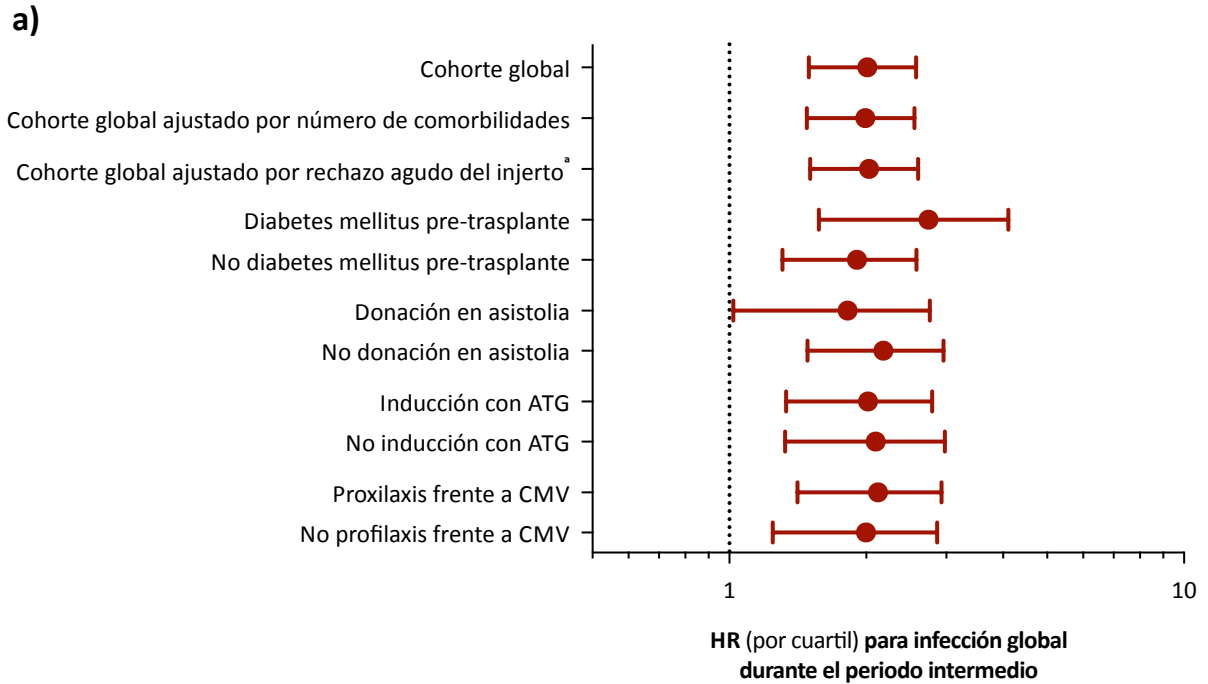
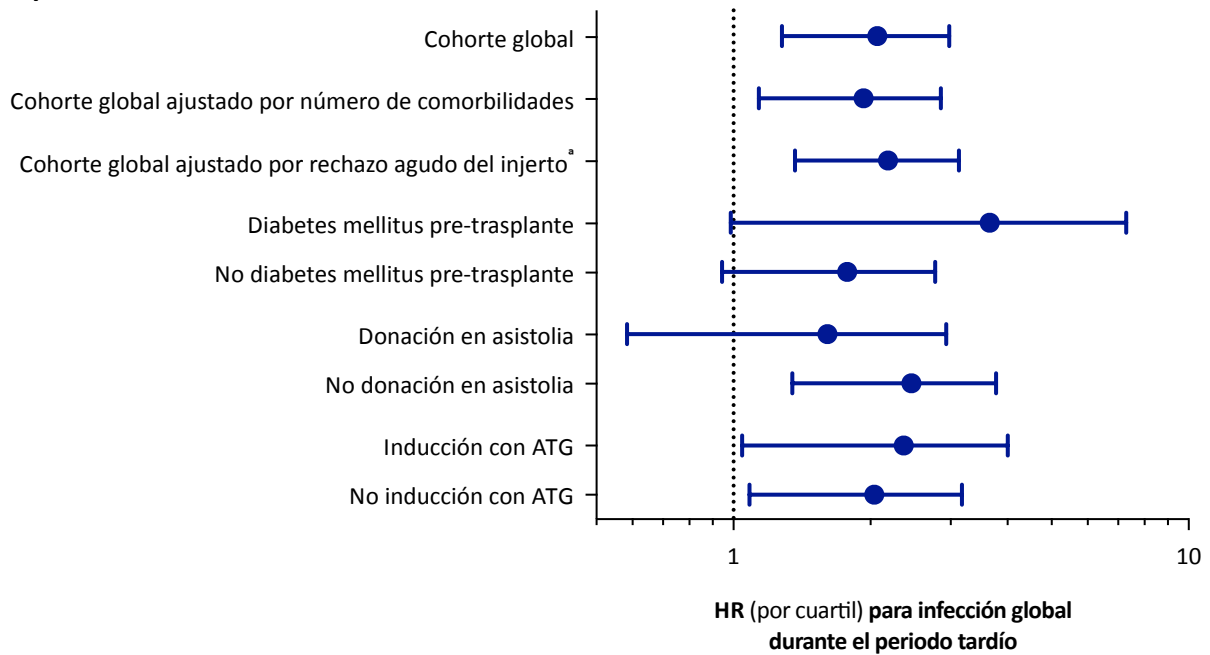


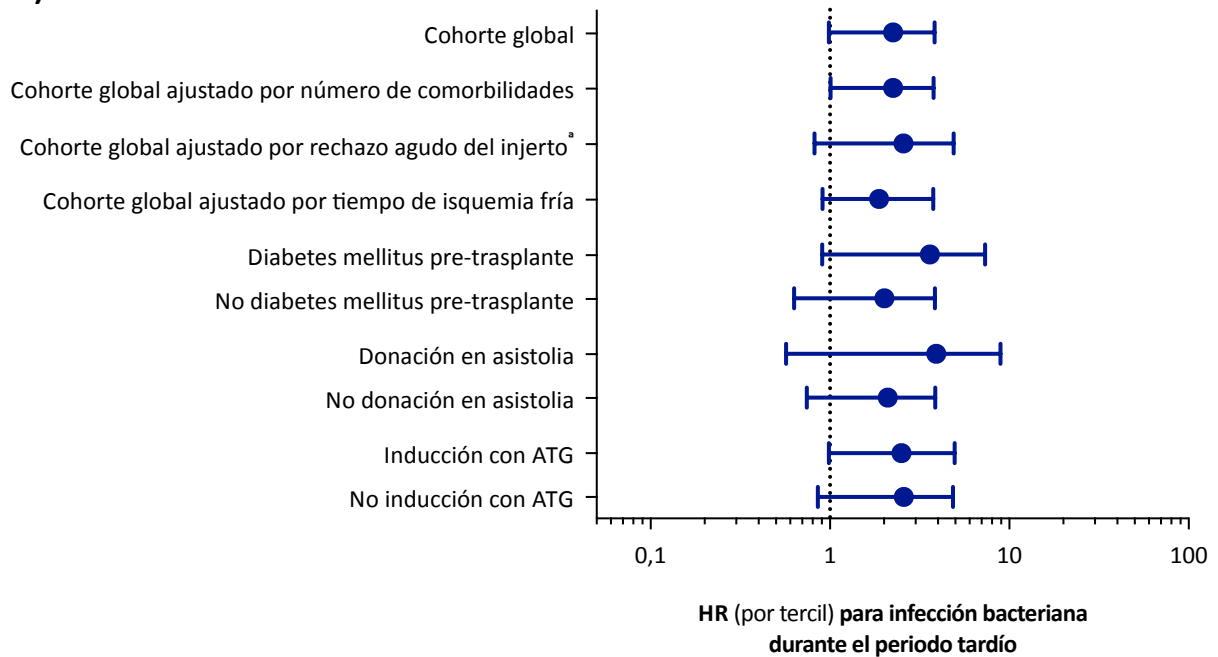
Figura 46. Evaluación de valor incremental y análisis de sensibilidad: *hazard ratios* (tanto crudo como ajustados por covariables relevantes) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% para cada incremento en un cuartil o en un tercil en el modelo combinado (clínico e inmunológico) de predicción del desarrollo de infección global **(a)** y bacteriana **(b)** a lo largo del periodo post-trasplante tardío en la cohorte de derivación global y en ciertos subgrupos específicos de pacientes. ATG: *antithymocyte globulin* (globulina antitimocítica policlonal); CMV: citomegalovirus; HR: *hazard ratio*.

Incluida como variable tiempo-dependiente.

a)



b)



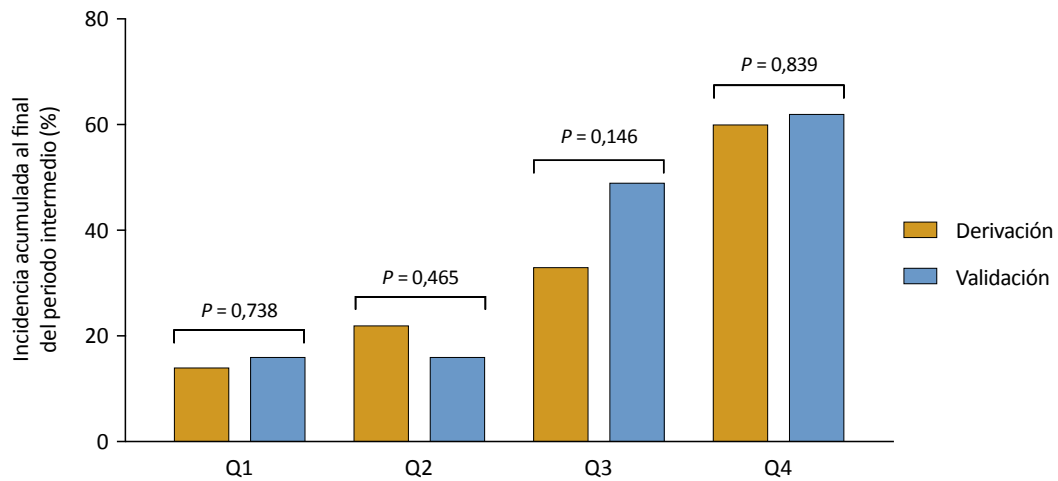
En relación a los modelos de predicción para el periodo post-trasplante tardío, el menor número de eventos condicionó la presencia de IC 95% más amplios y que no se alcanzara la significación estadística en la mayor parte de los análisis de subgrupos, si bien el sentido y la magnitud de los HR fueron similares a los observados en la cohorte de derivación (**Figura 46**).

7.10.6. Calibración de los modelos combinados en las cohortes de derivación y validación

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes de derivación y de validación al comparar las tasas de incidencia acumulada dentro de cada cuartil o tercil al final del correspondiente periodo post-trasplante, ya fuera intermedio (**Figura 47**) o tardío (**Figura 48**).

Figura 47. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación entre las cohortes de derivación y validación de las incidencias acumuladas al final del periodo post-trasplante intermedio para infección global **(a)** y bacteriana **(b)** estratificadas por cuartiles. Q: cuartil.

a)



b)

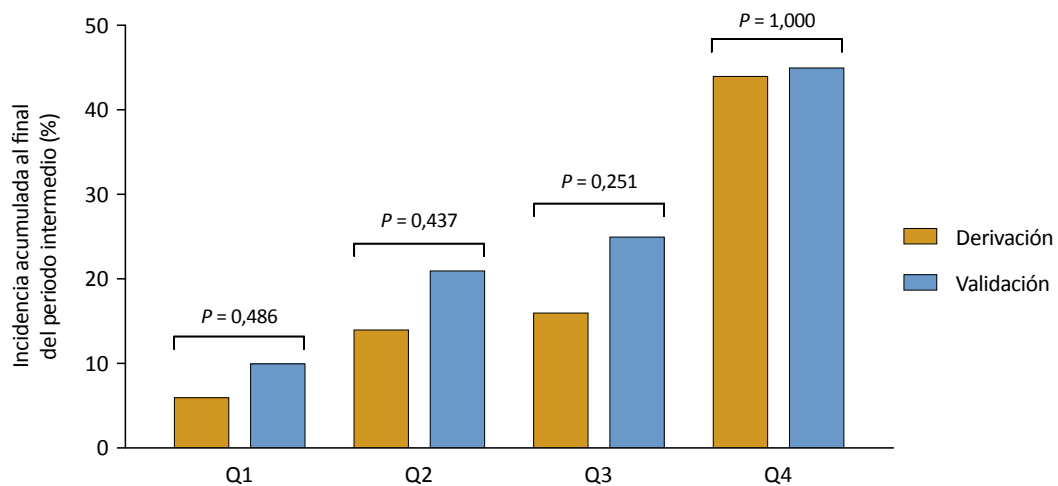
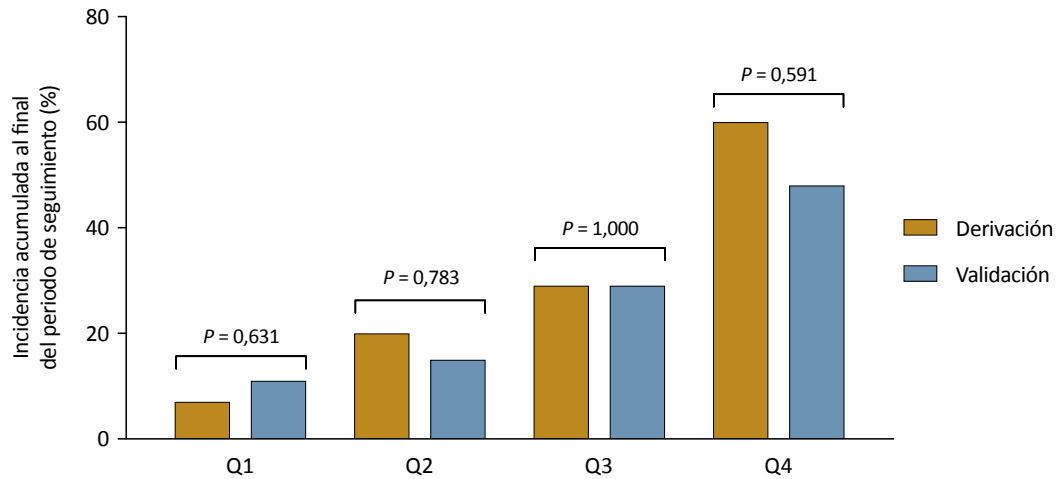
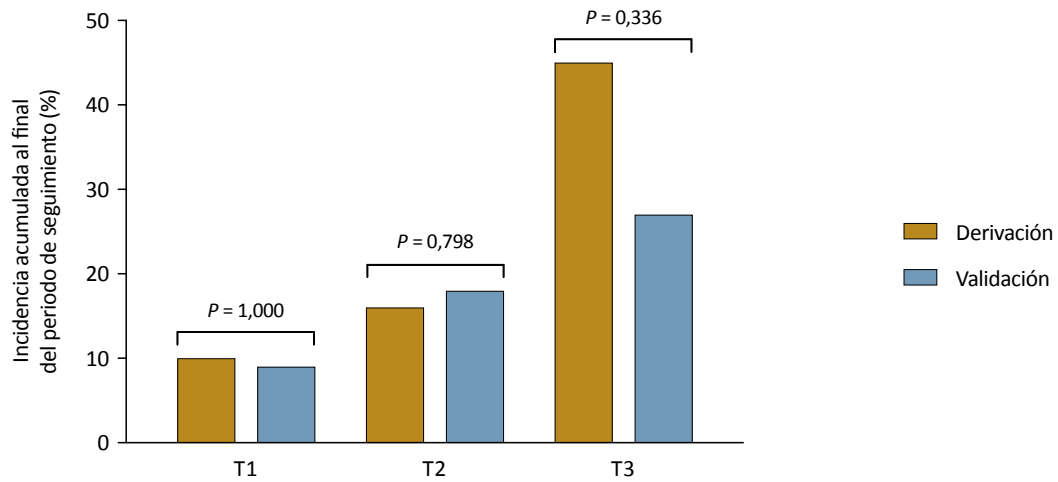


Figura 48. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación entre las cohortes de derivación y validación de las incidencias acumuladas al final del periodo post-trasplante intermedio para infección global **(a)** y bacteriana **(b)** estratificadas por cuartiles o terciles. Q: cuartil; T: tercil.

a)



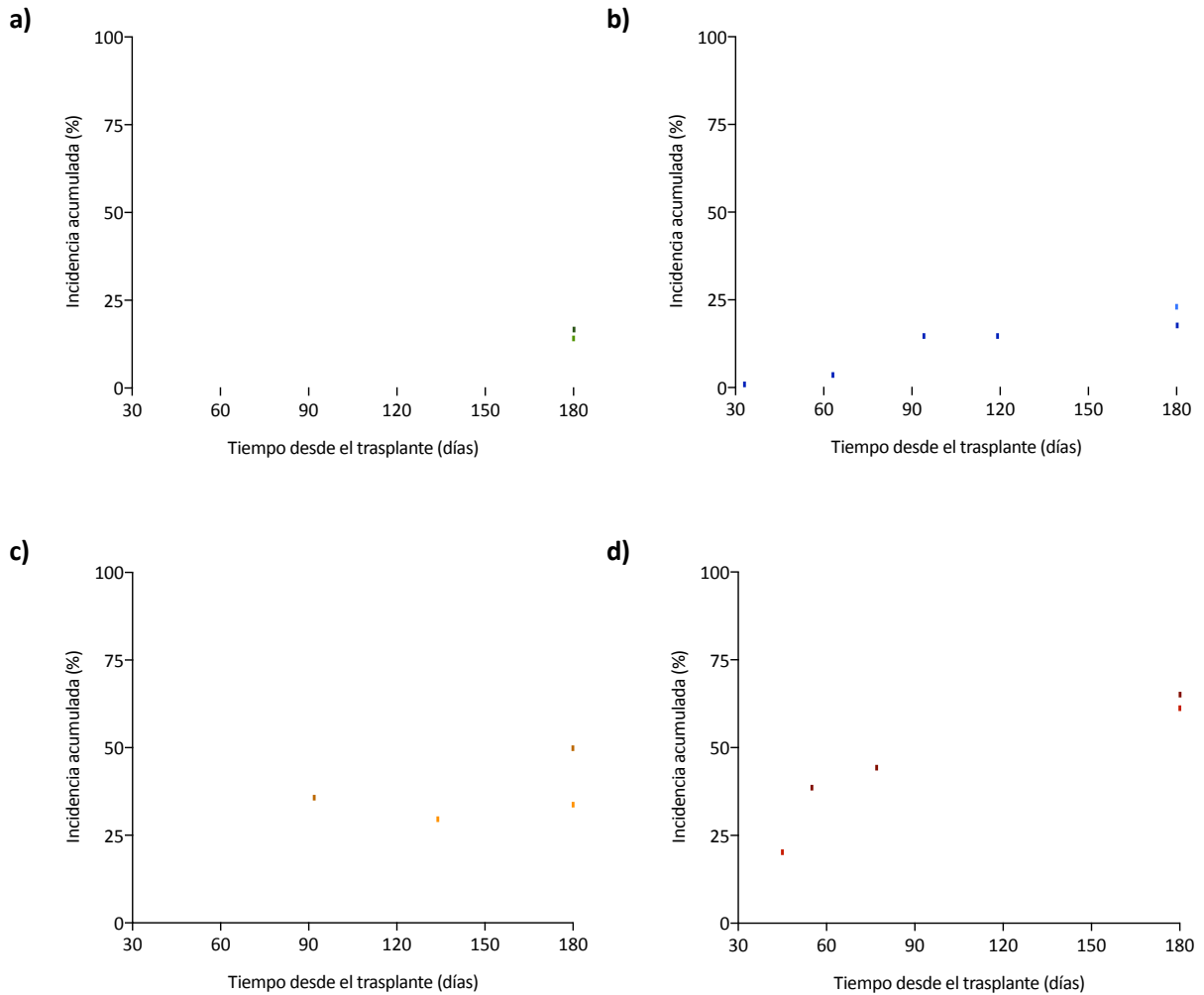
b)



Este hallazgo sugiere una buena calibración de los modelos (es decir, la coincidencia entre las probabilidades predichas y las frecuencias observadas del evento). Cabe destacar, empero, la existencia de una clara diferencia numérica entre ambas cohortes en la incidencia de infección bacteriana tardía en los pacientes agrupados dentro del T3 (45,2% versus 26,7%, respectivamente; $P = 0,336$).

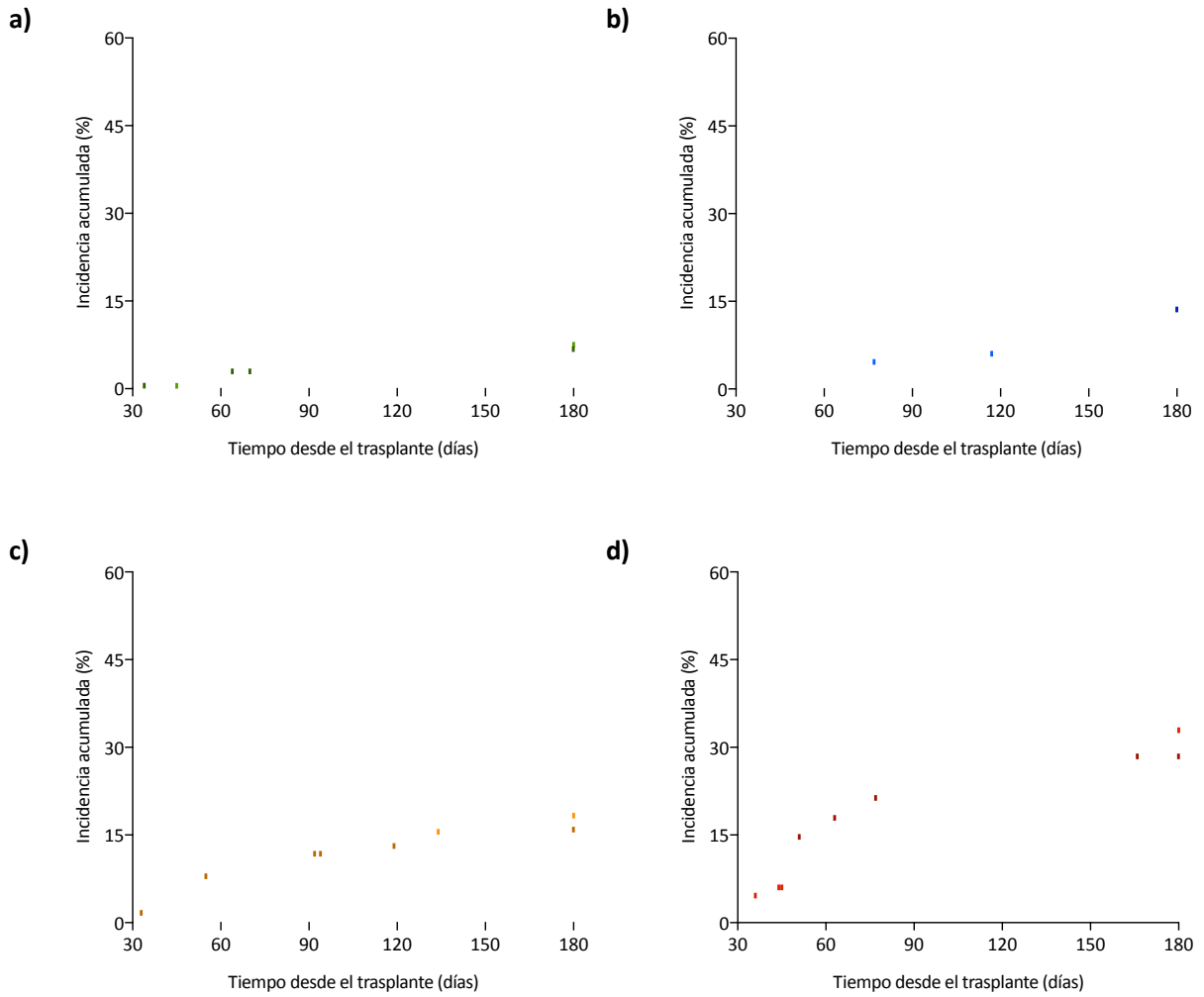
Tampoco observamos diferencias significativas en la comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada hasta el día 180 post-trasplante entre las cohortes de derivación y de validación al estratificar por cuartiles del modelo de predicción de infección global (**Figura 49**) o bacteriana (**Figura 50**) durante el periodo post-trasplante intermedio ($P > 0,05$ en todas las comparaciones).

Figura 49. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección global al final del periodo post-trasplante intermedio entre las cohortes de derivación (trazo claro) y validación (trazo oscuro) estratificadas por primer **(a)**, segundo **(b)**, tercer **(c)** y cuarto cuartil **(d)**.



En relación con la capacidad de discriminación de los modelos diseñados para el periodo post-trasplante intermedio, no se observaron diferencias significativas al comparar las áreas bajo la curva ROC entre ambas cohortes, ya fuera para en infección global (0,771 [cohorte de derivación] versus 0,753 [cohorte de validación]; $P = 0,667$) o bacteriana (0,765 versus 0,716, respectivamente; $P = 0,474$). Tampoco obtuvimos diferencias significativas en la comparación de las áreas bajo la curva ROC para los modelos de infección tardía, ya fuera global (0,736 [cohorte de derivación] versus 0,700 [cohorte de validación]; $P = 0,646$) o bacteriana (0,687 versus 0,631, respectivamente; $P = 0,500$).

Figura 50. Calibración de los modelos combinados de predicción: comparación de las curvas Kaplan-Meier de incidencia acumulada de infección bacteriana al final del periodo post-trasplante intermedio entre las cohortes de derivación (trazo claro) y validación (trazo oscuro) estratificadas por primer **(a)**, segundo **(b)**, tercer **(c)** y cuarto cuartil **(d)**.



8. DISCUSIÓN

La presente investigación está motivada por la necesidad de perfeccionar las aproximaciones que en la actualidad se aplican a la hora de individualizar el riesgo de infección post-trasplante en los receptores de TR. La única estrategia con un grado significativo de implantación clínica se limita a la monitorización terapéutica de los niveles plasmáticos de fármacos inmunosupresores (fundamentalmente circunscrita a anti-calcineurínicos e inhibidores de la mTOR) [9,10]. Este abordaje, unidimensional y estrictamente farmacocinético, se ve justificado por los estrechos márgenes terapéuticos exhibidos por estos fármacos y la relativa variabilidad inter-individual en determinados aspectos de su metabolismo, como demuestra el impacto sobre los niveles de tacrólimus de las variantes alélicas de ciertos SNP en los genes *CYP3A4* y *CYP3A5* [154]. Si bien la monitorización terapéutica de los fármacos inmunosupresores ha demostrado su valor en la evaluación del riesgo de rechazo, el correlato entre este parámetro y el desarrollo de eventos relacionados con el exceso de inmunosupresión (como es la infección post-trasplante) resulta menos evidente. Por ejemplo, en la presente experiencia no encontramos diferencias significativas en los niveles valle de tacrólimus o de mofetil micofenolato medidos en los meses 1 o 6 entre los pacientes que sufrieron posteriormente algún episodio de infección y los que permanecieron libres de tal complicación (**Tablas 18 y 19**). De este modo, resulta atractiva la idea de incorporar en la toma de decisiones clínicas algún parámetro de naturaleza farmacodinámica capaz de reflejar en mayor medida el impacto funcional del tratamiento inmunosupresor sobre la respuesta del huésped.

A través de una metodología basada en la construcción sucesiva de tres modelos de predicción (clínico, inmunológico y combinado), hemos tratado de ofrecer una aproximación integradora a la multiplicidad de parámetros que condicionan la susceptibilidad individual del receptor de TOS. La formulación por parte de Fishman [138] del concepto de “estado neto de inmunosupresión” obedecería a esta visión holística de la patogénesis de la infección post-trasplante, en la que se suman efectos directamente atribuibles al tratamiento inmunosupresor (como el tipo de fármaco empleado, la duración del régimen o la dosis acumulada) junto con otros relacionados con la enfermedad de base del paciente, sus comorbilidades, las complicaciones perioperatorias, la función del injerto o el estado nutricional. Por otra parte el propio Fishman propone como segundo vector etiopatogénico la exposición ambiental a determinados microorganismos, que estaría condicionada a su vez por el estrecho contacto con el medio sanitario al que con frecuencia se ve sometido el receptor de TOS, tanto en la fase pre-trasplante (e.g., tiempos en diálisis en los candidatos a TR) como en el periodo posterior (e.g., presión antibiótica,

uso de catéteres intravasculares o urinarios, o realización de procedimientos invasivos) [131]. A partir de este fundamento teórico podríamos aventurar que el modelo predictivo exclusivamente inmunológico refleja, en esencia, este estado neto de inmunosupresión. El modelo clínico, por su parte, traduciría más bien factores relacionados con la exposición ambiental o epidemiológica. Al sumar ambos tipos de variables, el modelo combinado (es decir, basado en parámetros tanto clínicos como inmunológicos) vería optimizada su capacidad predictiva. Esta hipótesis parece ser corroborada por la mayor capacidad de discriminación (evaluada a través del área bajo la curva ROC) que hemos observado en los modelos combinados de predicción respecto a los modelos clínicos o inmunológicos, tanto para la cohorte de derivación (**Figuras 27 a 30**) como, en menor medida, para la de validación (**Figuras 39 y 40**).

La susceptibilidad a la infección en receptores de TOS, por otra parte, es un fenómeno dinámico y cambiante a lo largo del tiempo. De este modo, la contribución relativa de los dos vectores antes citados (el estado neto de inmunosupresión y la exposición ambiental) experimenta modificaciones durante el seguimiento tras el trasplante que obliga a analizar separadamente distintos escenarios temporales. El cronograma clásico de la epidemiología de la infección en el TOS tiende a distinguir tres periodos, cada uno de ellos con diferentes condicionantes etiopatogénicos [131,138]. En el periodo precoz (primer mes) tendería a predominar la infección nosocomial o asociada al cuidado sanitario (e.g., infección del lecho quirúrgico o bacteriemia asociada a catéteres intravasculares), toda vez que los factores perioperatorios juegan en ella un papel más relevante que los atribuibles al tratamiento inmunosupresor. Durante el periodo intermedio (entre el primer y el sexto mes) la carga de inmunosupresión alcanza su nivel máximo, por lo que predomina la infección oportunista propiamente dicha. A partir del sexto mes post-trasplante (periodo tardío), conforme disminuye gradualmente el nivel de inmunosupresión, tanto la incidencia como los agentes causales de la infección comienzan a asimilarse a los observados en la población general. Cabe destacar que este esquema relativamente lineal se ha visto progresivamente cuestionado atendiendo al impacto de diversos fenómenos, tales como la administración de profilaxis durante periodos cada vez más prolongados o la necesidad de incrementar de forma tardía la intensidad del tratamiento inmunosupresor tras el desarrollo de rechazo o la recidiva de ciertas enfermedades de base [81,155]. No obstante, nuestra experiencia se acomoda a este cronograma clásico. La infección del lecho quirúrgico fue predominante durante el periodo precoz (**Tabla 11**), mientras que la incidencia de infecciones genuinamente oportunistas, tales como la enfermedad por CMV o la candidiasis invasora

(Figura 7 y Tabla 15), fueron máximas en el periodo intermedio. Esta circunstancia podría justificar la imposibilidad de generar un modelo predictivo inmunológico (y, por tanto, el correspondiente modelo combinado) para la infección durante el periodo post-trasplante precoz. De forma concordante con nuestros estudios previos [27,56,86], no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros inmunológicos evaluados en el momento basal (pre-trasplante) entre pacientes con o sin infección precoz (Figuras 17 a 19). Sólo ciertos parámetros clínicos relacionados con las comorbilidades del receptor (EPOC) y su enfermedad renal de base (nefropatía diabética) parecieron desempeñar un papel predictor del desarrollo de infección global o bacteriana durante el primer mes. Un estudio multicéntrico derivado de la cohorte RESITRA también demostró una mayor incidencia de infección de lecho quirúrgico entre receptores diabéticos [156]. Podríamos afirmar, por tanto, que en la patogenia de la infección precoz el estado neto de inmunosupresión ejerce un papel relativamente menor, por lo que la monitorización inmunológica no aporta un beneficio apreciable en dicho periodo. La utilidad de los modelos combinados (clínicos e inmunológicos), por el contrario, resultó máxima en la predicción del desarrollo de infección a lo largo del periodo intermedio. Así, las áreas bajo la curva ROC para infección tanto global como bacteriana en la cohorte de derivación fueron elevadas (0,771 y 0,765, respectivamente), sugiriendo una buena capacidad de discriminación (es decir, la probabilidad de que un par cualquiera de pacientes con y sin infección durante ese periodo fuera correctamente clasificado). Ambas áreas bajo la curva ROC fueron superiores, además, a las estimadas para los modelos clínicos e inmunológicos (Figuras 27 y 28). En el modelo combinado de infección global fueron incluidos parámetros demográficos (edad del receptor) y otros puramente clínicos que pueden reflejar un curso post-trasplante complicado y, por tanto, mayor fragilidad y hospitalización prolongada (necesidad de reintervención quirúrgica durante el primer mes y función del injerto [medida como FGe] en el día 30), junto a variables inmunológicas que informan acerca de la funcionalidad de la respuesta celular (linfocitos T CD4⁺ <30 céls/mcL), humoral (linfocitos B <110 céls/mcL y niveles séricos de IgA <115 mg/dL), y del sistema del complemento (niveles séricos de C3 <76 mg/dL) (Tabla 28). El papel deletéreo de la inmunosenescencia sobre el riesgo de infección está bien documentado, particularmente en el contexto del TOS [157,158], por lo que no sorprende que la edad del receptor se mantuviera en el modelo final. En cuanto a la infección bacteriana, las variables que incorporamos al modelo combinado de predicción volvieron a ser la edad del receptor y la función del injerto (en este caso evaluada por la

necesidad o no de diálisis en las primeras semanas), a las que se asoció el antecedente de infección bacteriana en el primer mes (que probablemente actúe como un marcador subrogado del desarrollo de complicaciones quirúrgicas, estancia hospitalaria prolongada y presión antibiótica) y dos parámetros inmunológicos (niveles sericos de IgG <500 mg/dL y recuento de linfocitos NK <68 céls/mcL). Dentro de las diferentes clases de inmunoglobulinas, la IgG es la que ejerce un papel más relevante en la opsonofagocitosis de las bacterias extracelulares (sobre todo encapsuladas) y en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, además de activar eficientemente la vía clásica del sistema del complemento [159]. Tanto nuestros trabajos [27,160] como un meta-análisis previo [28] indican que la magnitud de la HGG IgG incrementa de forma directa y proporcional la susceptibilidad a la infección bacteriana, con riesgos particularmente elevados en presencia de formas graves (niveles de IgG <400-500 mg/dL). Los linfocitos NK, por su parte, desempeñan un papel relevante en la síntesis de citoquinas con potente actividad antiviral como el interferón- γ (subpoblación CD56^{high}CD16^{dim}) y en la citotoxicidad directa (subpoblación CD56^{dim}CD16^{high}) [161]. En esta última función, además, los linfocitos NK tienen la ventaja, frente a los linfocitos T CD8⁺, de no estar restringidos por moléculas HLA ni requerir los pasos previos de reconocimiento antigénico y activación. En otros trabajos ya habíamos demostrado que el recuento de linfocitos NK predice mejor que el de otras subpoblaciones linfocitarias el desarrollo de infección oportunista en receptores de trasplante hepático [162] o el de zóster en receptores de TR [163]. Por ello, la inclusión de ambos parámetros en el modelo final parece plenamente justificada.

La aplicabilidad clínica de un modelo, más allá de su capacidad de discriminación, depende en buena medida de su exactitud diagnóstica y de la posibilidad de establecer un valor de corte de análisis de decisión óptimo [164]. En ese sentido, los umbrales seleccionados mediante la aplicación del estadístico J de Youden para los modelos combinados de infección global (>4 puntos) y bacteriana (>6,5 puntos) exhibieron un rendimiento notable, con un VPP que osciló entre el 47,4% y el 60,7%, y una precisión del 74,0% al 79,3% (**Tablas 34 y 35**). Evidentemente, la selección del punto de corte ideal deberá estar supeditada al contexto asistencial al que se pretenda aplicar el modelo predictivo. Si el objetivo del clínico consiste en la identificación de un subgrupo de pacientes con un riesgo muy bajo de infección (en los que, por tanto, se pudiera plantear la suspensión de profilaxis antimicrobianas o la flexibilización del seguimiento clínico), se debería recurrir a umbrales bajos que mostraran una elevada sensibilidad [165]. Empleando como punto de corte el P25 de cada modelo (es decir, seleccionado el 25% de los pacientes

con puntuaciones más bajas o, dicho con otras palabras, el Q1) obtuvimos una sensibilidad y un VPN del 89,3% y 86,1% para el desarrollo de infección global, y del 92,9% y 88,6% para la infección bacteriana. En virtud al teorema de Bayes, el VPP de cualquier test diagnóstico (los modelos de predicción en este caso) es directamente proporcional a la prevalencia de la enfermedad en cuestión (esto es, la *odds* pre-prueba). Por ese motivo, aunque la aplicación del P75 (es decir, tomando al 75% de los pacientes con puntuaciones más bajas, integrados en los tres primeros cuartiles [Q1 a Q3]) como punto de corte arrojara una excelente especificidad tanto en el modelo de infección global como bacteriana (85,2% y 83,3%, respectivamente), la capacidad de predecir qué pacientes van a desarrollar el evento de interés (es decir, el VPP en nuestro contexto clínico en concreto) fue menor (59,7% y 44,3%).

Cabe destacar que el valor incremental (es decir, el exceso de riesgo que se asocia a cada incremento unitario en el marcador) de los modelos aplicados al periodo intermedio y estratificados por cuartiles osciló entre el 87% (HR no ajustado: 1,875) y el 127% (HR no ajustado: 2.274) para la infección global y la bacteriana, respectivamente. Dichos valores permanecieron en esencia sin variaciones tras ajustar el análisis de regresión de Cox por ciertas covariables clínicamente relevantes que pudieran actuar como modificadores del efecto, como la carga de comorbilidad pre-trasplante, el tiempo de isquemia fría o el desarrollo de rechazo agudo. Éste último evento fue analizado como variable tiempo-dependiente, procedimiento que tiene en cuenta la ausencia de proporcionalidad en la exposición al riesgo a lo largo del tiempo (es decir, dado que la incidencia de rechazo no fue constante en cada periodo de exposición, tampoco lo fue su impacto sobre la susceptibilidad a la infección) [166]. La consistencia de los modelos de predicción se vio igualmente reforzada mediante una serie de análisis de sensibilidad restringidos a subgrupos concretos de pacientes (seleccionados atendiendo a sus comorbilidades, tipo de donante, tratamiento de inducción o profilaxis frente a CMV). El impacto pronóstico por cada incremento en un cuartil fue mayor en pacientes diabéticos, y particularmente la infección bacteriana (HR: 4,954), si bien se mantuvo estadísticamente significativo en todos los subgrupos analizados (**Figura 37**).

La construcción de los modelos de predicción aplicables al periodo tardío confrontó dos dificultades intrínsecas. Por una parte, y según se ha expuesto en la descripción del cronograma clásico de infección post-trasplante, la incidencia de eventos a partir del sexto mes experimentó un descenso importante respecto a los dos periodos previos, en particular en infección bacteriana (**Figuras 5 y 6**). En cuanto a otros tipos de infección, la tasa acumulada de enfermedad por CMV tardía en la cohorte global fue muy

baja (4,5%), predominando el zóster cutáneo (7,7%) entre las infecciones víricas, y con una incidencia de infección fúngica testimonial (**Tabla 13 y 15**). Teniendo en cuenta que la cohorte de derivación sólo incluía dos terceras partes de la población global a estudio, y a pesar de contar con un tamaño muestral notable, el número absoluto de eventos tardíos fue reducido. Esta circunstancia pudo comprometer la estabilidad de los modelos multivariantes y su potencia estadística, dificultando nuestra capacidad de detección de factores de riesgo clínicos o inmunológicos. Por otro lado, la propia extensión temporal del periodo en riesgo, que abarcó desde el día 180 post-trasplante hasta el final del periodo de seguimiento (con una mediana de 4,2 años), limitó forzosamente el rendimiento de cualquier modelo predictivo que incorpore únicamente variables disponibles al inicio de la exposición. En consecuencia, la capacidad de discriminación de los modelos clínicos fue mediocre, con áreas bajo la curva ROC de 0,617 para la infección global y 0,599 para la bacteriana. Si bien los modelos combinados mejoraron sensiblemente este rendimiento (hasta 0,736 y 0,687, respectivamente) (**Figuras 29 y 30**), su exactitud diagnóstica fue inferior a la observada en el periodo post-trasplante intermedio. El desarrollo de rechazo agudo en los 6 meses previos, el antecedente de enfermedad aterotrombótica, y dos parámetros inmunológicos (niveles de C3 <103 mg/dL y recuento de linfocitos NK <232 céls/mcL) fueron las variables incluidas en el modelo predictivo para infección global tardía (**Tabla 32**). En un estudio previo de nuestro grupo realizado en receptores de trasplante pancreato-renal, el diagnóstico de enfermedad arterial periférica pre-trasplante actuó igualmente como un factor de riesgo de infección [167]. El modelo para infección bacteriana tardía, por su parte, también se basó en el antecedente de rechazo previo y en los niveles séricos de C3 (<103 mg/dL) en el mes 6, incorporando además la seropositividad frente a VHC (**Tabla 33**). En concordancia con la mayor parte de la literatura disponible [168,169], un estudio multicéntrico realizado en nuestro país sobre más de 1.300 receptores de TR (cohorte RESITRA) demostró que los pacientes con serología positiva frente a VHC presentan mayores incidencias de infección bacteriana (pielonefritis y bacteriemia) [170]. En cualquier caso, la precisión del modelo combinado para infección global tardía empleando el punto de corte óptimo (>7 puntos) fue de tan sólo el 65,6%. En el modelo de infección bacteriana tardía este parámetro mejoró hasta el 81,1%. Como era previsible considerando la baja prevalencia de eventos tardíos, el VPN de ambos modelos estratificados por el P25 (tomando el Q1) o el P33 (tomando el T1) fue muy elevado, excediendo el 90% (**Tablas 36 y 37**). En términos globales, el análisis del valor incremental, ya fuera crudo, ajustado por otras covariables o restringido a subgrupos

específicos, fue similar al observado en los modelos del periodo intermedio, aunque el menor número de eventos condicionó un mayor rango de los IC 95% (**Figura 38**).

Por último, replicamos todos los procedimientos anteriores en la cohorte independiente de validación, que estuvo integrada por 155 pacientes. No hubo diferencias significativas en las características basales o en la incidencia de infección post-trasplante entre ambas cohortes, aunque el tamaño muestral más reducido condicionó una menor potencia estadística en este conjunto de análisis (en particular, una vez más, en lo referido a los eventos del periodo tardío). La reproducibilidad de los modelos combinados de predicción diseñados para el periodo post-trasplante intermedio fue excelente, como sugieren las áreas bajo la curva ROC obtenidas (0,753 para infección global y 0,716 para bacteriana). Hay que señalar, no obstante, que su capacidad de discriminación fue esencialmente superponible a la de los modelos clínicos correspondientes (**Figura 39**). La exactitud diagnóstica, tras segmentar la cohorte según el punto de corte óptimo de cada modelo (que en este caso fue >3 puntos para infección global y >4,5 puntos para infección bacteriana), se mantuvo en niveles aceptables, con valores de sensibilidad y especificidad que oscilaron entre 59,9% y 72,2%. El VPP, por el contrario, descendió hasta algo menos del 40% en el modelo de infección bacteriana, si bien una vez más habría que valorar dicho parámetro en el contexto de una incidencia relativamente baja del evento (**Tablas 38 y 39**). La estratificación de los modelos (es decir, el incremento en la incidencia de infección a través de cuartiles crecientes) fue menos progresiva en la cohorte de validación que en la de derivación, como señala la demostración de tasas de incidencia muy similares (con superposición en las respectivas curvas Kaplan-Meier) entre los Q1 y Q2 en infección global (**Figura 41**) y los Q2 y Q3 en infección bacteriana (**Figura 42**). Es verosímil asumir que la limitación en el tamaño muestral de la cohorte de validación, junto a un rendimiento sub-óptimo de los propios modelos, expliquen la pobre capacidad de discriminación observada en el periodo post-trasplante tardío (con áreas bajo la curva ROC que no excedieron de 0,700) y una peor estratificación del riesgo, en la que no se alcanzó la significación estadística al emplear el punto de corte óptimo o segmentar por terciles progresivos del modelo (**Figuras 40 y 44**).

Otra dimensión importante en la calidad de las predicciones es la calibración, que podría ser definida como la coincidencia entre las probabilidades predichas y las frecuencias observadas del evento de interés [171]. En ese sentido, hay que destacar que no observamos diferencias significativas entre la cohorte de derivación y la de validación ni en su capacidad de discriminación (áreas bajo la curva ROC

muy similares) ni de estratificación del riesgo, toda vez que dentro de un determinado cuartil o tercil las tasas de incidencia acumulada fueron asimilables y las curvas Kaplan-Meier, superponibles (**Figuras 47 a 50**). Estos resultados sugieren una correcta calibración de los modelos combinados de predicción.

Esta investigación presenta una serie de fortalezas metodológicas que merecen ser destacadas: diseño prospectivo; elevado tamaño muestral; aplicación de definiciones estandarizadas para los eventos de interés (minimizando así el sesgo de clasificación); división del seguimiento post-trasplante en distintos periodos con construcción de modelos de predicción específicos para cada uno de ellos; presencia de cohortes independientes para la derivación y la validación de los modelos; multiplicidad en el abordaje estadístico de los datos (curvas ROC, tasas de incidencia acumulada, curvas Kaplan-Meier, modelos de regresión o variables tiempo-dependientes); y consistencia de los resultados en el ajuste multivariante o en los análisis de sensibilidad. Además, los parámetros inmunológicos evaluados están habitualmente disponibles en la rutina asistencial, su determinación no precisa de un equipamiento complejo ni de una carga de trabajo suplementaria en el laboratorio, y resultan económicamente asequibles. Creemos que estas consideraciones logísticas podrían favorecer su aplicabilidad en la práctica clínica habitual.

El presente estudio también adolece, empero, de ciertas limitaciones. Como se ha señalado, y a pesar de partir de un tamaño muestral considerable, la necesidad de segmentar la muestra en dos cohortes y tres periodos diferentes motivó que el número de eventos disponibles dentro de algunos subgrupos (en particular a partir del sexto mes post-trasplante) fuera reducido, con el consiguiente impacto en la estabilidad de los modelos y en la potencia estadística de ciertos subanálisis. En ese sentido, la decisión de construir y analizar por separado dos cohortes diferentes, aunque intuitivamente correcta desde un punto de vista metodológico, pudo ser menos eficiente en la utilización de la muestra disponible que otros abordajes más sofisticados (como el remuestreo o *bootstrapping*) [172]. El diseño unicéntrico del estudio dificulta su extrapolación a otras instituciones con diferentes incidencias de infección post-trasplante o estrategias de profilaxis, por lo que sus hallazgos deberían ser externamente validados en futuros estudios. La categorización de los objetivos de evaluación (*outcomes*) se limitó a la infección global y la bacteriana, en tanto que hubiera sido de interés el desarrollo de modelos específicos para otros tipos de infección, particularmente de naturaleza oportunista (e.g., enfermedad por CMV, zóster o infección fúngica invasora). A pesar del diseño prospectivo, de la realización de ajustes multivariantes y de la experiencia de nuestro grupo en este tipo de estudios [27,36,56,86,91,132,133], no podemos

excluir por completo la influencia potencial en las asociaciones observadas de factores confusores no identificados. Por último, las diferencias observadas en la capacidad de discriminación entre los modelos combinados y los exclusivamente clínicos fue pequeña (con incrementos absolutos en los valores del área bajo la curva ROC que no superaron 0,050) y en algunos casos virtualmente inexistentes (como en el periodo intermedio en la corte de validación). En ese sentido, es preciso destacar que los parámetros inmunológicos monitorizados presentan limitaciones intrínsecas entre las que destacan su naturaleza estrictamente cuantitativa y la relativa falta de especificidad. La presencia de niveles séricos disminuidos de inmunoglobulinas o de factores de complemento, por ejemplo, podría traducir simplemente una peor situación nutricional del paciente y/o un estado pro-inflamatorio subyacente, como se describe en pacientes en hemodiálisis (el denominado síndrome de malnutrición-inflamación-ateroesclerosis [22]). Hay que señalar, no obstante, que en todos los modelos se realizó un ajuste por los niveles séricos de albúmina en los meses 1 y 6. Se podría valorar, en fin, la incorporación de algún biomarcador funcional sin especificidad antigénica a la estrategia propuesta de monitorización inmunológica. Este refinamiento metodológico se puede ver favorecido por la existencia de tests comerciales, como la cuantificación de los niveles intralinfocitarios de adenosín trifosfato tras el estímulo con fitohemaglutinina (ImmuKnow®, Cylex, Columbia, MD, EEUU) [173] o el más reciente ensayo basado en ELISA que determina la liberación de interferón- γ en sangre completa tras el estímulo con un anticuerpo anti-CD3 y un agonista de los *toll-like receptors* (receptores tipo *toll*) (QuantIFERON-Monitor®, Qiagen, Hilden, Alemania) [174].

La predicción de un evento de etiopatogenia tan compleja como es la infección post-trasplante conlleva, necesariamente, dificultades tanto metodológicas como prácticas. En nuestro conocimiento la literatura sólo recoge un intento previo de generar un modelo predictivo basado en parámetros inmunológicos, que fue diseñado específicamente para receptores de trasplante cardíaco [175]. A diferencia de nuestro estudio, dicho modelo fue calculado únicamente en un punto (día 7 post-trasplante), no se indica una medida de su capacidad de discriminación (área bajo la curva ROC), y carece hasta la fecha de validación en una cohorte independiente. Por otra, no incluye variables clínicas.

A la vista de nuestros resultados, proponemos priorizar el empleo de los modelos combinados para la predicción (**Tabla 42**) de infección en el periodo intermedio (mes a 1 a 6), considerando su superior capacidad de discriminación y de estratificación respecto a los modelos centrados en eventos tardíos. Si el objetivo del clínico es identificar en el día 30 a un subgrupo de pacientes con riesgo notable (≈ 40 -

60%) de infección a lo largo de los meses siguientes se deberían aplicar puntos de corte relativamente altos (>4 puntos para infección global y >6,5 puntos para infección bacteriana), que exhiben buen VPP. Así se podría plantear disminuir los niveles de los fármacos inmunosupresores, prolongar la duración de la profilaxis antimicrobiana, o intensificar el seguimiento clínico (e.g., frecuencia de monitorización de la viremia por CMV). Si por el contrario lo que se pretende es identificar a aquellos pacientes con un riesgo muy bajo (\approx 10-20%) de infección, a fin de suspender precozmente la profilaxis o disminuir la frecuencia de seguimiento, sugerimos emplear puntos de corte más bajos (correspondientes a los primeros cuartiles o terciles de cada modelo) que ofrecen excelentes valores de sensibilidad y VPN. En cualquier caso, esta propuesta de individualización deberá ser validada en un estudio prospectivo de intervención, idealmente controlado mediante un grupo concurrente sometido al seguimiento convencional.

Tabla 42. Resumen de los modelos combinados (clínicos e inmunológicos) de predicción.

Periodo intermedio		Periodo tardío	
Infección global		Infección global	
Edad del receptor \geq 63 años	4 puntos	Enfermedad aterotrombótica	3 puntos
Reintervención en el primer mes	3 puntos	Rechazo agudo previo	2 puntos
FEG (por cada 10 mL/min)	-0,3 puntos	Linfocitos NK <232 céls/mcL	6 puntos
Linfocitos T CD4+ <30 céls/mcL	3 puntos	C3 <103 mg/dL	2 puntos
linfocitos B <110 céls/mcL	2 puntos		
IgA <115 mg/dL	3 puntos		
C3 <76 mg/dL	2 puntos		
Infección bacteriana		Infección bacteriana	
Edad del receptor \geq 65 años	3 puntos	Infección por VHC	3 puntos
Retraso en la función del injerto	2 puntos	Rechazo agudo previo	3 puntos
Infección bacteriana previa	4 puntos	C3 <103 mg/dL	3 puntos
Linfocitos NK <68 céls/mcL	2 puntos		
IgG <500 mg/dL	3 puntos		

FGE: filtrado glomerular estimado; NK: *natural killer* (asesino natural); VHC: virus de la hepatitis C.

9. COROLARIO

1. La monitorización en los meses 1 y 6 post-trasplante de ciertos parámetros inmunológicos sin especificidad por patógeno (recuento de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y niveles séricos de inmunoglobulinas y de factores de complemento) es útil para caracterizar el riesgo de infección, tanto global como bacteriana, a lo largo de los siguientes meses en receptores de TR.
2. Estos parámetros inmunológicos, ampliamente disponibles en la práctica habitual, son susceptibles de ser incorporados, junto con variables de naturaleza clínica, en modelos combinados de predicción específicos para cada periodo post-trasplante y tipo de infección considerados.
3. El modelo de predicción de infección global durante el periodo post-trasplante intermedio (meses 1 a 6) se basó en los siguientes parámetros: edad del receptor ≥ 63 años (4 puntos), reintervención en el primer mes (3 puntos), función del injerto (-0,3 puntos por cada intervalo de 10 mL/min en el FGe), recuento de linfocitos T CD4⁺ <30 céls/mcL (3 puntos), recuento de linfocitos B <110 céls/mcL (2 puntos), nivel de IgA <115 mg/dL (3 puntos) y nivel de C3 <76 mg/dL (2 puntos).
4. El modelo de predicción de infección bacteriana durante el periodo intermedio consistió, por su parte, en los siguientes parámetros: edad del receptor ≥ 65 años (3 puntos), retraso en la función del injerto (2 puntos), infección bacteriana previa (4 puntos), recuento de linfocitos NK <68 céls/mcL (2 puntos) y nivel de IgG <500 mg/dL (3 puntos).
5. El modelo de predicción de infección global durante el periodo post-trasplante tardío (a partir del mes 6) incluyó los siguientes parámetros: enfermedad aterotrombótica pre-trasplante (3 puntos), rechazo agudo del injerto en los meses previos (2 puntos), recuento de linfocitos NK <232 céls/mcL (6 puntos) y nivel C3 <103 mg/dL (2 puntos).
6. El modelo de predicción de infección bacteriana durante el periodo tardío estuvo constituido por los siguientes parámetros: infección por VHC (3 puntos), rechazo agudo del injerto en los meses previos (3 puntos) y nivel de C3 <103 mg/dL (3 puntos).
7. La capacidad de discriminación de estos modelos es superior a la obtenida a partir de variables exclusivamente clínicas, particularmente en la predicción de infección entre el primer y el sexto mes. La estratificación de la población expuesta por cuartiles o terciles permite establecer un gradiente progresivo en el riesgo de infección. En cuanto a su exactitud diagnóstica, el empleo de

puntos de corte bajos (que seleccionen al Q1 o al T1) se acompaña de una excelente sensibilidad y VPN, y permite por tanto delimitar a un subgrupo de receptores con riesgo mínimo de infección post-trasplante. La optimización del punto de corte (mejor combinación de sensibilidad y especificidad), por su parte, arroja un elevado VPP que identifica a un subgrupo de receptores con riesgo elevado de dicha complicación.

8. El valor incremental de cada uno de estos modelos fue elevado (aumento mínimo del 87% en el riesgo de infección post-trasplante por cada incremento en un cuartil o en un tercil) y se mantuvo tras el ajuste multivariante por potenciales factores de confusión, así como en un conjunto de análisis de sensibilidad circunscritos a subpoblaciones específicas de receptores.
9. La reproducibilidad y calibración de los modelos fueron buenas, sin que se observaran diferencias significativas entre las cohortes de derivación y de validación en su capacidad de discriminación ni en la incidencia de infección dentro de cada cuartil o tercil del modelo correspondiente.

10. CONCLUSIÓN

La monitorización de una serie de parámetros inmunológicos sin especificidad por patógeno (recuento de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y niveles séricos de inmunoglobulinas y de factores de complemento) predice el desarrollo de complicaciones infecciosas tras el TR. En combinación con ciertas variables clínicas, dichos parámetros han sido integrados en un conjunto de modelos de predicción específicos para cada periodo post-trasplante y tipo de infección que muestran elevada capacidad de discriminación, exactitud diagnóstica, reproducibilidad y calibración (particularmente en el periodo comprendido entre el primer y el sexto mes). Gracias a su simplicidad y rendimiento, estos modelos se podrían aplicar en la práctica clínica para individualizar el seguimiento, ajuste de inmunosupresión y abordaje preventivo de los receptores de TR.

11. REFERENCIAS

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725-1730.
2. Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, et al. A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int* 1996; 50: 235-242.
3. Womer KL, Kaplan B. Recent developments in kidney transplantation--a critical assessment. *Am J Transplant* 2009; 9: 1265-1271.
4. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357: 2562-2575.
5. Ojo AO, Morales JM, Gonzalez-Molina M, Steffick DE, Luan FL, Merion RM, et al. Comparison of the long-term outcomes of kidney transplantation: USA versus Spain. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 213-220.
6. Hernandez D, Moreso F. Has patient survival following renal transplantation improved in the era of modern immunosuppression? *Nefrologia* 2013; 33: 171-180.
7. Ravaioli M, Neri F, Lazzarotto T, Bertuzzo VR, Di Gioia P, Stacchini G, et al. Immunosuppression Modifications Based on an Immune Response Assay: Results of a Randomized, Controlled Trial. *Transplantation* 2015; 99: 1625-1632.
8. Fernandez-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology* 2014; 3: e12.
9. Fleming JN, Weimert NA. Novel strategies for immune monitoring in kidney transplant recipients. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; 17: e63-77.
10. Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 341-358.
11. Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen JR, Kaplan B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes. *Transpl Immunol* 2014; 31: 22-32.
12. van der Zwan M, Baan CC, van Gelder T, Hesselink DA. Review of the Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Alemtuzumab and Its Use in Kidney Transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2017.
13. Ge S, Karasyov A, Sinha A, Petrosyan A, Lovato D, Thomas DL, et al. Cytomegalovirus Immunity After Alemtuzumab Induction in Desensitized Kidney Transplant Patients. *Transplantation* 2017; 101: 1720-1726.
14. Webster AC, Wu S, Tallapragada K, Park MY, Chapman JR, Carr SJ. Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 7: CD004756.
15. Sester M, Leboeuf C, Schmidt T, Hirsch HH. The "ABC" of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant* 2016; 16: 1697-1706.

16. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 1678-1689.
17. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 817-824.
18. Salem Fourati I, Grenier AJ, Jolette E, Merindol N, Ovetchkine P, Soudeyns H. Development of an IFN-gamma ELISpot assay to assess varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity following umbilical cord blood transplantation. *J Vis Exp* 2014.
19. van der Heiden PL, de Boer R, van der Steen DM, Kester MG, van der Hoorn MW, Haarman WM, et al. Identification of varicella-zoster virus-specific CD8 T cells in patients after T-cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *J Virol* 2009; 83: 7361-7364.
20. Leboeuf C, Wilk S, Achermann R, Binet I, Golshayan D, Hadaya K, et al. BK Polyomavirus-Specific 9mer CD8 T Cell Responses Correlate With Clearance of BK Viremia in Kidney Transplant Recipients: First Report From the Swiss Transplant Cohort Study. *Am J Transplant* 2017; 17: 2591-2600.
21. Kaveri S. Advances in the treatment of primary and secondary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13 Suppl 2: S51-52.
22. Mawhorter S, Yamani MH. Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 581-585.
23. Keven K, Sahin M, Kutlay S, Sengul S, Erturk S, Ersoz S, et al. Immunoglobulin deficiency in kidney allograft recipients: comparative effects of mycophenolate mofetil and azathioprine. *Transpl Infect Dis* 2003; 5: 181-186.
24. Ganschow R, Lyons M, Kemper MJ, Burdelski M. B-cell dysfunction and depletion using mycophenolate mofetil in a pediatric combined liver and kidney graft recipient. *Pediatr Transplant* 2001; 5: 60-63.
25. Yip NH, Lederer DJ, Kawut SM, Wilt JS, D'Ovidio F, Wang Y, et al. Immunoglobulin G levels before and after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 917-921.
26. Corales R, Chua J, Mawhorter S, Young JB, Starling R, Tomford JW, et al. Significant post-transplant hypogammaglobulinemia in six heart transplant recipients: an emerging clinical phenomenon? *Transpl Infect Dis* 2000; 2: 133-139.
27. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, Varela-Pena P, Lora-Pablos D, Garcia-Reyne A, Gonzalez E, et al. Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant* 2012; 12: 2763-2773.
28. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Schmidt CM, Sandkovsky U. What is the impact of hypogammaglobulinemia on the rate of infections and survival in solid organ transplantation? A meta-analysis. *Am J Transplant* 2013; 13: 2601-2610.
29. Wieneke H, Otte B, Lang D, Heidenreich S. Predictive value of IgG subclass levels for infectious complications in renal transplant recipients. *Clin Nephrol* 1996; 45: 22-28.

30. Yamani MH, Avery RK, Mawhorter SD, Young JB, Ratliff NB, Hobbs RE, et al. Hypogammaglobulinemia following cardiac transplantation: a link between rejection and infection. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 425-430.
31. Doron S, Ruthazer R, Werner BG, Rabson A, Snyderman DR. Hypogammaglobulinemia in liver transplant recipients: incidence, timing, risk factors, and outcomes. *Transplantation* 2006; 81: 697-703.
32. Broeders EN, Wissing KM, Hazzan M, Ghisdal L, Hoang AD, Noel C, et al. Evolution of immunoglobulin and mannose binding protein levels after renal transplantation: association with infectious complications. *Transpl Int* 2008; 21: 57-64.
33. Farmer DG, Kattan OM, Wozniak LJ, Marcus E, Ponthieux S, Hwang V, et al. Incidence, timing, and significance of early hypogammaglobulinemia after intestinal transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 1154-1159.
34. Yoshizumi T, Shirabe K, Ikegami T, Yamashita N, Mano Y, Yoshiya S, et al. Decreased immunoglobulin G levels after living-donor liver transplantation is a risk factor for bacterial infection and sepsis. *Transpl Infect Dis* 2014; 16: 225-231.
35. Wood P. Primary antibody deficiency syndromes. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 99-108.
36. Origen J, Fernandez-Ruiz M, Lumberras C, Orellana MA, Lopez-Medrano F, Ruiz-Merlo T, et al. Potential role of post-transplant hypogammaglobulinemia in the risk of *Clostridium difficile* infection after kidney transplantation: a case-control study. *Infection* 2015; 43: 413-422.
37. Munoz P, Palomo J, Yanez J, Bouza E. Clinical microbiological case: a heart transplant recipient with diarrhea and abdominal pain. Recurring *C. difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 451-452, 458-459.
38. Munoz P, Giannella M, Alcalá L, Sarmiento E, Fernandez Yanez J, Palomo J, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer? *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 907-914.
39. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 76-98, Table of Contents.
40. Lass-Flörl C, Roilides E, Löffler J, Wilflingseder D, Romani L. Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* 2013; 56: 403-413.
41. Avery RK, Blumberg EA. Hypogammaglobulinemia: time to reevaluate? *Am J Transplant* 2013; 13: 2517-2518.
42. Aguilar C, Malphettes M, Donadieu J, Chandesris O, Coignard-Biehler H, Catherinot E, et al. Prevention of infections during primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 1462-1470.
43. Carbone J, Sarmiento E, Del Pozo N, Rodriguez-Molina JJ, Navarro J, Fernandez-Yanez J, et al. Restoration of humoral immunity after intravenous immunoglobulin replacement therapy in heart recipients with post-transplant antibody deficiency and severe infections. *Clin Transplant* 2012; 26: E277-283.

44. Carbone J, Palomo J, Fernandez-Yanez J, Sarmiento E. Subcutaneous immunoglobulin replacement therapy in a heart transplant recipient with severe recurrent infections. *Heart Lung Vessel* 2015; 7: 256-259.
45. Claustre J, Quetant S, Camara B, France M, Schummer G, Bedouch P, et al. Nonspecific immunoglobulin replacement in lung transplantation recipients with hypogammaglobulinemia: a cohort study taking into account propensity score and immortal time bias. *Transplantation* 2015; 99: 444-450.
46. Lederer DJ, Philip N, Rybak D, Arcasoy SM, Kawut SM. Intravenous immunoglobulin for hypogammaglobulinemia after lung transplantation: a randomized crossover trial. *PLoS One* 2014; 9: e103908.
47. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Grant W, Morris MC, Schmidt CM, et al. Does increasing immunoglobulin levels impact survival in solid organ transplant recipients with hypogammaglobulinemia? *Clin Transplant* 2014; 28: 1249-1255.
48. Bonilla FA. Adverse effects of immunoglobulin G therapy: thromboembolism and haemolysis. *Clin Exp Immunol* 2014; 178 Suppl 1: 72-74.
49. Ramirez E, Romero-Garrido JA, Lopez-Granados E, Borobia AM, Perez T, Medrano N, et al. Symptomatic thromboembolic events in patients treated with intravenous-immunoglobulins: results from a retrospective cohort study. *Thromb Res* 2014; 133: 1045-1051.
50. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 2011; 17: 317-329.
51. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* 2015; 6: 257.
52. Takada A, Imamura Y, Takada Y. Relationships between the haemolytic activities of the human complement system and complement components. *Clin Exp Immunol* 1979; 35: 324-328.
53. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002; 56: 630-641.
54. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 2009; 230: 9-21.
55. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006; 7: 85-94.
56. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, Varela-Pena P, Morales JM, Garcia-Reyne A, San Juan R, et al. Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant* 2013; 13: 685-694.
57. Sarmiento E, del Pozo N, Gallego A, Fernandez-Yanez J, Palomo J, Villa A, et al. Decreased levels of serum complement C3 and natural killer cells add to the predictive value of total immunoglobulin G for severe infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 526-539.

58. Carbone J, Micheloud D, Salcedo M, Rincon D, Banares R, Clemente G, et al. Humoral and cellular immune monitoring might be useful to identify liver transplant recipients at risk for development of infection. *Transpl Infect Dis* 2008; 10: 396-402.
59. Asgari E, Zhou W, Sacks S. Complement in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 486-491.
60. Manuel O, Tarr PE, Venetz JP, Trendelenburg M, Meylan PR, Pascual M. Meningococcal disease in a kidney transplant recipient with mannose-binding lectin deficiency. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 214-218.
61. Verschuren JJ, Roos A, Schaapherder AF, Mallat MJ, Daha MR, de Fijter JW, et al. Infectious complications after simultaneous pancreas-kidney transplantation: a role for the lectin pathway of complement activation. *Transplantation* 2008; 85: 75-80.
62. Bouwman LH, Roos A, Terpstra OT, de Knijff P, van Hoek B, Verspaget HW, et al. Mannose binding lectin gene polymorphisms confer a major risk for severe infections after liver transplantation. *Gastroenterology* 2005; 129: 408-414.
63. Cervera C, Balderramo D, Suarez B, Prieto J, Fuster F, Linares L, et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1217-1224.
64. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, Meylan PR. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 83: 359-362.
65. de Rooij BJ, van der Beek MT, van Hoek B, Vossen AC, Rogier Ten Hove W, Roos A, et al. Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol* 2011; 55: 800-807.
66. Kwakkel-van Erp JM, Paantjens AW, van Kessel DA, Grutters JC, van den Bosch JM, van de Graaf EA, et al. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (CMV) reactivation and survival in lung transplantation. *Clin Exp Immunol* 2011; 165: 410-416.
67. Sagedal S, Thiel S, Hansen TK, Mollnes TE, Rollag H, Hartmann A. Impact of the complement lectin pathway on cytomegalovirus disease early after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 4054-4060.
68. Liman P, Babel N, Schachtner T, Unterwalder N, Konig J, Hofmann J, et al. Mannose-binding lectin deficiency is not associated with increased risk for polyomavirus nephropathy. *Transpl Immunol* 2012; 26: 123-127.
69. Masur H, Brooks JT, Benson CA, Holmes KK, Pau AK, Kaplan JE, et al. Prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Updated Guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 1308-1311.
70. Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, Shaw PA, Chaitt D, Baseler MW, et al. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood* 2008; 112: 287-294.

71. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007; 21: 1387-1394.
72. Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, Peggs KS, Kyriakou C, Goldstone AH, et al. Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications. *Blood* 2003; 102: 404-406.
73. Issa NC, Fishman JA. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 772-786.
74. Kalil AC, Florescu MC, Grant W, Miles C, Morris M, Stevens RB, et al. Risk of serious opportunistic infections after solid organ transplantation: interleukin-2 receptor antagonists versus polyclonal antibodies. A meta-analysis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12: 881-896.
75. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96: 333-360.
76. de la Torre-Cisneros J, Farinas MC, Caston JJ, Aguado JM, Cantisan S, Carratala J, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 735-758.
77. Baden LR, Bensinger W, Angarone M, Casper C, Dubberke ER, Freifeld AG, et al. Prevention and treatment of cancer-related infections. *J Natl Compr Canc Netw* 2012; 10: 1412-1445.
78. De Castro N, Xu F, Porcher R, Pavie J, Molina JM, Peraldi MN. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients occurring after discontinuation of prophylaxis: a case-control study. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1375-1377.
79. Struijk GH, Gijzen AF, Yong SL, Zwinderman AH, Geerlings SE, Lettinga KD, et al. Risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients long after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3391-3398.
80. Brunot V, Pernin V, Chartier C, Garrigue V, Vetromile F, Szwarc I, et al. An epidemic of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a renal transplantation center: role of T-cell lymphopenia. *Transplant Proc* 2012; 44: 2818-2820.
81. Iriart X, Challan Belval T, Fillaux J, Esposito L, Lavergne RA, Cardeau-Desangles I, et al. Risk factors of *Pneumocystis pneumonia* in solid organ recipients in the era of the common use of posttransplantation prophylaxis. *Am J Transplant* 2015; 15: 190-199.
82. Borstnar S, Lindic J, Tomazic J, Kandus A, Pikelj A, Prah J, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients: a national center experience. *Transplant Proc* 2013; 45: 1614-1617.
83. Perez-Ordone L, Hoyo I, Sanclemente G, Ricart MJ, Cofan F, Perez-Villa F, et al. Late-onset *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2014; 16: 324-328.

84. Carter JT, Melcher ML, Carlson LL, Roland ME, Stock PG. Thymoglobulin-associated Cd4+ T-cell depletion and infection risk in HIV-infected renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 753-760.
85. Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, Chiesa A, Comolli G, Sarchi E, et al. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation* 2012; 93: 112-119.
86. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, Allende LM, Andres A, Garcia-Reyne A, Lumbreras C, et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; 27: 674-685.
87. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, San Juan R, Allende LM, Paz-Artal E, Aguado JM. Low Natural Cell Counts and Risk of Invasive Fungal Disease After Solid Organ Transplantation. *J Infect Dis* 2015.
88. Ducloux D, Carron PL, Rebibou JM, Aubin F, Fournier V, Bresson-Vautrin C, et al. CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1270-1272.
89. Ducloux D, Carron PL, Motte G, Ab A, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, et al. Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2002; 15: 393-396.
90. Thibaudin D, Alamartine E, Mariat C, Absi L, Berthoux F. Long-term kinetic of T-lymphocyte subsets in kidney-transplant recipients: influence of anti-T-cell antibodies and association with posttransplant malignancies. *Transplantation* 2005; 80: 1514-1517.
91. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, Allende LM, Andres A, Paz-Artal E, Aguado JM. Assessing the risk of de novo malignancy in kidney transplant recipients: role for monitoring of peripheral blood lymphocyte populations. *Transplantation* 2014; 98: e36-37.
92. Smith CA, Gruss HJ, Davis T, Anderson D, Farrah T, Baker E, et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 1993; 73: 1349-1360.
93. Falini B, Stein H, Pileri S, Canino S, Farabbi R, Martelli MF, et al. Expression of lymphoid-associated antigens on Hodgkin's and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. An immunocytochemical study on lymph node cytopins using monoclonal antibodies. *Histopathology* 1987; 11: 1229-1242.
94. Schlaf G, Altermann WW, Rothhoff A, Seliger B. Soluble CD30 serum level--an adequate marker for allograft rejection of solid organs? *Histol Histopathol* 2007; 22: 1269-1279.
95. Pellegrini P, Totaro R, Contasta I, Berghella AM, Carolei A, Adorno D. CD30 antigen and multiple sclerosis: CD30, an important costimulatory molecule and marker of a regulatory subpopulation of dendritic cells, is involved in the maintenance of the physiological balance between TH1/TH2 immune responses and tolerance. The role of IFNbeta-1a in the treatment of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 2005; 12: 220-234.

96. Rossi FM, Degan M, Mazzocut-Zecchin L, Di Francia R, Aldinucci D, Pinto A, et al. CD30L up-regulates CD30 and IL-4 expression by T cells. *FEBS Lett* 2001; 508: 418-422.
97. Harlin H, Podack E, Boothby M, Alegre ML. TCR-independent CD30 signaling selectively induces IL-13 production via a TNF receptor-associated factor/p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 169: 2451-2459.
98. Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, et al. CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 2000; 165: 6703-6709.
99. Saini D, Ramachandran S, Nataraju A, Benschoff N, Liu W, Desai N, et al. Activated effector and memory T cells contribute to circulating sCD30: potential marker for islet allograft rejection. *Am J Transplant* 2008; 8: 1798-1808.
100. Chen Y, Tai Q, Hong S, Kong Y, Shang Y, Liang W, et al. Pretransplantation soluble CD30 level as a predictor of acute rejection in kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplantation* 2012; 94: 911-918.
101. Pelzl S, Opelz G, Daniel V, Wiesel M, Susal C. Evaluation of posttransplantation soluble CD30 for diagnosis of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2003; 75: 421-423.
102. Susal C, Pelzl S, Dohler B, Opelz G. Identification of highly responsive kidney transplant recipients using pretransplant soluble CD30. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1650-1656.
103. Grenzi PC, Campos EF, Silva HT, Jr., Felipe CR, Franco MF, Soares MF, et al. Post-transplant soluble CD30 levels are associated with early subclinical rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2015; 32: 61-65.
104. Wang D, Wu W, Yang S, Wang Q, Tan J. Post-transplant monitoring of soluble CD30 level as predictor of graft outcome: a single center experience from China. *Transpl Immunol* 2012; 27: 146-150.
105. Susal C, Pelzl S, Opelz G. Strong human leukocyte antigen matching effect in nonsensitized kidney recipients with high pretransplant soluble CD30. *Transplantation* 2003; 76: 1231-1232.
106. Rajakariar R, Jivanji N, Varagunam M, Rafiq M, Gupta A, Sheaff M, et al. High pre-transplant soluble CD30 levels are predictive of the grade of rejection. *Am J Transplant* 2005; 5: 1922-1925.
107. Wang D, Wu WZ, Chen JH, Yang SL, Wang QH, Zeng ZX, et al. Pre-transplant soluble CD30 level as a predictor of not only acute rejection and graft loss but pneumonia in renal transplant recipients. *Transpl Immunol* 2010; 22: 115-120.
108. Nikaein A, Spiridon C, Hunt J, Rosenthal J, Anderson A, Eichhorn E, et al. Pre-transplant level of soluble CD30 is associated with infection after heart transplantation. *Clin Transplant* 2007; 21: 744-747.
109. Spiridon C, Nikaein A, Lerman M, Hunt J, Dickerman R, Mack M. CD30, a marker to detect the high-risk kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 2008; 22: 765-769.
110. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; 343: 481-492.
111. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini A, Comoli P, et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 613-619.

112. Doesch AO, Konstandin M, Celik S, Kristen A, Frankenstein L, Sack FU, et al. Epstein-Barr virus load in whole blood is associated with immunosuppression, but not with post-transplant lymphoproliferative disease in stable adult heart transplant patients. *Transpl Int* 2008; 21: 963-971.
113. Bakker NA, Verschuuren EA, Erasmus ME, Hepkema BG, Veeger NJ, Kallenberg CG, et al. Epstein-Barr virus-DNA load monitoring late after lung transplantation: a surrogate marker of the degree of immunosuppression and a safe guide to reduce immunosuppression. *Transplantation* 2007; 83: 433-438.
114. Snow AL, Martinez OM. Epstein-Barr virus: evasive maneuvers in the development of PTLD. *Am J Transplant* 2007; 7: 271-277.
115. Ahya VN, Douglas LP, Andreadis C, Arnoldi S, Svoboda J, Kotloff RM, et al. Association between elevated whole blood Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA EBV polymerase chain reaction and reduced incidence of acute lung allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 839-844.
116. San-Juan R, De Dios B, Navarro D, Garcia-Reyne A, Lumbreras C, Bravo D, et al. Epstein-Barr virus DNAemia is an early surrogate marker of the net state of immunosuppression in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2013; 95: 688-693.
117. Bamoulid J, Courivaud C, Coaquette A, Chalopin JM, Gaiffe E, Saas P, et al. Subclinical Epstein-Barr virus viremia among adult renal transplant recipients: incidence and consequences. *Am J Transplant* 2013; 13: 656-662.
118. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 331: 1-20.
119. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97.
120. Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 2000; 145: 979-993.
121. Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, et al. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* 2001; 64: 190-194.
122. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, et al. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998; 352: 191-195.
123. Feyzioglu B, Teke T, Ozdemir M, Karaibrahimoglu A, Dogan M, Yavsan M. The presence of Torque teno virus in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7: 3461-3466.
124. Zhong S, Yeo W, Tang MW, Lin XR, Mo F, Ho WM, et al. Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 84-92.
125. Gallian P, Berland Y, Olmer M, Raccach D, de Micco P, Biagini P, et al. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2538-2542.

126. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* 2001; 15: 563-570.
127. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol* 2015; 96: 115-117.
128. Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, Patey N, Brassard J, Alvarez F, et al. Torque Teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis* 2014; 209: 247-254.
129. Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J Infect Dis* 2014; 210: 667-668.
130. Gorzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33: 320-323.
131. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24: 273-283.
132. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, Romo EM, Allende LM, Meneu JC, Fundora-Suarez Y, et al. Pretransplant lymphocyte count predicts the incidence of infection during the first two years after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1209-1216.
133. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, San Juan R, Allende LM, Paz-Artal E, Aguado JM. Low Natural Killer Cell Counts and Onset of Invasive Fungal Disease After Solid Organ Transplantation. *J Infect Dis* 2016; 213: 873-874.
134. Lopez-Medrano F, Cordero E, Gavalda J, Cruzado JM, Marcos MA, Perez-Romero P, et al. Management of influenza infection in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the Group for the Study of Infection in Transplant Recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31: 526 e521-526 e520.
135. Torre-Cisneros J, Doblaz A, Aguado JM, San Juan R, Blanes M, Montejo M, et al. Tuberculosis after solid-organ transplant: incidence, risk factors, and clinical characteristics in the RESITRA (Spanish Network of Infection in Transplantation) cohort. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1657-1665.
136. Aguado JM, Torre-Cisneros J, Fortun J, Benito N, Meije Y, Doblaz A, et al. Tuberculosis in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the group for the study of infection in transplant recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1276-1284.
137. Aguado JM, Silva JT, Fernandez-Ruiz M, Cordero E, Fortun J, Gudiol C, et al. Management of multidrug resistant Gram-negative bacilli infections in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplant Rev (Orlando)* 2018; 32: 36-57.
138. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357: 2601-2614.

139. Ruiz P BM, Tilahun H, Clarke T, Keyer L, Coxey A. BD Biosciences Application Note (Sept 2007). Productivity and efficiency of 6-color BD Multitest and BD Trucount technologies. Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=177422007> [último acceso: 20 de Diciembre de 2016].
140. Torre-Cisneros J, Aguado JM, Caston JJ, Almenar L, Alonso A, Cantisan S, et al. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplant Rev (Orlando)* 2016; 30: 119-143.
141. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1-45.
142. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT, European Society of Clinical M, Infectious D. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 1067-1079.
143. Humar A, Michaels M; AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 262-274.
144. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-470.
145. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813-1821.
146. Fiorante S, Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, Lizasoain M, Lalueza A, Morales JM, et al. Acute graft pyelonephritis in renal transplant recipients: incidence, risk factors and long-term outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 1065-1073.
147. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017; 17: 28-41.
148. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014; 14: 272-283.
149. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950; 3: 32-35.
150. Concato J, Peduzzi P, Holford TR, Feinstein AR. Importance of events per independent variable in proportional hazards analysis. I. Background, goals, and general strategy. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1495-1501.
151. Neuhaus JM, Segal MR. Design effects for binary regression models fitted to dependent data. *Stat Med* 1993; 12: 1259-1268.

152. Hosmer DW, Hosmer T, Le Cessie S, Lemeshow S. A comparison of goodness-of-fit tests for the logistic regression model. *Stat Med* 1997; 16: 965-980.
153. McNeil BJ, Hanley JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Med Decis Making* 1984; 4: 137-150.
154. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Boso V, Reig J, Poveda JL, et al. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J* 2015; 15: 38-48.
155. Garrido RS, Aguado JM, Diaz-Pedroche C, Len O, Montejo M, Moreno A, et al. A review of critical periods for opportunistic infection in the new transplantation era. *Transplantation* 2006; 82: 1457-1462.
156. Ramos A, Asensio A, Munez E, Torre-Cisneros J, Montejo M, Aguado JM, et al. Incisional surgical site infection in kidney transplantation. *Urology* 2008; 72: 119-123.
157. Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol* 1999; 90: 213-219.
158. Cantisan S, Torre-Cisneros J, Lara R, Zarraga S, Montejo M, Solana R. Impact of cytomegalovirus on early immunosenescence of CD8+ T lymphocytes after solid organ transplantation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68: 1-5.
159. Valenzuela NM, Schaub S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation* 2018; 102: S7-S13.
160. Fernandez-Ruiz M, Lopez-Medrano F, San-Juan R, Aguado JM. Post-transplant hypogammaglobulinemia and risk of infection after kidney transplantation: Magnitude matters. *Transpl Infect Dis* 2017; 19.
161. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465.
162. Fernandez-Ruiz M, Silva JT, Lopez-Medrano F, Allende LM, San Juan R, Cambra F, et al. Post-transplant monitoring of NK cell counts as a simple approach to predict the occurrence of opportunistic infection in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2016; 18: 552-565.
163. Fernandez-Ruiz M, Origuen J, Lora D, Lopez-Medrano F, Gonzalez E, Polanco N, et al. Herpes zoster in kidney transplant recipients: protective effect of anti-cytomegalovirus prophylaxis and natural killer cell count. A single-center cohort study. *Transpl Int* 2018; 31: 187-197.
164. Steyerberg EW, Van Calster B, Pencina MJ. [Performance measures for prediction models and markers: evaluation of predictions and classifications]. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 788-794.
165. Hellmich M, Abrams KR, Sutton AJ. Bayesian approaches to meta-analysis of ROC curves. *Med Decis Making* 1999; 19: 252-264.
166. Xie D, Yang W, Jepson C, Roy J, Hsu JY, Shou H, et al. Statistical Methods for Modeling Time-Updated Exposures in Cohort Studies of Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12: 1892-1899.

167. Herrero-Martinez JM, Lumbreras C, Manrique A, San-Juan R, Garcia-Reyne A, Lopez-Medrano F, et al. Epidemiology, risk factors and impact on long-term pancreatic function of infection following pancreas-kidney transplantation. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 1132-1139.
168. Rao KV, Ma J. Chronic viral hepatitis enhances the risk of infection but not acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 62: 1765-1769.
169. Pedroso S, Martins L, Fonseca I, Dias L, Henriques AC, Sarmiento AM, et al. Impact of hepatitis C virus on renal transplantation: association with poor survival. *Transplant Proc* 2006; 38: 1890-1894.
170. Lopez-Medrano F, Fernandez-Ruiz M, Morales JM, San-Juan R, Cervera C, Carratala J, et al. Impact of hepatitis C virus infection on the risk of infectious complications after kidney transplantation: data from the RESITRA/REIPI cohort. *Transplantation* 2011; 92: 543-549.
171. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 1996; 15: 361-387.
172. Steyerberg EW, Harrell FE, Jr., Borsboom GJ, Eijkemans MJ, Vergouwe Y, Habbema JD. Internal validation of predictive models: efficiency of some procedures for logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol* 2001; 54: 774-781.
173. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 2006; 82: 663-668.
174. Mian M, Natori Y, Ferreira V, Selzner N, Husain S, Singer L, et al. Evaluation of a Novel Global Immunity Assay to Predict Infection in Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2017.
175. Sarmiento E, Navarro J, Fernandez-Yanez J, Palomo J, Munoz P, Carbone J. Evaluation of an immunological score to assess the risk of severe infection in heart recipients. *Transpl Infect Dis* 2014; 16: 802-812.

12. ANEXOS

- **Anexo 1.** Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Lora-Pablos D, García-Reyne A, González E, Morales JM, San Juan R, Lumbreras C, Paz-Artal E, Andrés A, Aguado JM. Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant* 2012;12:2763-73.
- **Anexo 2.** Origüen J, Fernández-Ruiz M, Lumbreras C, Orellana MÁ, López-Medrano F, Ruiz-Merlo T, San Juan R, García-Reyne A, González E, Polanco N, Paz-Artal E, Andrés A, Aguado JM. Potential role of post-transplant hypogammaglobulinemia in the risk of *Clostridium difficile* infection after kidney transplantation: a case-control study. *Infection* 2015;43:413-22.
- **Anexo 3.** Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Morales JM, García-Reyne A, San Juan R, Lumbreras C, Lora-Pablos D, Polanco N, Andrés A, Paz-Artal E, Aguado JM. Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant* 2013;13:685-94.
- **Anexo 4.** Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, Andrés A, García-Reyne A, Lumbreras C, San-Juan R, Morales JM, Paz-Artal E, Aguado JM. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014;27:674-85.
- **Anexo 5.** Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, Andrés A, Paz-Artal E, Aguado JM. Assessing the risk of de novo malignancy in kidney transplant recipients: role for monitoring of peripheral blood lymphocyte populations. *Transplantation* 2014;98:e36-7.
- **Anexo 6.** Hoja de información al paciente y consentimiento informado.
- **Anexo 7.** Informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario "12 de Octubre" (código interno: 09/176), con fecha de 3 de Julio de 2009.

Anexo 1.

American Journal of Transplantation
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2012 The American Society of Transplantation
and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04192.x

Monitoring of Immunoglobulin Levels Identifies Kidney Transplant Recipients at High Risk of Infection

M. Fernández-Ruiz^{a,b,*}, F. López-Medrano^{a,b},
P. Varela-Peña^c, D. Lora-Pablos^{d,e},
A. García-Reyne^{a,b}, E. González^f, J. M. Morales^f,
R. San Juan^{a,b}, C. Lumbreras^{a,b}, E. Paz-Artal^c,
A. Andrés^f and J. M. Aguado^{a,b}

^aUnit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre"; Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^bSpanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI) ^cDepartment of Immunology, Hospital Universitario "12 de Octubre"; Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^dUnit of Clinical Research, Hospital Universitario "12 de Octubre"; Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^eCIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

^fDepartment of Nephrology, Hospital Universitario "12 de Octubre"; Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

*Corresponding author: Mario Fernández-Ruiz,
mario_fdezruiz@yahoo.es

This study was partially presented at the 50th Annual Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston (September 12–15, 2010) [poster K-1744], and the American Transplant Congress (ATC) 2011, Philadelphia (April 30–May 4, 2011) [poster P119].

We aimed to analyze the incidence, risk factors and impact of hypogammaglobulinemia (HGG) in 226 kidney transplant (KT) recipients in which serum immunoglobulin (Ig) levels were prospectively assessed at baseline, month 1 (T₁), and month 6 (T₆). The prevalence of IgG HGG increased from 6.6% (baseline) to 52.0% (T₁) and subsequently decreased to 31.4% (T₆) (p < 0.001). The presence of IgG HGG at baseline (odds ratio [OR] 26.9; p = 0.012) and a positive anti-HCV status (OR 0.17; p = 0.023) emerged as risk factors for the occurrence of posttransplant IgG HGG. Patients with HGG of any class at T₁ had higher incidences of overall (p = 0.018) and bacterial infection (p = 0.004), bacteremia (p = 0.054) and acute pyelonephritis (p = 0.003) in the intermediate period (months 1–6). Patients with HGG at T₆ had higher incidences of overall (p = 0.004) and bacterial infection (p < 0.001) in the late period

(>6 month). A complementary log–log model identified posttransplant HGG as an independent risk factor for overall (hazard ratio [HR] 2.03; p < 0.001) and bacterial infection (HR 2.68; p < 0.0001). Monitoring of humoral immunity identifies KT recipients at high risk of infection, offering the opportunity for preemptive immunoglobulin replacement therapy.

Key words: Humoral immunity, hypogammaglobulinemia, infection, kidney transplantation, outcome, risk factors

Abbreviations: AGPN, acute graft pyelonephritis; AR, acute graft rejection; ATG, antithymocyte globulin; CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; ESRD, end-stage renal disease; HCV, hepatitis C virus; HGG, hypogammaglobulinemia; HLA, human leukocyte antigen; HSV, herpes simplex virus; KT, kidney transplant; LRTI, lower respiratory tract infection; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease; MMF, mycophenolate mofetil; OR, odds ratio; SOT, solid-organ transplant; VVZ, varicella-zoster virus.

Received 09 February 2012, revised 11 June 2012 and accepted for publication 11 June 2012

Introduction

Despite the continuous improvements in immunosuppression and antimicrobial prophylaxis, infection remains a major source of morbidity and mortality among solid-organ transplant (SOT) recipients. Considerable effort has been devoted to the identification of biologic or clinical markers that may predict the occurrence of infectious events (1). It has been previously demonstrated the role of cellular immune monitoring in predicting infection after liver transplantation (2,3). Other authors have reported that the monitoring of humoral immunity, as assessed by the quantification of serum immunoglobulin levels at baseline and during the posttransplant period, may be useful in predicting clinical outcomes in liver (3,4), lung (5) and heart (6) transplantation. As a result of the deleterious impact of uremia on B cell differentiation and survival, patients with end-stage renal disease (ESRD) suffer from diffuse reduction of various B cell subpopulations, leading to an impaired humoral immune response (7,8). Additionally the immunosuppressive drugs required to prevent

Fernández-Ruiz et al.

allograft rejection contribute to the development of acquired hypogammaglobulinemia (HGG) in kidney transplant (KT) recipients (9–11). Only a few previous studies have evaluated the impact of humoral immune function on the risk of infection after KT (12–15). We undertook the present work to prospectively assess the incidence, timing, predisposing factors and clinical significance of HGG in KT recipients.

Materials and Methods

Study population

We conducted a prospective cohort study at the University Hospital "12 de Octubre" (Madrid, Spain), a 1360-bed, tertiary-care center where more than 2200 KT procedures have been performed in the last 30 years. From November 2008 to October 2010 all consecutive patients aged 18 years or older who underwent KT at our institution were included in a prospective immune status assessment, as detailed below. None of them was subjected to antiviral therapy at baseline. We also excluded patients with known pretransplant immunodeficiencies (i.e. common variable immunodeficiency), human immunodeficiency virus infection and those dying or developing graft loss within the first week after transplantation. In this study we analyzed only solitary KT recipients, thus excluding double-organ transplants. The local Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all participants.

Study design

The primary study outcome was the occurrence of at least one episode of infection during the posttransplant period. Asymptomatic bacteriuria and upper respiratory tract infections not requiring hospital admission were excluded from the analysis. A number of pretransplant, perioperative and posttransplant variables were prospectively recorded. The glomerular filtration rate was estimated using the Modification of Diet in Renal Disease (4-MDRD) equation (16). Liver function was assessed by measurement of serum levels of total bilirubin and albumin. Patients were enrolled at the time of transplantation and followed clinically for at least 1 year, unless they died before. We conventionally divided the posttransplant follow-up period in three intervals: early (first month), intermediate (months 1–6) and late (>6 months). Serum samples were collected just before transplantation (T_0) and at month 1 (T_1) and 6 (T_6). Serum immunoglobulin levels (IgG, IgA and IgM) were determined by nephelometry (Image-System, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). Normal ranges, as established by our laboratory, were as follows: IgG 700–1600 mg/dL; IgA 70–400 mg/dL; IgM 40–230 mg/dL.

Immunosuppression and prophylaxis regimens

Detailed descriptions of the induction therapies and maintenance immunosuppressive regimens used in the cohort, as well as the antibiotic and anticytomegalovirus (CMV) prophylaxis, are available in the Supporting Information that accompanies this paper.

Definitions

Hypogammaglobulinemia was defined as a decrease in serum immunoglobulin levels below the lower normal range given by our laboratory for each class, as detailed above. We analyzed the impact on the primary outcome of both "IgG HGG" and "HGG of any class" (defined by the presence of ≥ 1 immunoglobulin class below the respective lower normal values). We further assessed the role of IgG level by stratifying this variable in three categories (>700 mg/dL ["no HGG"]; 500–700 mg/dL ["moderate HGG"]; and <500 mg/dL ["severe HGG"]). Infectious syndromes and acute graft rejection (AR) were defined according to commonly accepted criteria (17–20). A detailed definition of different outcomes may be found in the Supporting Information.

Statistical analysis

The required sample size was estimated based on the Fleiss formula at 224 patients with the following assumptions: a prevalence of IgG HGG at T_1 of 45% (15); a cumulative incidence of infection at the end of the intermediate period of 55% and 35% in exposed and unexposed individuals, respectively; a confidence level of 95%; a statistical power of 80%; and a dropout rate of 15%. Quantitative data were shown as the mean \pm standard deviation (SD) or the median with interquartile ranges (Q_1 – Q_3). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies with 95% confidence intervals (95% CI). Categorical variables were compared using the χ^2 test, Fisher's exact test and McNemar test for repeated measures, as appropriate. Student's *t*-test or U Mann–Whitney test were applied for continuous variables. The paired Student's *t*-test or Wilcoxon rank sum test was used for comparisons within groups across different time points. Significant variables ($p < 0.05$) in the univariate analysis were introduced in a multivariate model based on backward stepwise logistic regression to identify independent predictors of IgG HGG at baseline. Predictors of IgG HGG during the posttransplant period were identified by means of a mixed-effects logistic regression model in order to take into account the within-subject correlation at different observation time points (T_1 and T_6). The intraclass correlation (ICC) represents the degree of association of the longitudinal data within subject, and specifically indicates the proportion of variance in the data attributable to individuals. A large ICC indicates that there is a large degree of homogeneity within subjects (21). Associations are given as odds ratios (ORs) with 95% CIs. Multivariate adjusted hazard ratios (HRs) were calculated by stepwise forward Cox proportional hazards models using overall and bacterial infection in each posttransplant period (intermediate and late) as the dependent variables, and those variables found to be significant at $p < 0.05$ by univariate analysis as covariates. We also built a complementary log–log discrete time hazards model using 1-month time intervals from transplantation (22). Patient survival curves were also estimated by the Kaplan–Meier product-limit method, and differences between groups were compared with the log-rank test. All the significance tests were two tailed. Statistical analysis was performed using SPSS v. 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA), STATA v. 10 (Stata Statistical Software, College Station, TX, USA) and EPIDAT v. 3.1 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain).

Results

Baseline characteristics

A total of 226 solitary KT recipients were included, whose demographics and clinical features are shown in Table 1. All of them had immune assessment performed at T_0 . Samples at T_1 were available in 200 patients (88.9% of those surviving beyond the first month), whereas samples at T_6 were available in 153 (73.9% of surviving receptors with a functional graft beyond the first 6 months). There were no significant differences with regard to posttransplant infection or outcome between patients with immune assessment at T_1 and T_6 , and those from whom no specimens could be obtained, except for the higher incidence of delayed graft function among the latter (data not shown).

Timing and risk factors for hypogammaglobulinemia

At baseline, 15 out of 226 patients (6.6%; 95% CI, 3.4–9.9%) had IgG HGG. Two of them simultaneously exhibited low IgA and IgM levels. Isolated IgA or IgM deficiency states were present in 3 and 11 additional patients, respectively. At the first month after KT (T_1), 94 patients had

Table 1: Demographic and clinical characteristics of the 226 patients included in the study

Variable	N	(%)
Age of recipient, years [mean ± SD]	54.1 ± 14.3	
Gender (male)	146	(64.6)
Pretransplant comorbidities		
Diabetes mellitus	56	(24.8)
Heart disease	61	(27.0)
Chronic liver disease	14	(6.2)
Chronic lung disease	28	(12.4)
Peripheral vascular disease	18	(8.0)
Previous solid organ transplantation	47	(20.8)
Pretransplant immunosuppression	32	(14.2)
Etiology of underlying ESRD		
Glomerulonephritis	49	(21.7)
Diabetic nephropathy	40	(17.7)
Hypertensive nephropathy	33	(14.6)
Polycystosis	27	(11.9)
Chronic interstitial nephropathy	18	(8.0)
Unknown	19	(8.4)
Other	40	(17.7)
Baseline serostatus		
Hepatitis B virus	2	(0.9)
Hepatitis C virus	24	(10.6)
CMV status D+/R-	21	(9.3)
CMV status D-/R-	3	(1.3)
Pretransplant renal replacement therapy		
Hemodialysis	186	(82.3)
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	27	(11.9)
Dialysis vintage, years (mean [Q ₁ -Q ₃])	1.98 (0.98-3.96)	
Age of donor, years (mean ± SD)	51.0 ± 16.6	
Type of donor		
Deceased	145	(64.2)
donation after cardiac death	71	(31.4)
Living donor	10	(4.4)
Number of HLA mismatches (mean [Q ₁ -Q ₃])	4 (3-5)	
Cold ischemia time, hours (mean ± SD)	16.4 ± 6.9	
Intraoperative transfusion requirement	3	(1.3)
Primary immunosuppression scheme		
Tacrolimus, MMF and steroids	204	(90.3)
Tacrolimus, azathioprine and steroids	20	(8.8)
Induction therapy		
None	48	(21.2)
Basiliximab	69	(30.5)
Antithymocyte globulin	108	(47.8)
Investigational new drug (alefacept)	1	(0.4)

CMV = cytomegalovirus; D = donor; ESRD = end-stage renal disease; HLA = human leukocyte antigen; MMF = mycophenolate mofetil; R = recipient; SD = standard deviation.

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04192.x

Hypogammaglobulinemia in Kidney Transplant

developed *de novo* IgG HGG (cumulative incidence rate, 50%; 95% CI, 42.8-57.2%). Accordingly, the prevalence of IgG HGG rose up to 52.0% (95% CI, 45.0-58.9%) ($p < 0.001$). The cumulative incidence rates for *de novo* IgA and IgM HGG at T₁ were 5.6% (95% CI, 2.3-8.8%) and 13.7% (95% CI, 8.7-18.6%), respectively. The prevalence of HGG for these classes also significantly increased from T₀ to T₁. Finally, the prevalence of IgG and IgM HGG at T₆ fell to 31.4% (95% CI, 23.9-38.8%) ($p < 0.001$) and 9.2% (95% CI, 4.5-13.8%) ($p = 0.001$ compared to T₁) (Figure 1). Of note, 32 patients (20.9%; 95% CI, 14.4-27.4%) had persistently low serum IgG levels both at T₁ and T₆.

Table 2 shows the risk factors for the development of IgG HGG at baseline and within the first 6 months posttransplantation. Pretransplant hemodialysis (compared to continuous ambulatory peritoneal dialysis [CAPD] or no renal replacement therapy) was the only variable that showed a significant effect on the prevalence of IgG HGG at baseline. Patients with IgG HGG at baseline had a lower hemodialysis vintage compared to those without, although such difference did not attain statistical significance (2.18 vs. 3.10 years, respectively; $p = 0.477$). Some relevant variables (i.e. AR episodes or administration of steroid boluses) were forced into the mixed-effects logistic regression model even if they did not reach statistical significance. The presence of IgG HGG at baseline was identified as the strongest predictor for the posttransplant occurrence of IgG HGG. Conversely, a positive anti-HCV status and the time interval elapsed from transplantation were associated with a reduced risk for this complication. We observed no differences in mean serum level of IgG at T₁ in those patients treated with a MMF-containing regimen compared to the rest of the cohort (757 ± 284 vs. 743 ± 424 mg/dL, respectively; $p = 0.85$).

Posttransplant outcomes

The median duration of follow-up for the cohort was 509 days (Q₁-Q₃ range, 397-734 days), with 193 patients (85.4%) having a follow-up period of at least 12 months (total follow-up of 124 386 transplant-days). Thirteen recipients (5.8%) died through the study period at a median of 144 days after transplantation (Q₁-Q₃ range, 50-329.5 days). Eight deaths (61.5%) were considered to be infection related. The mean overall survival was 971 ± 14 days, with one and 2-year survival rates of 95% and 93%, respectively. Overall graft survival was 92.9%.

Fifty-two patients (23.0%) experienced a total of 58 episodes of AR (mean, 1.2 ± 0.32 episodes per patient). The median interval between KT and the first episode of AR was 22 days. There were 20 acute cellular episodes (34.5%), 19 acute humoral episodes (32.8%) and 8 acute vascular episodes (14.3%). Eight episodes of acute serum creatinine elevation were empirically treated without histological confirmation. Antirejection treatment consisted of

Fernández-Ruiz et al.

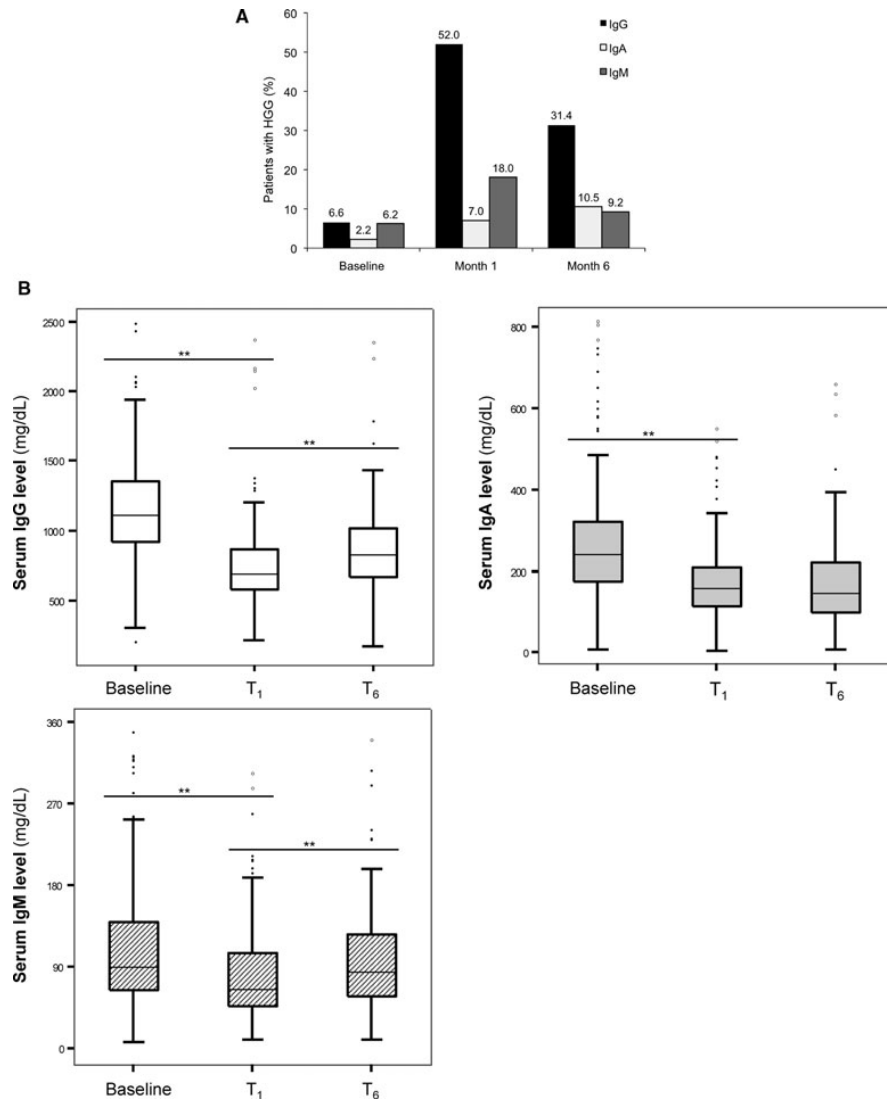


Figure 1: Evolution of humoral immunity within the first 6 months after kidney transplantation: (A) percentage of patients with hypogammaglobulinemia (HGG); (B) box-whisker plot showing the median (dot), interquartile range (box), percentiles 5 and 95 (whiskers) and outlier/extreme values of serum immunoglobulin levels at baseline, month 1 (T₁) and month 6 (T₆) posttransplant (*p = 0.001; **p < 0.001).

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04192.x

Hypogammaglobulinemia in Kidney Transplant

Table 2: Risk factors for IgG hypogammaglobulinemia at baseline (binary logistic regression model) and during the posttransplant period (mixed-effects logistic regression model)

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p-Value	OR	95% CI	p-Value
Predictors of IgG HGG at baseline (T₀)						
Recipient age, years ¹	0.99	0.96–1.03	0.703	–	–	–
Anti-HCV status						
Negative	1	–	–	–	–	–
Positive	.2	.2	0.175	–	–	–
Previous renal replacement therapy						
None or CAPD	1	–	–	–	–	–
Hemodialysis	0.21	0.07–0.62	0.007	0.21	0.07–0.62	0.005
Pretransplant immunosuppression	1.57	0.42–5.90	0.502	–	–	–
Predictors of posttransplant IgG HGG³						
Recipient age, years ¹	1.02	0.99–1.04	0.238	–	–	–
Anti-HCV status						
Negative	1	–	–	–	–	–
Positive	0.17	0.05–0.65	0.009	0.17	0.03–0.78	0.023
IgG HGG at baseline (T ₀)	46.17	5.08–419.43	0.001	26.91	2.05–354.03	0.012
MMF-containing regimen	0.65	0.17–2.38	0.512	–	–	–
Induction with basiliximab	2.33	1.00–5.39	0.049	–	–	–
Serum albumin level at T ₁ , g/dL ¹	0.39	0.16–0.95	0.038	–	–	–
CMV prophylaxis with GCV or VGCV	0.50	0.23–1.10	0.086	–	–	–
Occurrence of ≥1 AR episode	0.91	0.32–2.55	0.858	–	–	–
Administration of steroid boluses	1.61	0.54–4.82	0.392	–	–	–
Time interval since transplant						
T ₀ to T ₁	1	–	–	–	–	–
T ₁ to T ₆	0.26	0.13–0.51	0.000	0.23	0.09–0.58	0.002

AR = acute graft rejection; CAPD = continuous ambulatory peritoneal dialysis; CI = confidence interval; CMV = cytomegalovirus; GCV = ganciclovir; HCV = hepatitis C virus; HGG = hypogammaglobulinemia; MMF = mycophenolate mofetil; OR = odds ratio; T₀, baseline; T₁, month 1; T₆, month 6; VGCV = valganciclovir.

¹Per unitary increment.

²It was not possible to calculate OR and 95% CI for this variable because none of the anti-HCV positive recipients had IgG HGG at baseline.

³Interclass correlation: 0.540.

steroid boluses (47 episodes), polyclonal immunoglobulins (40 episodes), plasmapheresis (14 episodes), antithymocyte globulin (ATG) (5 episodes) and rituximab (4 episodes), alone or in combination therapy.

A total of 144 recipients (63.7%) developed 346 episodes of posttransplant infection (overall incidence rate of 2.78 per 1000 transplant days) (Table 3). According to the timing of infection occurrence, 63, 106 and 47 patients developed at least one infection episode in the early, intermediate and late periods, respectively.

Impact of hypogammaglobulinemia

Patients with HGG at baseline did not experience higher rates of infection in the early period (first month) when compared to those with normal pretransplant immunoglobulin levels. The incidences of infection in the remaining posttransplant periods (intermediate and late) according to the humoral immune status are shown in Tables 4 and 5.

Patients with IgG HGG at T₁ had a higher cumulative incidence of bacterial infection (p = 0.065), bloodstream infection (BSI) (p = 0.009) and acute graft pyelonephritis (AGPN)

(p = 0.003) in the intermediate period. Both the incidence rate of overall infection and the mean number of infectious episodes per recipient were also higher in these patients compared to those with normal IgG levels. Recipients with HGG of any class at T₁ exhibited higher cumulative incidences of overall (p = 0.018), bacterial (p = 0.004), and fungal infection (p = 0.082), BSI (p = 0.054) and AGPN (p = 0.003), and an increased incidence rate of overall infection (p < 0.001) between the first and the sixth month. We also found a gradient in the cumulative incidences of bacterial infection, BSI and AGPN across the different categories of IgG HGG (Table 5).

The presence of IgG HGG at T₆ was associated with a higher cumulative incidence of overall infection (p = 0.057), bacterial infection (p = 0.015) and lower urinary tract infection (p = 0.044) in the late posttransplant period. Patients with HGG of any class also had higher cumulative incidences of late BSI (p = 0.069), lower urinary tract infection (p = 0.030), and *Clostridium difficile*-associated diarrhea (p = 0.053). There was a nonsignificant trend toward a higher incidence of late CMV infection in patients with severe IgG HGG (<500 mg/dL) at T₆ (Table 5).

Fernández-Ruiz et al.

Table 3: Site and causative agents involved in the 346 episodes of posttransplant infection

	N	(%)
Clinical syndrome¹		
Lower urinary tract infection	85	(24.6)
Acute graft pyelonephritis	35	(10.1)
CMV viral syndrome	59	(17.1)
Incisional surgical site infection	35	(10.1)
Catheter-related bloodstream infection	11	(3.2)
Pneumonia and LRTI	27	(7.8)
Skin and soft-tissue infection	23	(6.6)
Digestive tract infection	19	(5.5)
Intraabdominal infection	13	(3.8)
Bloodstream infection	43	(12.4)
Infective endocarditis	2	(0.6)
Other	21	(6.1)
Isolated microorganisms		
Bacteria		
<i>Enterococcus</i> spp.	28	(8.1)
Coagulase-negative staphylococci	11	(3.2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	(1.4)
<i>Viridans</i> group streptococci	2	(0.6)
<i>Escherichia coli</i>	76	(22.0)
<i>Klebsiella</i> spp.	10	(2.9)
Other <i>Enterobacteriaceae</i>	18	(5.2)
<i>Pseudomonas</i> spp.	21	(6.1)
Other nonfermenting gram negative bacilli	2	(0.6)
<i>Clostridium difficile</i>	8	(2.3)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	2	(0.6)
Polymicrobial	3	(0.9)
<i>Nocardia</i> complex	1	(0.3)
No microbiological diagnosis	31	(8.9)
Viruses		
CMV	75	(21.7)
HSV-1 and 2	12	(3.5)
Varicella-zoster virus	7	(2.0)
Other	14	(4.0)
Fungi		
<i>Candida</i> spp.	13	(3.8)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	(0.6)
Other	2	(0.6)
Parasites (<i>Leishmania donovani</i> complex)	3	(0.9)

CMV = cytomegalovirus; HSV = herpes simplex virus; LRTI = lower respiratory tract infection.

¹The total number may be less than the sum of each syndrome because more than one infection was simultaneously present in some patients.

On multivariate Cox proportional hazards model (Table 6), the presence of HGG of any class at T₁ remained as an independent risk factor for bacterial infection in the intermediate period (HR 1.81; 95% CI, 1.03–3.17). Hypogammaglobulinemia of any class at T₆ independently predicted the overall occurrence of late infection (HR 2.31; 95% CI, 1.18–4.55), as well as late bacterial infection (HR 4.66; 95% CI, 1.89–11.48). Analogously, in the complementary log–log discrete time hazards model posttransplant HGG emerged as an independent risk factor for both overall (HR 2.03; 95% CI, 1.39–2.96) and bacterial infection (HR 2.68; 95% CI, 1.66–4.34) (Table 7).

There was a difference neither in the overall rate of AR nor in the rate of humoral AR between patients with and without HGG. After excluding the only patient who died in the first month posttransplant, we found no differences in mean survival time between those recipients with HGG of any class at T₁ and those with normal values (954 ± 22 vs. 987 ± 16 days, respectively; p = 0.128). Nevertheless, this difference became significant if only infection-related mortality was considered (p = 0.018), as all events (n = 8) occurred in the HGG group.

Discussion

This study provides preliminary evidence that posttransplant monitoring of humoral immune status might be useful in predicting the occurrence of infectious complications in KT recipients. The presence of HGG of any class at month 1 was independently associated with the incidence of bacterial infection during the intermediate posttransplant period, whereas HGG at month 6 was associated with either overall infection or bacterial infection in the late period. The literature contains some studies aimed at assessing the incidence and relevance of HGG after KT (12–15). Most of them, however, were performed more than a decade ago (12–14), thus limiting the validity of their findings in the setting of contemporary immunosuppressive and prophylactic practices, or were based on small sample sizes (13,14). Of note, the definition used for HGG was not uniform across this literature and some recent studies did not perform an accurate analysis by site of infection or etiologic agent (15). The only other study that specifically stratified the impact of immunoglobulin levels at different times found that patients with HGG at month 3 suffered from a higher incidence of infection during the first 3 months after transplantation, but not in the subsequent period (months 4–12), raising reasonable concerns about the actual sense of the causal relationship between both events. In addition, these authors only analyzed some types of posttransplant infectious complications—mainly urinary tract infection—with low number of patients in each subgroup (15). Finally, our study contains the largest sample size and longest follow-up period, and one of the few demonstrating the independent effect of humoral immune function on the risk of infection by means of logistic regression analysis.

The prevalence of IgG HGG at the baseline evaluation in our study (6.6%) was very close to that found in similar cohorts of KT recipients (15), and lower than other types of SOT, including liver (15.7%) or lung (10%) transplantations (4,5). It has been observed that the T cell-dependent B cell proliferation after mitogen stimulation is decreased in patients with ESRD compared to healthy controls (7), a defective function in which the role of high levels of parathyroid hormone has been hypothesized (23). As a somewhat unexpected result, we found that pretransplant hemodialysis exerted a protective effect on IgG HGG at baseline. Moser et al. (24) failed to find meaningful

Hypogammaglobulinemia in Kidney Transplant

Table 4: Cumulative incidence of infection [n (%)] according to the different posttransplant periods and the presence or absence of hypogammaglobulinemia

Intermediate period (T ₁ to T ₆)	IgG HGG at T ₁			HGG of any class ¹ at T ₁		
	Present (n = 104)	Absent (n = 96)	p-Value	Present (n = 121)	Absent (n = 79)	p-Value
Overall infection	54 (51.9)	40 (41.7)	0.147	65 (53.7)	29 (36.7)	0.018
Episodes (mean number ± SD)	2.1 ± 1.4	0.9 ± 1.4	0.095	1.3 ± 1.5	0.7 ± 1.2	0.004
Incidence rate ²	2.10	1.59	0.059	2.32	1.18	0.000
Bacterial infection	41 (39.4)	26 (27.1)	0.065	50 (41.3)	17 (21.5)	0.004
Bloodstream infection	14 (13.5)	3 (3.1)	0.009	14 (11.6)	3 (3.8)	0.054
Pneumonia	4 (3.8)	6 (6.3)	0.436	5 (4.1)	5 (6.3)	0.486
Acute graft pyelonephritis	12 (11.5)	1 (1.0)	0.003	13 (10.7)	0 (0.0)	0.003
Lower urinary tract infection	19 (18.3)	16 (16.7)	0.766	24 (19.8)	11 (13.9)	0.282
Fungal infection	8 (7.7)	4 (4.2)	0.294	10 (8.3)	2 (2.5)	0.082
CMV infection	26 (25.0)	22 (22.9)	0.730	32 (26.4)	16 (20.3)	0.316
CMV end-organ disease	6 (5.8)	3 (3.1)	0.290	6 (5.0)	3 (3.8)	0.699
Non-CMV viral infection	8 (7.7)	8 (8.3)	0.867	11 (9.1)	5 (6.3)	0.482
HSV or VZV infection	5 (4.8)	5 (5.2)	0.575	8 (6.6)	2 (2.5)	0.169

Late period (after T ₆)	IgG HGG at T ₆			HGG of any class ¹ at T ₆		
	Present (n = 48)	Absent (n = 104)	p-Value	Present (n = 58)	Absent (n = 94)	p-Value
Overall infection	16 (33.3)	20 (19.2)	0.057	21 (36.2)	15 (16.0)	0.004
Episodes (mean number ± SD)	0.5 ± 1.0	0.3 ± 0.7	0.057	0.6 ± 1.1	0.2 ± 0.6	0.003
Incidence rate ²	0.90	0.51	0.046	1.03	0.39	0.000
Bacterial infection	13 (27.1)	12 (11.4)	0.015	18 (31.0)	7 (7.4)	0.000
Bloodstream infection	3 (6.3)	2 (1.9)	0.178	4 (6.9)	1 (1.1)	0.069
Pneumonia	3 (6.3)	3 (2.9)	0.279	3 (5.2)	3 (3.2)	0.412
Acute graft pyelonephritis	2 (4.2)	4 (3.8)	0.613	4 (6.9)	2 (2.1)	0.147
Lower urinary tract infection	6 (12.5)	4 (3.8)	0.044	7 (12.1)	3 (3.2)	0.030
Clostridium difficile infection	1 (2.1)	2 (1.9)	0.680	3 (5.2)	0 (0.0)	0.053
CMV infection	4 (8.3)	8 (7.6)	0.879	5 (8.6)	7 (7.4)	0.780
Non-CMV viral infection	4 (8.3)	6 (5.7)	0.543	6 (10.3)	4 (4.2)	0.136

CMV = cytomegalovirus; HGG = hypogammaglobulinemia; HSV = herpes simplex virus; SD = standard deviation; T₀, baseline; T₁, month 1; T₆, month 6; VZV = varicella-zoster virus.

¹Hypogammaglobulinemia affecting ≥1 class.

²Data presented as number of infectious episodes per 1000 transplant days.

differences in B cell counts between ESRD patients according to the type of renal replacement therapy, although most of the previous studies on this subject did not include nondialyzed patients or those undergoing CAPD (7,8). On the other hand, plasma levels of soluble CD23—a marker of B cell activation—were found to be significantly increased in patients undergoing regular hemodialysis compared to CAPD or those not yet dialyzed (25). The prevalence of IgG HGG markedly increased up to 52.0% at the first post-transplant month (incidence rate of 50%), to subsequently descend to 31.4% at month 6—a value that was still far from the baseline. This kinetics is similar to what was reported by Broeders et al. (15), mirrors the evolution of the net immunosuppressive load, and offers the opportunity to assess predictive factors of acquired HGG during the posttransplant course.

Other studies identified age (5), female gender (26), emphysema (26,27) and pretransplant IgG level (27) as risk factors for HGG in lung transplant recipients. We found that a low IgG level at baseline acts as the strongest predictor of the posttransplant occurrence of HGG. Keven et al. reported that KT recipients treated with MMF experienced

a significant and reversible decrease in IgG levels after 6 months, compared to those with azathioprine-based regimens (9). This effect of MMF on the humoral immunity was later observed in other types of SOT (27,28). Nevertheless, neither this study nor that of Broeders et al. (15) found any significant association between the type of maintenance immunosuppression and the risk of HGG. It has been suggested that the decrease in helper T cell population after antirejection therapy may lead to acquired posttransplant HGG. Nevertheless, neither steroid pulses nor ATG treatment significantly affected overall IgA or IgM levels or IgG₂ and IgG₄ subclass levels in the study by Wieneke et al. (14). The lack of significant association between AR occurrence—overall or only steroid-treated episodes—and HGG in our study apparently supports such finding. Moderate polyclonal hypergammaglobulinemia is common in patients with chronic viral liver disease (29), offering a plausible explanation for the protective effect of anti-HCV-positive status on the development of posttransplant HGG in our study.

The most relevant finding of this study probably concerns the predictive value of humoral immune monitoring on the

Fernández-Ruiz et al.

Table 5: Cumulative incidence of infection and acute rejection [n (%)] by severity of IgG HGG

Intermediate period (T ₁ to T ₆)	IgG HGG at T ₁			p-Value
	No HGG (>700 mg/dL)	Moderate HGG (500–700 mg/dL)	Severe HGG (<500 mg/dL)	
Overall infection	40 (42.1)	38 (48.1)	16 (61.5)	0.206
Bacterial infection	26 (27.4)	28 (35.4)	13 (50.0)	0.086
Bloodstream infection	3 (3.2)	9 (11.4)	5 (19.2)	0.017
Pneumonia	6 (6.3)	1 (1.3)	3 (11.5)	0.082
Acute graft pyelonephritis	1 (1.1)	7 (8.9)	5 (19.2)	0.002
Lower urinary tract infection	16 (16.8)	13 (16.5)	6 (23.1)	0.723
Fungal infection	4 (4.2)	6 (7.6)	2 (7.7)	0.598
CMV infection	22 (23.2)	19 (24.1)	7 (26.9)	0.924
Non-CMV viral infection	8 (8.4)	7 (8.9)	1 (3.8)	0.700
Acute rejection	4 (4.2)	6 (7.6)	3 (11.5)	0.357
Late period (after T ₆)	IgG HGG at T ₆			p-Value
	No HGG (>700 mg/dL)	Moderate HGG (500–700 mg/dL)	Severe HGG (<500 mg/dL)	
Overall infection	21 (20.0)	9 (28.1)	6 (40.0)	0.188
Bacterial infection	13 (12.3)	7 (21.9)	5 (33.3)	0.075
Bloodstream infection	2 (1.9)	2 (6.3)	1 (6.7)	0.352
Pneumonia	3 (2.8)	2 (6.3)	1 (6.7)	0.578
Acute graft pyelonephritis	5 (4.7)	1 (3.1)	0 (0.0)	0.656
Lower urinary tract infection	4 (3.8)	3 (9.4)	3 (20.0)	0.045
CMV infection	8 (7.5)	1 (3.1)	3 (20.0)	0.131
Non-CMV viral infection	7 (6.6)	3 (9.4)	0 (0.0)	0.479
Acute rejection	5 (4.7)	2 (6.3)	0 (0.0)	0.628

CMV = cytomegalovirus; HGG = hypogammaglobulinemia; T₁, month 1; T₆, month 6.

risk of infectious complications after KT. The link between HGG and infection had already been established in other types of SOT (5,6,10,26,30), albeit some authors failed to demonstrate a significant association in liver transplant recipients (3,4). Moreover, the direction of the causal association between both events is not necessarily univocal, since infection itself may contribute to dysregulation of the humoral immune response.

Baseline HGG did not exert a significant effect on the incidence of early infection in our cohort. This result is consistent with the currently accepted timetable according to which donor-derived and nosocomial infections are predominant during the first post-transplant month (1). On the opposite, serum immunoglobulin levels seemed to be associated with infection rates during both intermediate and late periods. The humoral component of the immune system is primarily responsible for clearing extracellular bacteria—including encapsulated organisms—by means of antigen neutralization, opsonization and complement activation (31). In accordance, HGG acted mainly as a predictor of bacterial infection in our study, and we were able to demonstrate its association with some specific clinical syndromes (BSI and AGPN) and microorganisms (*C. difficile*). Lung transplant recipients with low levels of IgG suffer from a higher incidence of BSI (5). Muñoz et al. re-

ported that severe IgG HGG increased fivefold the risk of *C. difficile*-associated diarrhea after heart transplantation (32). We also found a nearly significant trend in the incidence of fungal infection in patients with and without HGG of any class at first month, similarly to previous studies in lung transplant recipients (5,26). Although HGG has been identified as a predisposing condition for CMV infection, particularly after heart transplantation (6,30,33), we were not able to confirm such finding. This lack of reproducibility might come from differences in immunosuppressive and surveillance regimens between types of SOT, resulting in a lower incidence of CMV viremia in our cohort compared to others (30).

Our work has some limitations to consider. Immunosuppressant agents affect primarily T cell function and subsequent lymphokine production, thus leading to impaired B cell function that may explain the development of HGG by an indirect pathway (10). Nevertheless, in this study we have not analyzed any cellular immune parameter. Moreover, the humoral immune status was assessed in only two time points after transplantation, thus limiting a more accurate analysis of the kinetics of humoral response, especially during the intermediate period. Blood sampling was not available for all the patients at T₁ (88.9% of the eligible recipients) and T₆ (73.9); nevertheless, we did not find significant differences regarding clinical outcomes between

Hypogammaglobulinemia in Kidney Transplant

Table 6: Cox proportional hazards models for infection in each posttransplant period

Overall infection between T ₁ and T ₆	Adjusted HR ¹	95% CI	p-Value
Recipient age, years*	1.02	1.00–1.04	0.024
Reoperation during month 1	1.82	1.00–3.32	0.049
AR during month 1	1.83	1.04–3.21	0.035
Bacterial infection between T ₁ and T ₆	Adjusted HR ²	95% CI	p-Value
Recipient age, years*	1.03	1.01–1.05	0.006
AR during month 1	2.13	1.15–3.93	0.016
HGG of any class at T ₁	1.81	1.03–3.17	0.038
Overall infection after T ₆	Adjusted HR ³	95% CI	p-Value
Previous SOT	2.98	1.49–5.94	0.002
AR between T ₁ and T ₆	5.28	2.27–12.27	0.000
HGG of any class at T ₆	2.31	1.18–4.55	0.015
Bacterial infection after T ₆	Adjusted HR ⁴	95% CI	p-Value
Recipient age, years*	1.03	1.00–1.06	0.028
Previous SOT	4.93	2.02–12.06	0.000
AR between T ₁ and T ₆	8.57	3.36–21.85	0.000
HGG of any class at T ₆	4.66	1.89–11.48	0.001

AR = acute graft rejection; CI = confidence interval; ESRD = end-stage renal disease; HGG = hypogammaglobulinemia; HR = hazard ratio; SOT = solid-organ transplantation; T₀, baseline; T₁, month 1; T₆, month 6.

*Per unitary increment.

¹Model adjusted for glomerulonephritis as underlying ESRD, diabetes mellitus and heart disease as pretransplant conditions, donation after cardiac death, cold ischemia time, graft function at T₁ (MDRD-4), administration of steroid boluses during month 1, serum albumin levels at T₁ and HGG of any class at T₁.

²Model adjusted for diabetes mellitus and chronic lung disease as pretransplant conditions, donation after cardiac death, requirement for re-operation during month 1, administration of steroid boluses during month 1, graft function at T₁ (MDRD-4) and serum albumin levels at T₁.

³Model adjusted for recipient age, peripheral vascular disease as pretransplant condition, administration of steroid boluses between T₁ and T₆, occurrence of overall infection between T₁ and T₆ and graft function at T₆ (MDRD-4).

⁴Model adjusted for glomerulonephritis as underlying ESRD, peripheral vascular disease as pretransplant condition, administration of steroid boluses between T₁ and T₆, occurrence of bacterial infection between T₁ and T₆ and graft function at T₆ (MDRD-4).

those with or without the complete blood sampling protocol. The generalizability of our findings may be limited by its single-institution design. Despite the large sample size, the low incidence rates observed for some clinical

syndromes and causative agents are prone to type 2 error due to poor statistical power. Finally, and even adjusting for a number of clinical variables, we cannot exclude the impact of potential confounders and therefore conclusions

Table 7: Complementary log-log discrete time hazards model for posttransplant infection

Overall infection	Adjusted HR ¹	95% CI	p-Value
Recipient age, years*	1.01	1.00–1.03	0.013
Previous SOT	1.71	1.14–2.57	0.009
Glomerulonephritis as underlying ESRD	0.55	0.33–0.93	0.025
Posttransplant HGG of any class	2.03	1.39–2.96	0.000
AR during posttransplant period	0.98	0.97–0.99	0.004
Bacterial infection	Adjusted HR ²	95% CI	p-Value
Recipient age, years*	1.02	1.00–1.04	0.009
Previous SOT	1.99	1.21–3.27	0.006
Glomerulonephritis as underlying ESRD	0.52	0.27–0.99	0.047
Posttransplant HGG of any class	2.68	1.66–4.34	0.000
AR during posttransplant period	2.68	1.53–4.68	0.000

AR = acute graft rejection; CI = confidence interval; ESRD = end-stage renal disease; HGG = hypogammaglobulinemia; HR = hazard ratio; SOT = solid-organ transplantation.

*Per unitary increment.

¹Model adjusted for diabetes mellitus, heart disease and peripheral vascular disease as pretransplant conditions, donation after cardiac death, requirement for reoperation during month 1, graft function at T₁ (MDRD-4) and administration of steroid boluses.

²Model adjusted for diabetes mellitus and peripheral vascular disease as pretransplant conditions, donation after cardiac death, requirement for reoperation during month 1, graft function at T₁ (MDRD-4) and administration of steroid boluses.

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04192.x

Fernández-Ruiz et al.

regarding the risk factors for HGG or the causality relationship between such complication and infection should be taken with caution.

In conclusion, our study suggests that a systematic monitoring of humoral immune status after KT may identify a subgroup of recipients at a highest risk of infectious complications, mainly bacterial. Thus, we propose that patients at risk of acquired posttransplant HGG should deserve close surveillance, prolonged prophylaxis and, eventually, a decrease of the immunosuppressive therapy. The assessment of serum immunoglobulin levels by nephelometry constitutes an affordable (\approx 13 US Dollars per determination) and easily available technique for most laboratories (3), compared to other more time- and cost-consuming immune-monitoring assays (34). In addition, HGG is a potentially reversible condition and some studies have evaluated the impact of preemptive intravenous immunoglobulin replacement on the occurrence of infection, mainly in heart transplant recipients (35,36). Although a complete cost-effectiveness analysis of this strategy in the setting of KT is beyond the aims of our study, it appears to be promising in view of the infection-related hospitalization costs estimated for other types of immunocompromised hosts (37). Our experience paves the way for future studies, which should assess potential benefits of substitutive immunoglobulin therapy and the optimal time point of such intervention.

Acknowledgments

Funding sources: This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS] project 11/01538) and the Fundación Mutua Madrileña de Investigación Médica (Grant FMM 2010/0015). M.F.-R. holds a research-training contract "Rio Hortega" (CM11/00187) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Instituto de Salud Carlos III). F.L.-M. holds a grant from Fundación Mutua Madrileña.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: Risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24: 273–283.
2. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Romo EM, et al. Pre-transplant lymphocyte count predicts the incidence of infection during the first two years after liver transplantation. *Liver Transplant* 2009; 15: 1209–1216.
3. Carbone J, Micheloud D, Salcedo M, et al. Humoral and cellular immune monitoring might be useful to identify liver transplant

- recipients at risk for development of infection. *Transplant Infect Dis* 2008; 10: 396–402.
4. Doron S, Ruthazer R, Werner BG, Rabson A, Snyderman DR. Hypogammaglobulinemia in liver transplant recipients: Incidence, timing, risk factors, and outcomes. *Transplantation* 2006; 81: 697–703.
5. Goldfard NS, Avery RK, Goormastic M, et al. Hypogammaglobulinemia in lung transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71: 242–246.
6. Sarmiento E, Rodríguez-Molina JJ, Fernández-Yáñez J, et al. IgG monitoring to identify the risk for development of infection in heart transplant recipients. *Transplant Infect Dis* 2006; 8: 49–53.
7. Raskova J, Ghobrial I, Czervinski DK, Shea SM, Eisinger RP, Raska K Jr. B-cell activation and immunoregulation in end-stage renal disease patients receiving hemodialysis. *Arch Intern Med* 1987; 147: 89–93.
8. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimehr R, Vaziri ND. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 205–212.
9. Keven K, Sahin M, Kutlay S, et al. Immunoglobulin deficiency in kidney allograft recipients: Comparative effects of mycophenolate mofetil and azathioprine. *Transplant Infect Dis* 2003; 5: 181–186.
10. Mawhorter S, Yamani MH. Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 581–585.
11. Boddana P, Webb LH, Unsworth J, Brealey M, Bingham C, Harper SJ. Hypogammaglobulinemia and bronchiectasis in mycophenolate mofetil-treated renal transplant recipients: An emerging clinical phenomenon? *Clin Transplant* 2011; 25: 417–419.
12. Pollock CA, Mahony JF, Ibels LS, et al. Immunoglobulin abnormalities in renal transplant recipients. *Transplantation* 1989; 47: 952–956.
13. Miller BW, Brennan DC, Korenblat PE, Goss JA, Flye MW. Common variable immunodeficiency in a renal transplant patient with severe recurrent bacterial infection: A case report and review of the literature. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 947–951.
14. Wieneke H, Otte B, Lang D, Heidenreich S. Predictive value of IgG subclass levels for infectious complications in renal transplant recipients. *Clin Nephrol* 1996; 45: 22–28.
15. Broeders EN, Wissing KM, Hazzan M, et al. Evolution of immunoglobulin and mannose binding protein levels after renal transplantation: Association with infectious complications. *Transplant Int* 2008; 21: 57–64.
16. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461–470.
17. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128–140.
18. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094–1097.
19. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813–1821.
20. European Expert Group on Renal Transplantation (EBPG); European Renal Association (ERA-EDTA); European Society for Organ

- Transplantation (ESOT). European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(Suppl 7): 1–85.
21. Hedeken D, Gibbons RD. Mixed-effect regression models for binary outcomes. In: *Longitudinal Data Analysis*. New Jersey: Wiley, 2006: 149–186.
 22. Prentice RL, Gloeckler LA. Regression analysis of grouped survival data with application to breast cancer data. *Biometrics* 1978; 34: 57–67.
 23. Smogorzewski M, Massry SG. Defects in B-cell function and metabolism in uremia: Role of parathyroid hormone. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S186–S189.
 24. Moser B, Roth G, Brunner M, et al. Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: A comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis, and peritoneal dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 581–585.
 25. Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, et al. Soluble CD23 as an effector of immune dysregulation in chronic uremia and dialysis. *Kidney Int* 1993; 43: 878–884.
 26. Kawut SM, Shah L, Wilt JS, et al. Risk factors and outcomes of hypogammaglobulinemia after lung transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 1723–1726.
 27. Yip NH, Lederer DJ, Kawut SM, et al. Immunoglobulin G levels before and after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 917–921.
 28. Boddana P, Webb LH, Unsworth J, Brealey M, Bingham C, Harper SJ. Hypogammaglobulinemia and bronchiectasis in mycophenolate mofetil-treated renal transplant recipients: An emerging clinical phenomenon? *Clin Transplant* 2011; 25: 417–419.
 29. González-Quintela A, Alende MR, Gamallo R, et al. Serum immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in chronic hepatitis C. A comparison with non-cirrhotic alcoholic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2121–2126.
 30. Yamani MH, Avery RK, Mawhorter SD, et al. Hypogammaglobulinemia following cardiac transplantation: A link between rejection and infection. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 425–430.
 31. Donnelly JP, Bijllevens NM, De Pauw BE. Infections in the immunocompromised host: General principles. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of Infectious Diseases* (7th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone, 2010.
 32. Muñoz P, Giannella M, Alcalá L, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in heart transplant recipients: Is hypogammaglobulinemia the answer? *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 907–914.
 33. Corales R, Chua J, Mawhorter S, et al. Significant post-transplant hypogammaglobulinemia in six heart transplant recipients: An emerging clinical phenomenon? *Transpl Infect Dis* 2000; 2: 133–139.
 34. Ling X, Xiong J, Liang W, et al. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation* 2012; 93: 737–743.
 35. Yamani MH, Avery R, Mawhorter SD, et al. The impact of CytoGam on cardiac transplant recipients with moderate hypogammaglobulinemia: A randomized single-center study. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1766–1769.
 36. Sarmiento E, Fernández-Yáñez J, Muñoz P, et al. Hypogammaglobulinemia after heart transplantation: Use of intravenous immunoglobulin replacement therapy in relapsing CMV disease. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 97–101.
 37. Kuderer NM, Dale DC, Crawford J, Costler LE, Lyman GH. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. *Cancer* 2006; 106: 2258–2266.

Hypogammaglobulinemia in Kidney Transplant

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

- *Supplemental Materials and Methods*: includes descriptions of the immunosuppressive and prophylactic regimens used in the cohort, as well as definitions for the different infectious syndromes, acute graft rejection, pretransplant immunosuppression, delayed graft function and graft loss.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Anexo 2.

Infection (2015) 43:413–422
DOI 10.1007/s15010-015-0737-2



ORIGINAL PAPER

Potential role of post-transplant hypogammaglobulinemia in the risk of *Clostridium difficile* infection after kidney transplantation: a case–control study

Julia Origüen · Mario Fernández-Ruiz · Carlos Lumbreras · María Ángeles Orellana · Francisco López-Medrano · Tamara Ruiz-Merlo · Rafael San Juan · Ana García-Reyne · Esther González · Natalia Polanco · Estela Paz-Artal · Amado Andrés · José María Aguado

Received: 3 November 2014 / Accepted: 27 January 2015 / Published online: 13 February 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Purpose To identify reversible risk factors for *Clostridium difficile* infection (CDI) after kidney transplantation (KT) that could lead to a reduction in its incidence and associated complications.

Methods We performed a single-center case–control study in which 41 patients undergoing KT between February 2009 and July 2013 who developed a first episode of post-transplant CDI were included as cases. Patients transplanted at the same calendar day (± 2 weeks) as each case with no evidence of CDI and comparable risk exposure period were chosen as controls (2:1 ratio). Serum immunoglobulin and complement levels were systematically measured at baseline and months 1 and 6 after transplantation.

Results Multivariate regression analysis identified age-adjusted Charlson comorbidity index (odds ratio [OR] per unitary increment 1.31; P value = 0.043), delayed graft function (OR 2.76; P value = 0.039), prior cytomegalovirus (CMV) disease (OR 6.85; P value = 0.011) and prior acute graft rejection (OR 5.92; P value = 0.008) as risk factors for post-transplant CDI. Cases with their first episode of CDI occurring beyond the first month were more likely to have IgG hypogammaglobulinemia (HGG) at month 1 (P value = 0.002), whereas cases with CDI beyond the sixth month were more likely to have HGG of any class at month 6 (P value = 0.003). Poor outcome (graft loss and/or all-cause mortality) was more common among cases (adjusted hazard ratio 5.69; P value = 0.001).

Conclusion The occurrence of CDI exerts a detrimental effect on graft and patient outcome. Post-transplant HGG was a potentially modifiable risk factor for CDI in KT recipients.

This study was partially presented at 53rd Annual Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Denver, CO (September 10–13, 2013).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s15010-015-0737-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Origüen (✉) · M. Fernández-Ruiz · C. Lumbreras · F. López-Medrano · T. Ruiz-Merlo · R. San Juan · A. García-Reyne · J. M. Aguado
Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario “12 de Octubre” (Centro de Actividades Ambulatorias, 2ª planta, bloque D, Avda. de Córdoba, s/n, 28041), Instituto de Investigación Hospital “12 de Octubre” (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain
e-mail: josabater@hotmail.com

M. Á. Orellana
Department of Microbiology, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Hospital “12 de Octubre” (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Keywords Case–control study · *Clostridium difficile* · Hypogammaglobulinemia · Kidney transplantation · Risk factors · Outcome

E. González · N. Polanco · A. Andrés
Department of Nephrology, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Hospital “12 de Octubre” (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

E. Paz-Artal
Department of Immunology, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Hospital “12 de Octubre” (i+12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Anexo 3.

American Journal of Transplantation
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2013 The American Society of Transplantation
and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/ajt.12055

Hypocomplementemia in Kidney Transplant Recipients: Impact on the Risk of Infectious Complications

M. Fernández-Ruiz^{a,*}, F. López-Medrano^a,
P. Varela-Peña^b, J. M. Morales^c,
A. García-Rey^a, R. San Juan^a, C. Lumbreras^a,
D. Lora-Pablos^{d,e}, N. Polanco^c, A. Andrés^c,
E. Paz-Artal^b and J. M. Aguado^a

^aUnit of Infectious Diseases, Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (I+12), Hospital Universitario "12 de Octubre," School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^bDepartment of Immunology, Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (I+12), Hospital Universitario "12 de Octubre," School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^cDepartment of Nephrology, Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (I+12), Hospital Universitario "12 de Octubre," School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^dUnit of Clinical Research, Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (I+12), Hospital Universitario "12 de Octubre," School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^eCIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

*Corresponding author: Mario Fernández-Ruiz,
mario_fdezruiz@yahoo.es

This study was partially presented at the 50th Annual Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston (September 12–15, 2010) and at the 24th International Congress of The Transplantation Society (TTS), Berlin (July 15–19, 2012).

The usefulness of monitoring of complement levels in predicting the occurrence of infection in kidney transplant (KT) recipients remains largely unknown. We prospectively assessed serum complement levels (C3 and C4) at baseline and at months 1 and 6 in 270 patients undergoing KT. Adjusted hazard ratios (aHRs) for infection in each posttransplant period were estimated by Cox regression. The prevalence of C3 hypocomplementemia progressively decreased from 21.5% at baseline to 11.6% at month 6 ($p = 0.017$), whereas the prevalence of C4 hypocomplementemia rose from 3.7% at baseline to 9.2% at month 1 ($p = 0.004$). Patients with C3 hypocomplementemia at month 1 had higher incidences of overall ($p = 0.002$), bacterial ($p = 0.004$) and fungal infection ($p = 0.019$) in the intermediate period (months 1–6). On multivariate analysis C3 hypocomplementemia at month 1 emerged as a

risk factor for overall (aHR 1.911; $p = 0.009$) and bacterial infection (aHR 2.130; $p = 0.014$) during the intermediate period, whereas C3 hypocomplementemia at month 6 predicted the occurrence of bacterial infection (aHR 3.347; $p = 0.039$) in the late period (>6 month). A simple monitoring strategy of serum C3 levels predicts the risk of posttransplant infectious complications in KT recipients.

Key words: Complement system, hypocomplementemia, infection, kidney transplantation, outcome; risk factors

Abbreviations: APN, acute pyelonephritis; AR, acute graft rejection; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; CPR, C-reactive protein; ESRD, end-stage renal disease; HGG, hypogammaglobulinemia; HLA, human leukocyte antigen; HR, hazard ratio; HSV, herpes simplex virus; ICC, interclass correlation; Ig, immunoglobulin; INR, internationalized normal ratio; KT, kidney transplant; LRTI, lower respiratory tract infection; MBL, mannose-binding lectin; MDRD, modification of diet in renal disease; OR, odds ratio; SD, standard deviation; SOT, solid organ transplant; VVZ, varicella-zoster virus.

Received 25 September 2012, revised 31 October 2012 and accepted for publication 12 November 2012

Introduction

The complement system plays a crucial role in the innate immune response against infection and enhances the adaptive immunity by means of an intricate interaction between soluble activation products and cell surface receptors. Activation of the complement system triggers a constellation of effects including opsonization, chemotaxis, phagocytosis and cytotoxicity (1). These host-defense functions become particularly relevant in the setting of immunosuppression after solid organ transplantation (SOT), which is mostly targeted against the adaptive immune arm (2). The lectin pathway—one of the three complement activation cascades—has been extensively studied in the SOT population, thus demonstrating that both mannose-binding lectin (MBL) serum levels and polymorphisms of the MBL gene (*mb12*) exert an important impact on the risk of infection in liver (3–5) and kidney transplant (KT) recipients (6–8). Nevertheless, the

Fernández-Ruiz et al.

assessment of MBL status is still far from being incorporated into routine clinical practice.

A more feasible approach to explore the complement system in SOT recipients could be based on the monitoring of a number of serum complement factors during the posttransplant period. The fourth component of the complement system (C4) holds a central position in the classical pathway, whereas all three activation cascades—classical, alternative and lectin pathways—converge at the level of the third component (C3) to form the C5 convertase (C4bC2aC3b from classical and MBL pathways, and [C3b]₂Bb from alternative pathway), finally resulting in the formation of the membrane attack complex (1). In addition, cleavage products of both factors potentiate antibody response, trigger local inflammatory responses, and enhance immunologic memory (9). Although previous studies have found that decreased levels of C3 may be associated to the occurrence of infectious complications after liver (10) and heart transplantation (11), the evidence on this issue is scarce. This study was aimed at investigating the incidence and predisposing factors for hypocomplementemia in a large series of KT recipients, as well as to evaluate the usefulness of the monitoring of serum complement factors (C3 and C4) in predicting the risk of infection in this population.

Methods

Study population

We conducted a prospective cohort study at the University Hospital "12 de Octubre" (Madrid, Spain), a 1360-bed tertiary-care center with more than 25 years of experience in SOT. Beginning in November of 2008 all consecutive patients aged 18 years or older who underwent KT at our institution were included in a prospective immune status assessment based on serial measurements of total lymphocyte and peripheral blood lymphocyte subpopulations counts, serum immunoglobulin (Ig) levels (IgG, IgA and IgM), and serum complement levels. Partial results have been previously published (12). We excluded patients with known pretransplant primary immunodeficiencies or human immunodeficiency virus infection, and those who died or developed graft loss within the first week. The local Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all participants.

Study design and immune status assessment

Serum samples were collected just before transplantation (baseline) and at months 1 and 6. Serum complement levels (C3 and C4) were determined by nephelometry (Immage 800, Beckman Coulter, Villepinte, France). Normal ranges, as established by our laboratory, were between 83.0 and 171.0 mg/dL for C3, and between 14.0 and 38.0 mg/dL for C4. Patients were enrolled at the time of transplantation and followed for at least one year, unless death or graft loss were documented earlier. We divided the posttransplant follow-up period in three intervals: early (first month), intermediate (months 1–6) and late (>6 months). The primary study outcome was the occurrence of at least one episode of infection during each posttransplant period. We excluded from the analysis asymptomatic bacteriuria, lower urinary tract infections (cystitis, urethritis and prostatitis), and upper respiratory tract infections not requiring hospital admission. The secondary study outcome was all-cause mortality. A number of pretransplant, perioperative and post-

transplant variables were prospectively recorded. Glomerular filtration rate was estimated using the modification of diet in renal disease (MDRD-4) formula (13). Since most of the plasma complement components are biosynthesized in the liver (9), we used serum albumin levels and internationalized normal ratios (INR) at months 1 and 6 as surrogate markers of liver function.

Immunosuppression and prophylaxis regimens

Detailed descriptions of the induction therapies and maintenance immunosuppressive regimens used in the cohort, as well as the antibiotic and anticytomegalovirus (anti-CMV) prophylaxis, are available in the Supporting Information that accompanies this paper.

Definitions

Hypocomplementemia was defined as a decrease in serum complement levels below the lower normal range given by our laboratory (as detailed above). Hypogammaglobulinemia (HGG) was defined as a serum IgG level <700 mg/dL (12). The different infectious syndromes and acute graft rejection (AR) were defined according to commonly accepted criteria (14–18). Detailed definitions of the outcomes analyzed in the study may be found in the Supporting Information.

Statistical analysis

Quantitative data were shown as the mean \pm standard deviation (SD) or the median with interquartile ranges (Q₁–Q₃). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies with 95% confidence intervals (CIs). Categorical variables were compared using the χ^2 test, Fisher's exact test and McNemar test for repeated measures, as appropriate. Student's t-test or Mann-Whitney U test were applied for continuous variables. The linear associations between the normally distributed variables were assessed by Pearson's correlation coefficients. Patient and infection-free survival curves were estimated by the Kaplan–Meier method, and differences between groups were compared with the log-rank test. Backward stepwise Cox proportional hazards models were used to evaluate the association between hypocomplementemia and both primary and secondary study outcomes. Serum complement levels were also introduced into the models as continuous variables. Results are expressed as hazard ratios (HRs) with 95% CIs. Logistic regression was used to identify predictors of hypocomplementemia at baseline. Those variables found to be significant ($p < 0.05$) in the univariate analysis were included into the model in a backward stepwise fashion. We assessed the goodness of fit of the model using the Hosmer and Lemeshow test. Finally, predictors of hypocomplementemia during the posttransplant period were identified by mixed-effects logistic regression model, in order to take into account the within-subject correlation at different time points (months 1 and 6). The intraclass correlation (ICC) statistic represents the degree of association of the longitudinal data within subject, and specifically indicates the proportion of variance in the data attributable to individuals. A large ICC indicates that there is a large degree of homogeneity within subjects (19). Results are given as odds ratios (ORs) with 95% CIs. All the significance tests were two-tailed. Statistical analysis was performed using SPSS v. 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA), STATA v. 10 (Stata Statistical Software, College Station, TX, USA) and EPIDAT v. 3.1 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain).

Results

Baseline characteristics

We included 270 patients undergoing KT between November 2008 and May 2011 whose main clinical characteristics and posttransplant outcomes are summarized in Table 1. Assessment of serum complement factors at baseline was

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/ajt.12055

Table 1: Clinical characteristics and posttransplant outcome of 270 patients analyzed

Variable	N	(%)
Age of recipient, years (mean ± SD)	54.6 ± 14.4	
Gender (male)	170	(63.0)
Pretransplant comorbidities		
Diabetes mellitus	70	(25.9)
Heart disease	66	(24.4)
Chronic lung disease	36	(13.3)
Chronic liver disease	15	(5.6)
Previous solid organ transplantation	63	(23.3)
≥2 previous transplants	15	(5.6)
Etiology of underlying ESRD		
Glomerulonephritis	58	(21.5)
Diabetic nephropathy	49	(18.1)
Nephroangiosclerosis	35	(13.0)
Polycystosis	34	(12.6)
Chronic interstitial nephropathy	23	(8.5)
Unknown	20	(7.4)
Other	51	(18.9)
Baseline serostatus		
Hepatitis C virus	28	(10.4)
Hepatitis B virus	3	(1.1)
CMV status D+/R-	22	(8.1)
CMV status D-/R-	3	(1.1)
Pretransplant renal replacement therapy		
Hemodialysis	221	(81.9)
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	33	(12.2)
Age of donor, years (mean ± SD)	52.4 ± 16.6	
Type of donor		
Brain-dead donor	183	(67.8)
Donor after cardiac death	77	(28.5)
Living donor	10	(3.7)
Number of HLA mismatches [mean (Q ₁ -Q ₃ range)]	4 (3-5)	
Cold ischemia time, hours (mean ± SD)	16.9 ± 6.7	
Induction therapy		
None	53	(19.6)
Basiliximab	89	(33.0)
Antithymocyte globulin	127	(47.0)
Primary immunosuppression scheme		
Tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroids	240	(88.9)
Tacrolimus, azathioprine, and steroids	28	(10.4)
Posttransplant complications		
Delayed graft function	165	(61.1)
Requirement of surgical intervention ¹	36	(13.3)
At least one episode of AR	63	(23.3)
≥2 episodes of AR	9	(3.3)
Overall patient mortality	17	(6.3)
Infection-related mortality	10	(3.7)
Graft loss	18	(6.7)

AR = acute graft rejection; CMV = cytomegalovirus; ESRD = end-stage renal disease; HLA = human leukocyte antigen; SD = standard deviation.

¹Within the first posttransplant month.

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/ajt.12055

Hypocomplementemia in Kidney Transplantation

performed in all the participants. Samples at months 1 and 6 were available in 240 and 189 patients, respectively. We found no significant differences with regard to posttransplant infection or outcome between patients with immune assessment at months 1 and 6, and those from whom no specimens could be obtained (data not shown).

Posttransplant outcomes

The median follow-up was 493.5 days (Q₁-Q₃ range, 404-738.7 days), with 231 patients (85.5%) reaching at least 12 months (total follow-up of 147 720 transplant-days). All-cause mortality was 6.3% (17 patients died at a median interval from transplantation of 174 days [Q₁-Q₃ range, 65-424 days]). One- and two-year survival rates were 95% and 92%, respectively. Death-censored graft survival at the end of follow-up was 92.9%.

Sixty-three patients (23.3%) had at least one AR episode during the follow-up period (mean, 1.14 ± 0.35 episodes per patient), including 11 cases of increase of serum creatinine without histological confirmation. The median interval to the first episode was 22 days (Q₁-Q₃ range, 12-77.25 days). The treatment for AR was based on the administration of steroid boluses (57 episodes), polyclonal immunoglobulins (32 episodes), plasmapheresis (20 episodes), rituximab (10 episodes) and antithymocyte globulin (5 episodes), alone or in combination.

A total of 147 recipients (54.4%) developed 320 episodes of posttransplant infection (overall incidence rate of 2.16 per 1000 transplant-days). The distribution of clinical syndromes and microorganisms is shown in Table 2.

Timing and impact of hypocomplementemia on outcomes

As shown in Figure 1, the prevalence of C3 hypocomplementemia at baseline and month 1 was 21.5% (95% CI: 17-26%) and 20.4% (95% CI: 15-26%), respectively (p = 0.89), and decreased at month 6 to 11.6% (95% CI: 7-16%) (p = 0.017 compared to baseline). On the contrary, the prevalence of C4 hypocomplementemia significantly rose from 3.7% (95% CI: 1-6%) at baseline to 9.2% (95% CI: 5-13%) at month 1 (p = 0.004) and remained stable at month 6 (7.9%; 95% CI: 4-12%). Only four and five patients exhibited persistently low serum C3 and C4 levels throughout the entire study period, respectively. Figure 2 shows serum complement levels in patients with and without hypocomplementemia at different study time points. Pearson's correlation matrixes revealed a significant positive correlation for both C3 and C4 values at different time points (data available as Supporting Information). We also found a positive correlation between C3 and C4 levels at baseline (r = 0.441; p < 0.001) and months 1 (r = 0.450; p < 0.001) and 6 (r = 0.444; p < 0.001).

Patients with either C3 or C4 hypocomplementemia at baseline did not experience higher rates of infection in the early period (first month) when compared to those with

Fernández-Ruiz et al.

Table 2: Site and causative agents involved in the 320 episodes of posttransplant infection

	N	(%)
Clinical syndrome¹		
APN	54	(16.9)
CMV viral syndrome	74	(23.1)
Incisional surgical site infection	40	(12.5)
Pneumonia and LRTI	34	(10.6)
Skin and soft-tissue infection	23	(7.2)
Digestive tract infection	36	(11.3)
Intraabdominal infection	14	(4.4)
Bloodstream infection	64	(20.0)
Infective endocarditis	3	(0.9)
Other	11	(3.4)
Isolated microorganisms		
Bacteria		
<i>Enterococcus</i> spp.	16	(5.0)
Coagulase-negative staphylococci	15	(4.7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	(1.6)
<i>Viridans</i> group streptococci	2	(0.6)
<i>Escherichia coli</i>	44	(13.7)
<i>Klebsiella</i> spp.	7	(2.2)
Other <i>Enterobacteriaceae</i>	8	(2.5)
<i>Pseudomonas</i> spp.	21	(6.6)
Other nonfermenting gram negative bacilli	2	(0.6)
<i>Clostridium difficile</i>	14	(4.4)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	2	(0.6)
Polymicrobial	5	(1.6)
Other	2	(0.6)
No microbiological diagnosis	30	(9.4)
Viruses		
CMV	93	(29.1)
HSV-1 and 2	11	(3.4)
Varicella-zoster virus	7	(2.2)
Other	11	(3.4)
Fungi		
<i>Candida</i> spp.	14	(4.4)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	(0.6)
Other	1	(0.3)
Parasites (<i>Leishmania donovani</i> complex)	3	(0.9)

APN = acute pyelonephritis; CMV = cytomegalovirus; HSV = herpes simplex virus; LRTI = lower respiratory tract infection.

¹The total number may be less than the sum of each syndrome because more than one infection was simultaneously present in some patients (i.e. bloodstream infection associated to focal infection).

normal pretransplant levels. Recipients with C4 hypocomplementemia at month 1 only exhibited a higher cumulative incidence of acute pyelonephritis ($p = 0.046$) during the intermediate period, with no differences in other types of infection. Finally, there were neither significant differences in the incidence of infection during the late period in patients with or without C4 hypocomplementemia at month 6 (data not shown).

The incidences of infection during the posttransplant periods according to serum C3 levels are shown in Table 3. Patients with C3 hypocomplementemia at month 1 had a higher cumulative incidence of overall infection ($p = 0.002$), bacterial infection ($p = 0.004$), pneumonia

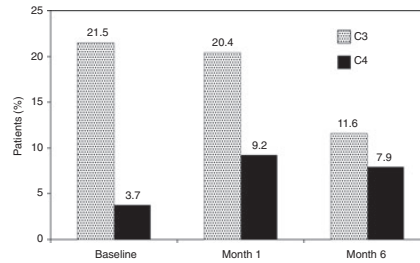


Figure 1: Prevalence of C3 and C4 hypocomplementemia throughout the first 6 months after KT (C3 levels: $p = 0.015$ for the difference between baseline and month 6; C4 levels: $p = 0.004$ for the difference between baseline and month 1).

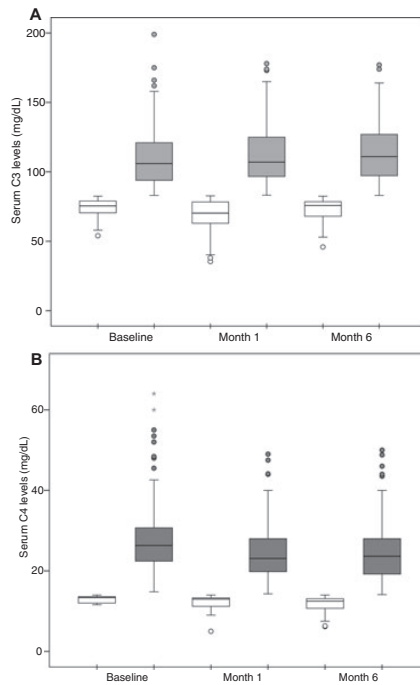


Figure 2: Box-whisker plots showing serum complement levels in patients with (blank boxes) and without hypocomplementemia (gray boxes): C3 levels (2A) and C4 levels (2B) [median (dot), interquartile range (box), maximum and minimum values (whiskers), outlier values (circles) and extreme values (asterisks)].

Table 3: Incidence of posttransplant infection according to the presence or absence of C3 hypocomplementemia

Incidence of infection in the intermediate posttransplant period (months 1–6) (%)	C3 hypocomplementemia at month 1		
	Present (n = 49)	Absent (n = 191)	p-Value
Any infection	28 (57.1)	63 (33.0)	0.002
Episodes (mean number ± SD)	1.2 ± 1.3	0.6 ± 0.9	0.000
Incidence rate ¹	8.2	4.0	0.000
Bacterial infection	18 (36.7)	34 (17.8)	0.004
Bloodstream infection	6 (12.2)	13 (6.8)	0.167
Pneumonia	6 (12.2)	8 (4.2)	0.043
APN	6 (12.2)	10 (5.2)	0.082
Intraabdominal infection	3 (6.1)	6 (3.1)	0.271
Fungal infection	6 (12.2)	6 (3.1)	0.019
CMV disease	17 (34.7)	42 (22.0)	0.065
CMV end-organ disease	4 (8.2)	8 (4.2)	0.212
Non-CMV viral infection	7 (14.3)	8 (4.2)	0.017
HSV or VVZ infection	6 (12.2)	3 (1.6)	0.003

Incidence of infection in the posttransplant period (>6 months) (%)	C3 hypocomplementemia at month 6		
	Present (n = 22)	Absent (n = 167)	p-Value
Any infection	6 (27.3)	26 (15.6)	0.142
Episodes (mean number ± SD)	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.7	0.377
Incidence rate ¹	0.93	0.59	0.373
Bacterial infection	5 (22.7)	16 (9.6)	0.077
Bloodstream infection	2 (9.1)	5 (3.0)	0.190
Pneumonia	2 (9.1)	5 (3.0)	0.190
Acute pyelonephritis	1 (4.5)	8 (4.8)	0.718
CMV disease	3 (13.6)	12 (7.2)	0.246
Non-CMV viral infection	1 (4.5)	8 (4.8)	0.718

APN = acute pyelonephritis; CMV = cytomegalovirus; HSV = herpes simplex virus; SD = standard deviation; VVZ = varicella-zoster virus.

¹Data presented as number of infectious episodes per 1000 transplant-days.

(p = 0.043), fungal infection (p = 0.019), and non-CMV viral infection (p = 0.017) during the intermediate period (months 1–6). We also found a trend toward an increased cumulative incidence of CMV disease (p = 0.065). The incidence rate of overall infection and the mean number of infectious episodes per recipient were also higher in these patients as compared to those with normal C3 levels at month 1 (p < 0.001 for both). The presence of C3 hypocomplementemia at month 6 was associated with a higher cumulative incidence of bacterial infection in the late period (>6 months), although the difference did not attain statistical significance (p = 0.077). Figures 3 and 4 show overall infection-free survival during the intermediate period and bacterial infection-free survival during the late period, respectively.

When focused specifically on the 31 patients (12.9%) with “*de novo*” C3 hypocomplementemia at month 1 (thus with normal levels at baseline), we found a higher cumulative incidence of bacterial infection during the intermediate

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/ajt.12055

Hypocomplementemia in Kidney Transplantation

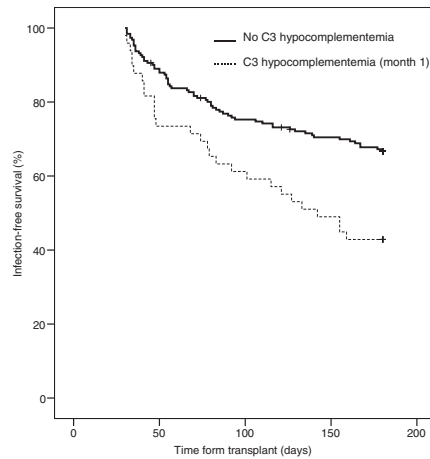


Figure 3: Kaplan–Meier curves of infection-free survival throughout the intermediate period (months 1–6) according to the presence of C3 hypocomplementemia at month 1 (log-rank test; p = 0.001).

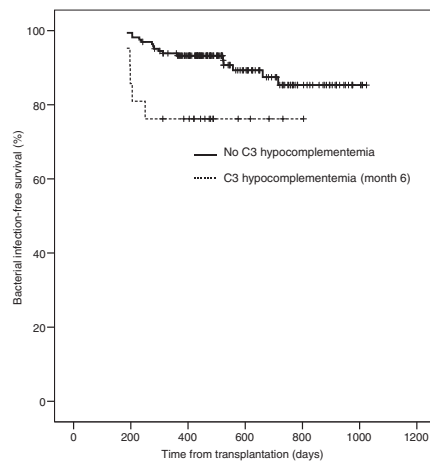


Figure 4: Kaplan–Meier curves of bacterial infection-free survival throughout the late period (>6 months) according to the presence of C3 hypocomplementemia at month 6 (log-rank test; p = 0.017).

Fernández-Ruiz et al.

Table 4: Multivariate analysis of risk factors for posttransplant infection (Cox proportional hazards model)

	Adjusted HR	95% CI	p-Value
Overall infection in the intermediate period (months 1–6) ¹			
Recipient age, years*	1.032	1.014–1.050	<0.001
Posttransplant renal artery stenosis	2.017	1.168–3.481	0.012
Serum albumin levels at month 1, g/dL*	0.542	0.361–0.814	0.003
C3 hypocomplementemia at month 1	1.911	1.175–3.108	0.009
Bacterial infection in the intermediate period (months 1–6) ²			
Recipient age, years*	1.033	1.008–1.058	0.008
Serum albumin levels at month 1, g/dL*	0.371	0.229–0.602	<0.001
C3 hypocomplementemia at month 1	2.130	1.167–3.899	0.014
Overall infection in the late period (>6 months) ³			
Previous SOT	3.118	1.438–6.760	0.004
Graft function at month 6, mL/min*	0.973	0.951–0.995	0.018
Bacterial infection in the late period (>6 months) ⁴			
C3 hypocomplementemia at month 6	3.347	1.061–10.562	0.039

AR = acute graft rejection; CI = confidence interval; ESRD = end-stage renal disease; HGG = hypogammaglobulinemia; HLA = human leukocyte antigen; HR = hazard ratio; SOT = solid organ transplantation.

*Per unitary increment.

¹Model adjusted for number of pretransplant chronic comorbidities, glomerulonephritis as underlying ESRD, number of HLA mismatches, basiliximab as induction therapy, and requirement for reoperation within the first month.

²Model adjusted for number of pretransplant chronic comorbidities, diabetes mellitus as pretransplant condition, requirement for reoperation within the first month, occurrence of AR within the first month, and posttransplant renal artery stenosis.

³Model adjusted for recipient age, peripheral vascular disease as pretransplant condition, administration of steroid boluses within the intermediate period (months 1–6), serum albumin levels at month 6, IgG HGG at month 6, C3 hypocomplementemia at month 6, and graft function (MDRD-4) at month 6.

⁴Model adjusted for recipient age, number of pretransplant chronic comorbidities, peripheral vascular disease as pretransplant condition, glomerulonephritis as underlying ESRD, occurrence of AR within the first month, serum albumin levels at month 6, IgG HGG at month 6, and graft function (MDRD-4) at month 6.

period in this subgroup as compared with those with persistent hypocomplementemia (at baseline and month 1) and those with persistently normal C3 levels at both time points (41.9% vs. 27.8% vs. 15.8%, respectively; $p = 0.003$).

The Table 4 summarizes the results of multivariate Cox proportional hazards models for posttransplant infection. The presence of C3 hypocomplementemia at month 1 was identified as an independent risk factor for overall infection (HR 1.911; 95% CI: 1.175–3.108; $p = 0.009$) and bacterial infection (HR 2.130; 95% CI: 1.167–3.899; $p = 0.014$) during the intermediate period. C3 hypocomplementemia at month 6 predicted the occurrence of bacterial infection (HR 3.347; 95% CI: 1.061–10.562; $p = 0.039$) in the late period. When complement levels were analyzed as continuous variables, serum C3 levels at month 1 continued to exert an independent—and protective—effect on the incidence of overall (HR per unitary increment, 0.988; 95% CI: 0.979–0.997; $p = 0.007$) and bacterial infection (HR per unitary increment, 0.980; 95% CI: 0.968–0.992; $p = 0.001$) during the intermediate period.

After excluding the only patient who died within the first month (day 14), we found that those recipients with C3 hypocomplementemia at month 1 had worse 2-year survival compared to those with normal values (84% vs. 94%; $p = 0.029$; Figure 5). Infection accounted for most of deaths in both groups (83.3% and 62.5%, respectively).

Due to the low number of deaths, we could not perform a unique Cox regression model with all the potential risk factors for all-cause mortality. We alternatively attempted an exploratory approach by performing different Cox models that incorporated a maximum of two variables at a time—including C3 hypocomplementemia at month 1. After adjusting in pairs for recipient age, number of pretransplant chronic comorbidities, serum albumin levels at month 1, requirement for reoperation within the first month, and occurrence of delayed graft function, the presence of C3 hypocomplementemia remained as an independent risk factor for all-cause mortality, or showed a near-significant association with this outcome (minimum HR 2.709; 95% CI: 0.932–7.870; $p = 0.067$; remaining data not shown).

Risk factors for posttransplant hypocomplementemia

We further analyzed the risk factors for the development of C3 hypocomplementemia. We did not find any correlation between markers of liver function—serum albumin levels and INR—and complement levels at months 1 or 6, as assessed by Pearson's correlation coefficients. With regards to humoral immunity, patients with IgG HGG showed a lower prevalence of C3 hypocomplementemia at month 6 (2.4% vs. 13.7%; $p = 0.031$), with no differences at other time points (data available as Supporting Information). Only recipient age was associated with C3 hypocomplementemia at baseline in the multivariate analysis. The mixed-effects logistic regression model identified C3 hypocomplementemia at baseline, graft function

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/ajt.12055

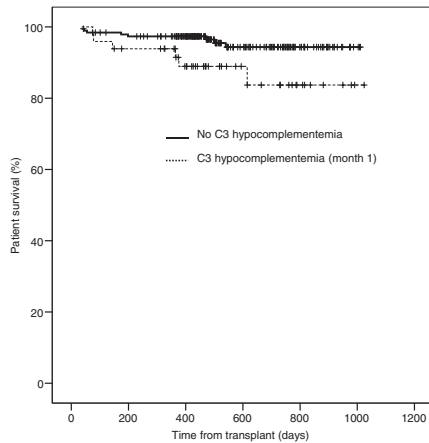


Figure 5: Kaplan-Meier curves of patient survival according to the presence of C3 hypocomplementemia at month 1 (log-rank test; $p = 0.029$).

at month 1, and the time interval elapsed from transplantation as predictors of the posttransplant occurrence of C3 hypocomplementemia throughout the first 6 months after transplantation (Table 5).

Discussion

The risk of infection linked to over-immunosuppression remains as one of the major concerns faced by clinicians involved in the contemporary management of SOT recipients. Therefore, the search for immunological markers easily available at the bedside has become critical (20). We found that the presence of C3 hypocomplementemia at month 1 after KT is associated with a twofold increase in the risk of overall and bacterial infection in the intermediate period (months 1–6) after adjusting for potential confounders—including serum albumin levels as surrogate marker of nutritional status and liver function. Analogously, C3 hypocomplementemia at month 6 increases by 3.3-fold the risk of late bacterial infection. To our knowledge, the present is the first study addressing the clinical value of monitoring of serum complement factors to identify KT recipients at highest risk of posttransplant infection. Moreover, our findings are in line with those reported in other types of SOT (10,11).

End-stage renal disease (ESRD) due to diabetic nephropathy and recipient age were the only factors independently related to C3 hypocomplementemia at baseline in our cohort—exerting a protective effect in both cases. A population-based cohort study demonstrated that C3 lev-

Hypocomplementemia in Kidney Transplantation

els were higher in men who subsequently developed diabetes, probably reflecting a low-grade systemic inflammation (21). Serum C3 levels have been also associated with waist adiposity and insulin resistance, as adipose tissue may act as an alternative site of synthesis of this component (22). Therefore, diabetic patients with ESRD seem to be protected to some degree against the development of hypocomplementemia.

There is scarce information regarding the kinetics of complement levels after KT (23–25). Barnes et al. did not find significant differences between pre- and posttransplant values of C3 (23). Accordingly, the prevalence of C3 hypocomplementemia was similar at baseline and at month 1 in the present cohort ($\approx 20\%$), and only fell in the late period. A recent study reported a prevalence of C3 hypocomplementemia very close to ours (19%) in stable KT recipients (25). The presence of low complement levels already at baseline emerged as the strongest risk factor for the occurrence of C3 hypocomplementemia throughout the first 6 months. The incorporation into the Banff criteria of C4d staining in the peritubular capillaries exemplifies the role of the classical activation pathway in the antibody-mediated alloreactivity (26). The occurrence of AR has been associated with a decrease in serum complement levels (23,25). We found that AR within the first month increased the risk of C3 hypocomplementemia during the subsequent period. Interestingly, graft function at month 1 emerged as an independent predictor of C3 hypocomplementemia, maybe reflecting the deleterious impact of early AR episodes on the serum complement levels. Therefore, we hypothesize that low complement levels are plausibly secondary to rejection-associated complement activation, rather than to a defective synthesis. Supporting this, we did not find any correlation between markers of liver function and complement levels at months 1 or 6. Unfortunately, the lack of measurements of complement activation hinders further insight into the mechanisms leading to hypocomplementemia.

The importance of the innate immunity—and specifically complement system—is increasingly being recognized in situations of impaired adaptive immunity such as immunosuppression following SOT (27). Hypocomplementemia at baseline did not have any significant effect on the risk of early infection in our study. This finding may be justified by the predominance of donor-derived and device-associated nosocomial infections during the first post-transplant month, with a minor impact of recipient's net immunosuppressive state (20). On the contrary, the presence of C3 hypocomplementemia beyond the first month exerted a significant impact on the incidence of overall and bacterial infection, as well as on some specific infectious syndromes.

Cumulative incidence of pneumonia was threefold higher in those recipients with lower C3 levels, with the difference achieving statistical significance during the

Fernández-Ruiz et al.

Table 5: Risk factors for the occurrence of C3 hypocomplementemia at baseline (binary logistic regression model) and throughout the first 6 months after kidney transplantation (mixed-effects logistic regression model)

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p-Value	OR	95% CI	p-Value
C3 hypocomplementemia at baseline¹						
Recipient age, years*	0.97	0.95–0.99	0.014	0.98	0.95–0.99	0.036
Diabetic nephropathy	0.36	0.14–0.95	0.034	–	–	–
C3 hypocomplementemia during the posttransplant period²						
Pretransplant chronic lung disease	2.34	1.04–5.27	0.035	–	–	–
Pretransplant chronic liver disease	3.13	0.77–12.85	0.122	–	–	–
Pretransplant periodic hemodialysis	4.32	1.28–14.59	0.011	–	–	–
Previous SOT	4.41	1.21–16.13	0.037	–	–	–
Antihepatitis C virus positive status	5.04	1.85–13.75	0.003	–	–	–
C3 hypocomplementemia at baseline	3.24	1.61–6.55	0.001	6.80	2.42–19.12	<0.001
Induction therapy	2.40	0.89–6.46	0.074	–	–	–
AR within the first month	2.62	1.19–5.80	0.014	–	–	–
Administration of steroid boluses	3.48	0.99–12.27	0.063	–	–	–
Graft function at month 1, mL/min*	0.96	0.94–0.98	<0.001	0.97	0.94–0.99	0.005
IgG HGG at month 6	0.79	0.70–0.91	0.031	–	–	–
Time interval since transplant						
Baseline to month 1	1	–	–	–	–	–
Months 1–6	0.40	0.19–0.82	0.012	0.41	0.20–0.83	0.014

AR = acute graft rejection; CI = confidence interval; HGG = hypogammaglobulinemia; SOT = solid organ transplantation; OR = odds ratio.

*Per unitary increment.

¹Hosmer and Lemeshow test: p value = 0.428.

²Interclass correlation statistic: 0.390.

intermediate period. Experimental models of pneumonia have highlighted the role of C3 in pulmonary defence against *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* (28,29), further supported by previous clinical observations (30). Both CMV and other viral infections were also more frequent in patients with hypocomplementemia at month 1. C3 has been shown to be critical in B cell activation and T cell dependent antibody responses during viral infections, as demonstrated for herpes simplex (31) or influenza viruses (32). MBL deficiency has been identified as a risk factor for the development of CMV infection in KT recipients in some studies (6), but not in others (8). Finally, the cumulative incidence of fungal infection during the intermediate period, mainly due to *Candida* spp., was higher among hypocomplementemic patients. It has been reported that C3-deficient mice are exposed to an increased susceptibility to *Candida* infection and delayed fungal clearance (33). Sarmiento et al. found no association between C3 levels and the incidence of fungal infection—mainly invasive aspergillosis—in heart transplant recipients (11).

Despite the pivotal role of C4 in the classical activation pathway of the complement system, we found no evidence that serum levels of this component influence the risk of infection. This observation is supported by that previously reported by Wahrman et al. showing no significant effect of C4 gene copy-number variations—the number of inherited copies closely correlates with serum C4 concentrations and complement activity—on kidney allograft outcome or infection-related hospitalization rate (34).

Interestingly, C3 hypocomplementemia was associated with a worse patient survival in the present study. On the opposite, Berger et al. demonstrated superior graft and patient survival in KT (35) and pancreas–kidney recipients (36) with low MBL levels. One explanation for these apparently conflicting findings might lie in the fact that most of graft losses and deaths in these later studies were due to treatment-resistant AR and cardiovascular complications, whereas most of deaths in our cohort were infection-related. Therefore, complement-status seems to be a two-sided sword in posttransplant outcome, with different impacts on the risk of infection, ischemia-reperfusion damage, and cardiovascular events.

Despite its notable strengths—large sample size, prospective design with scheduled sampling times, accurate assessment of the type of infection in each posttransplant period, and relatively low loss-to-follow-up rate—the present study also has some limitations. The single center nature of our findings hinders its generalizability to other institutions with different posttransplant strategies in prophylaxis or routine laboratory testing. We did not perform functional complement assays (i.e. CH50) or measure cleavage products of C3 or C4 (i.e. C3d or C4d). As commented, such limitation prevented us from assessing whether hypocomplementemia was the result of complement activation, impaired synthesis, or increased consumption. In addition, we did not compare the prognostic impact of C3 hypocomplementemia and MBL-deficient states, whose predictive value for posttransplant infection is supported by an increasing amount of evidence (2–8). Our study also lacks

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/ajt.12055

measurement of C-reactive protein (CPR) levels, the comparison of which with serum complement would have been of interest. Nevertheless, the inclusion of serum albumin as inverse acute-phase reactant in all the multivariate models could partially overcome this limitation, since albumin levels exhibits a strong and negative correlation with CPR in hemodialysis patients (37). Finally, the sample size might not be large enough to detect differences in incidence rates of late infection.

In conclusion, this study suggests that a simple monitoring schedule of serum C3 levels during the posttransplant follow-up can effectively predict the risk of infectious complications in KT recipients. The measurement of serum complement levels by nephelometry is an affordable and broadly available technique, thus contributing to the eventual cost-effectiveness of such strategy. Further studies are needed to enlighten the role of complement system in the pathogenesis of infection after KT, as well as its potential clinical implications. Meanwhile, our findings may open new perspectives in the design of individualized approaches for posttransplant prophylaxis, tapering of immunosuppression, and preemptive therapy.

Acknowledgments

Funding sources: This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS] project 11/01538) and the Fundación Mutua Madrileña de Investigación Médica (FMM Grant 2010/0015). Mario Fernández-Ruiz holds a research training contract "Rio Hortega" (CM11/00187) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Instituto de Salud Carlos III). Francisco López-Medrano is currently receiving a grant from the Fundación Mutua Madrileña.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: Structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 2011; 17: 317–329.
2. Berger SP, Daha MR. Emerging role of the mannose-binding lectin-dependent pathway of complement activation in clinical organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 28–33.
3. Worthley DL, Johnson DF, Eisen DP, et al. Donor mannose-binding lectin deficiency increases the likelihood of clinically significant infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 410–417.
4. Cervera C, Balderrama D, Suárez B, et al. Donor mannose-binding lectin gene polymorphisms influence the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1217–1224.

Hypocomplementemia in Kidney Transplantation

5. de Rooij BJ, van Hoek B, ten Hove WR, et al. Lectin complement pathway gene profile of donor and recipient determine the risk of bacterial infections after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 2010; 52: 1100–1110.
6. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, Meylan PR. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 83: 359–362.
7. Broeders EN, Wissing KM, Hazzan M, et al. Evolution of immunoglobulin and mannose binding protein levels after renal transplantation: Association with infectious complications. *Transpl Int* 2008; 21: 57–64.
8. Verschuren JJ, Roos A, Schaapherder AF, et al. Infectious complications after simultaneous pancreas-kidney transplantation: A role for the lectin pathway of complement activation. *Transplantation* 2008; 85: 75–80.
9. Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 333–340.
10. Carbone J, Micheloud D, Salcedo M, et al. Humoral and cellular immune monitoring might be useful to identify liver transplant recipients at risk for development of infection. *Transpl Infect Dis* 2008; 10: 396–402.
11. Sarmiento E, del Pozo N, Gallego A, et al. Decreased levels of serum complement C3 and natural killer cells add to the predictive value of total immunoglobulin G for severe infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 526–539.
12. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, et al. Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant* 2012; 12: 2763–2773.
13. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461–470.
14. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128–140.
15. Rubin RH. Infection in the organ transplant recipient. In: Rubin RH, Young LS, Russell P, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host* (3rd edn). New York: Plenum Publishing Corporation, 1981; pp. 629–705.
16. Lungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094–1097.
17. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813–1821.
18. European Expert Group on Renal Transplantation (EBPG); European Renal Association (ERA-EDTA); European Society for Organ Transplantation (ESOT). *European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1)*. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(Suppl 7): 1–85.
19. Hedeker D, Gibbons RD. *Mixed-effect regression models for binary outcomes*. Longitudinal data analysis. New Jersey: Wiley, 2006: 149–186.
20. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: Risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24: 273–283.

American Journal of Transplantation
doi: 10.1111/ajt.12055

Fernández-Ruiz et al.

21. Engström G, Hedblad B, Eriksson KF, Janzon L, Lindgärde F. Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: A population-based cohort study. *Diabetes* 2005; 54: 570–575.
22. Onat A, Can G, Rezvani R, Cianflone K. Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1171–1179.
23. Barnes RM, Hart CA, Alexander LC, Steen S. Immunological evaluation of renal transplant patients: Changes in levels of beta-2-microglobulin, immunoglobulins and complement components during graft rejection. *J Clin Lab Immunol* 1983; 12: 17–22.
24. Kumar P, Kodlin D, Marks C, Leech SH. Predictive value of serum complement (C3) in renal allograft rejection. *Br J Surg* 1980; 67: 500–502.
25. Sonkar GK, Usha, Singh RG. Study on the role of humoral immunity in renal transplant rejections and its correlation with histopathological findings. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2011; 22: 901–910.
26. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: New diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; 4: 1562–1566.
27. Asgari E, Zhou W, Sacks S. Complement in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 486–491.
28. Kerr AR, Paterson GK, Riboldi-Tunncliffe A, Mitchell TJ. Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. *Infect Immun* 2005; 73: 4245–4252.
29. Mueller-Ortiz SL, Drouin SM, Wetsel RA. The alternative activation pathway and complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun* 2004; 72: 2899–2906.
30. Ekdahl K, Tuedsson L, Sjöholm AG, Braconier JH. Complement analysis in adult patients with a history of bacteremic pneumococcal infections or recurrent pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 111–117.
31. Da Costa XJ, Brockman MA, Alicot E, et al. Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12708–12712.
32. Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* 2002; 8: 373–378.
33. Tsoni SV, Kerrigan AM, Marakalala MJ, et al. Complement C3 plays an essential role in the control of opportunistic fungal infections. *Infect Immun* 2009; 77: 3679–3685.
34. Wahrmann M, Döhler B, Ruhenstroth A, et al. Genotypic diversity of complement component C4 does not predict kidney transplant outcome. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 367–376.
35. Berger SP, Roos A, Mallat MJ, Fujita T, de Fijter JW, Daha MR. Association between mannose-binding lectin levels and graft survival in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1361–1366.
36. Berger SP, Roos A, Mallat MJ, et al. Low pretransplantation mannose-binding lectin levels predict superior patient and graft survival after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2416–2422.
37. Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 141–149.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Supplemental Materials and Methods: includes descriptions of the immunosuppressive and prophylactic regimens used in the present study and the definitions for different infectious syndromes, AR, delayed graft function and graft loss.

Supplemental Results: includes correlation matrixes of serum complement levels at different time points, correlations between serum complement levels and markers of liver function (serum albumin and INR) at different time points, and associations between C3 and C4 hypocomplementemia and IgG HGG at different time points.

Anexo 4.

ORIGINAL ARTICLE

Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation

Mario Fernández-Ruiz,¹ Francisco López-Medrano,¹ Luis M. Allende,² Amado Andrés,³ Ana García-Reyne,¹ Carlos Lumbreras,¹ Rafael San-Juan,¹ José M. Morales,³ Estela Paz-Artal² and José M. Aguado¹

1 Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre". Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12). School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

2 Department of Immunology, Hospital Universitario "12 de Octubre". Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12). School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

3 Department of Nephrology, Hospital Universitario "12 de Octubre". Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12). School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Keywords

cytomegalovirus, kidney transplantation, lymphocytopenia, monitoring, opportunistic infection, peripheral blood lymphocyte subpopulations.

Correspondence

Mario Fernández-Ruiz MD, Unit of Infectious Diseases. Hospital Universitario "12 de Octubre". Centro de Actividades Ambulatorias, 2ª planta, bloque D. Avda. de Córdoba, s/n. Postal code 28041. Madrid, Spain.
Tel.: +34 913908000;
fax: +34 914695775;
e-mail: mario_fdezruiz@yahoo.es

Conflicts of interest

All the authors declare no conflict of interest.

This study was partially presented at the 50th Annual Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston, MA (September 12–15, 2010) [poster K-1744], and at the 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Milan, Italy (May 7–10, 2011) [poster P2077].

Received: 3 November 2013

Revision requested: 26 January 2014

Accepted: 16 March 2014

doi:10.1111/tri.12321

Summary

Serial monitoring of peripheral blood lymphocyte subpopulations (PBLs) counts might be useful in predicting post-transplant opportunistic infection (OI) after kidney transplantation (KT). PBLs were prospectively measured in 304 KT recipients at baseline and post-transplant months 1 and 6. Areas under receiver operating characteristic curves were used to evaluate the accuracy of different subpopulations in predicting the occurrence of overall OI and, specifically, cytomegalovirus (CMV) disease. We separately analyzed patients not receiving ($n = 164$) or receiving ($n = 140$) antithymocyte globulin (ATG) as induction therapy. In the non-ATG group, a $CD8^+$ T-cell count at month 1 $< 0.100 \times 10^3$ cells/ μ l had negative predictive values of 0.84 and 0.86 for the subsequent occurrence of overall OI and CMV disease, respectively. In the multivariate Cox model, a $CD8^+$ T-cell count $< 0.100 \times 10^3$ cells/ μ l was an independent risk factor for OI (adjusted hazard ratio: 3.55; P -value = 0.002). In the ATG group, a $CD4^+$ T-cell count at month 1 $< 0.050 \times 10^3$ cells/ μ l showed negative predictive values of 0.92 for the subsequent occurrence of overall OI and CMV disease. PBLs monitoring effectively identify KT recipients at low risk of OI, providing an opportunity for individualizing post-transplant prophylaxis practices.

Introduction

Infection remains one of the main causes of morbidity and mortality after kidney transplantation (KT) [1,2]. Current immunosuppressive regimens are mostly targeted against the adaptive arm of the immune system [3]. Monitoring of cell-mediated immunity (CMI) has been proposed as a promising strategy to reduce the incidence of post-transplant infection by individualizing immunosuppressive therapy. This monitoring may rely on *in vitro* functional measures after nonspecific (i.e., phytohemagglutinin) or specific antigen stimulation [i.e., cytomegalovirus (CMV) viral peptides] [4–6]. In addition, an alternative approach to the CMI status could be based on quantitative surrogate parameters, such as the counts of total lymphocyte and peripheral blood lymphocyte subpopulations (PBLs). Kinetics of PBLs could be able to identify recipients at risk of post-transplant infection in a similar way than that of other immunocompromised hosts, such as those infected with human immunodeficiency virus (HIV) [7,8].

Others and we have analyzed the performance of monitoring of PBLs in predicting the occurrence of infection in different transplant populations [9–14]. Nevertheless, previous studies focused on KT are old, retrospective in design, comprised small sample sizes or included only HIV-infected recipients [11–13]. On the other hand, it is well recognized the long-lasting and profound dose-dependent T-cell depletion induced by polyclonal antithymocyte preparations [3,15–17]. Therefore, the assessment of the predictive capacity of PBLs for post-transplant infection should take into account the type of induction therapy used. Notwithstanding this rationale, some of the previous studies did not separately control for the effect of such a variable [11].

This study was aimed at analyzing the association between total lymphocyte and PBL counts—as surrogate markers of post-transplant CMI status—and the occurrence of opportunistic infection in a cohort of KT recipients stratified by use of antithymocyte globulin (ATG) as induction therapy.

Patients and methods

Study population

Beginning in November 2008, all consecutive adult patients who underwent KT at the University Hospital “12 de Octubre” (Madrid, Spain) are being enrolled in a prospective immune status assessment that includes measurements of total lymphocyte and PBL counts, serum immunoglobulin levels, and serum complement levels at different time points, as detailed below and elsewhere [18,19]. Patients with known pretransplant primary immunodeficiencies or

HIV infection and those who died or developed graft loss within the first week after transplantation are excluded. Our Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol, and written informed consent is obtained from all participants prior to their inclusion. This study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki (2008 version) and the Declaration of Istanbul.

Immune status assessment

Whole-blood samples were collected just before transplantation (baseline) and at post-transplant months 1 and 6 and analyzed within 18 h at the Department of Immunology. Whole blood (50 µl) was stained with 10 µl of BD Multitest 6-color TBNK reagent in Trucount tubes for 15 min. Red blood cells were lysed using fluorescence-activated cell sorting lysing solution. Determination of PBLs was performed with a FACSCanto II flow cytometer, and data analyzed by FACSCanto clinical software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) [20].

Study design

Patients were enrolled at the time of transplantation and followed for at least 1 year, unless death or graft loss occurred earlier. We divided the post-transplant follow-up period in three intervals: early (first month), intermediate (months 1–6), and late (>6 months). All the patients were seen regularly in our outpatient transplant clinic. The *primary study outcomes* were the occurrence of overall opportunistic infection (including CMV disease, either viral syndrome or end-organ disease) as defined below and, independently, the occurrence of CMV disease during each post-transplant period. All the episodes of infection were prospectively collected by an infectious disease specialist who was unaware of the patient's immunological status. We pre-established two different subgroups of patients: those who received ATG as induction (ATG group) and those who received anti-CD25 monoclonal antibodies or no induction therapy (non-ATG group).

Immunosuppression and prophylaxis regimens

In an attempt to minimize the risk of calcineurin inhibitor (CNI)-related nephrotoxicity, all recipients of organs from donors after circulatory death (DCD) underwent induction with intravenous (IV) rabbit ATG (ATG-Fresenius, 1.00 mg/kg daily for 5–7 days), with the delayed introduction of the CNI from day 6. Recipients at high immunological risk—peak panel-reactive antibody >50%, second kidney transplant in case the first graft was lost to rejection within 2 years, or those receiving a third or fourth kidney

graft—also received ATG induction for 1–3 days with the early initiation of a CNI from day 0. Basiliximab induction (20 mg on days 0 and 4) was used in patients at high risk of CNI-related nephrotoxicity due to advanced age or pre-transplant comorbidities, with the delayed introduction of the CNI from day 5. Maintenance immunosuppression consisted of tacrolimus (0.1 mg/kg daily, adjusted to a target level of 10–15 ng/ml for the first month and 5–10 ng/ml for maintenance); mycophenolate mofetil (1000 mg twice daily) or mycophenolic acid (360 mg twice daily); and prednisone (1 mg/kg daily with progressive tapering).

All patients received a single dose of IV cefazolin preoperatively. Prophylaxis for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia with trimethoprim–sulfamethoxazole (160/800 mg three times weekly) was administered for 9 months. In those patients at high risk for CMV disease (serology mismatch [donor positive (D+) and recipient negative (R–)] or induction with ATG), either IV ganciclovir (5 mg/kg daily) or oral valganciclovir (900 mg daily) was administered for 3 months. As neither systematic CMV viremia monitoring nor pre-emptive therapy was performed during the study period in the intermediate-risk group (R+ patients not receiving ATG), we did not include the occurrence of asymptomatic CMV viremia within the analysis of opportunistic infection.

Definitions

Opportunist infections were defined as those due to predominantly intracellular bacteria (mycobacteria, *Nocardia* spp., *Legionella* spp. and *Listeria monocytogenes*), herpesviruses [CMV, herpes simplex virus (HSV) and varicella-zoster virus (VZV) and Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease], polyomaviruses [polyomavirus BK-associated nephropathy (PyVAN)], yeasts (*Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.), molds, *Pneumocystis jiroveci*, and parasites (*Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp.) [13,21,22]. Bloodstream, intra-abdominal, surgical site, and urinary tract infections due to *Candida* spp. were excluded as these episodes are usually related to previous surgery or indwelling catheters rather than to the CMI status. Tuberculosis was diagnosed if *Mycobacterium tuberculosis* was isolated by culture or if *M. tuberculosis* DNA was identified by polymerase chain reaction (PCR) assay from a representative clinical sample; patients for whom tuberculosis was demonstrated histopathologically were also accepted [23]. CMV disease included viral syndrome (defined by the demonstration of CMV by pp65 antigenemia or a PCR-based assays plus one or more of the following: fever; new onset malaise; leukopenia; atypical lymphocytosis; thrombocytopenia; or elevation of ALT or AST higher than two times the upper limit of normal) or end-organ disease [24]. Invasive

fungal infection was defined as per the criteria proposed by the European Organization on Research and Treatment in Cancer and the Mycoses Study Group [25]. Only proven or probable cases were included. Pretransplant immunosuppressive therapy was defined as the use of corticosteroids (prednisone ≥ 5 mg daily for >2 weeks) or other immunosuppressive drugs (i.e., rituximab or cyclophosphamide) within 6 months before transplantation. Delayed graft function denotes the need for dialysis within the first week after transplantation. Acute graft rejection was suspected in case of an elevation of the serum creatinine and diagnosed by histological examination if possible [26]. Graft loss was defined as permanent return to dialysis or retransplantation.

Statistical analysis

Both cumulative incidences and incidence rates for each post-transplant period (early, intermediate or late) were calculated using as denominators the number of patients with available samples for PBLs measurement at the beginning of each period. Quantitative data were shown as the mean \pm standard deviation (SD) or the median with interquartile range (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Categorical variables were compared using the chi-squared test, whereas Student's T-test or U Mann–Whitney test was applied for continuous variables. Areas under receiver operating characteristic curves (auROC) were employed to assess the diagnostic accuracy of total lymphocyte and each PBL in predicting the occurrence of the primary study outcomes during the different post-transplant periods in both ATG and non-ATG groups. The best cut-off values were then assessed through the calculations of sensitivity and specificity. Survival curves to first episode of opportunistic infection or CMV disease were plotted by the Kaplan–Meier method, and differences between groups were compared with the log-rank test. Univariate and multivariate (backward conditional selection) Cox regression models were used to evaluate the association between the most predictive parameters identified by auROC analysis and the primary study outcomes. Some variables not achieving statistical significance in the univariate analyses were forced into the multivariate models due to its clinical relevance. Results were expressed as hazard ratios (HRs) with 95% confidence intervals (CIs). Correlations between recipient age and clinically relevant PBL counts were assessed by Pearson's correlation coefficients (r). All the significance tests were two-tailed. Statistical analysis was performed using SPSS v. 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA) and EPIDAT v. 3.1 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain).

Results

Baseline characteristics

We included 304 patients (164 in the non-ATG group and 140 in the ATG group) from November 2008 to July 2011, whose clinical characteristics are summarized in Table 1. Patients in the ATG group were younger, more likely to have received a graft from a DCD, and exhibited lower cold ischemia time and higher rates of retransplantation and delayed graft function. All patients had measurements of total lymphocyte and PBLs counts at baseline. Samples at months 1 and 6 were available for 266 and 211 of these patients, respectively (87.8% and 75.0% of those alive and with functional grafts at each point). There were no significant differences in baseline characteristics between patients with immune assessment at months 1 and 6, and those from whom no whole-blood specimens could be obtained. The median interval between baseline blood sampling and the onset of the first episode of opportunistic infection during the early period (first month) was 27 days (IQR, 21.7–29 days). The median interval between sampling at month 1 and the onset of the first episode of infection during the intermediate period (months 1–6) was 48 days (IQR, 12–107 days). Finally, the median interval between sampling at month 6 and the onset of the first episode of late infection (>6 months) was 102 days (IQR, 21–240 days). The dynamics of major PBLs counts in both the non-ATG and ATG groups during the monitoring period are depicted in the Fig. 1.

Post-transplant outcomes

The median follow-up was 476.0 days (IQR: 407.2–707.2 days), with 263 patients (86.5%) reaching ≥ 12 months. Death-censored graft survival rates at 1 and 3 years were 95% and 93%, respectively. All-cause mortality was 6.3% [19 patients died at a median interval from transplantation of 144 days (IQR: 55–364 days)]. The most common causes of death were infection and cardiovascular disease (12 and 3 patients, respectively). One- and 3-year survival rates were 95% and 92%.

Overall, 78 patients (25.6%) had 104 episodes of opportunistic infection, with no significant difference between non-ATG and ATG groups (incidence rates: 0.71 and 0.51 episodes per 1000 transplant-days, respectively; P -value = 0.14). CMV was the most common agent, with 71 episodes diagnosed in 62 patients. Other agents included HSV (12 episodes), VZV (7 episodes), *L. donovani* complex (3 episodes), *M. tuberculosis* (3 episodes), *Nocardia* spp. (2 episodes), *Aspergillus fumigatus* (2 episodes), PyVAN (2 episodes), *C. albicans*, and mucorales (one episode each). The incidence of each type of opportunistic infection according to the post-transplant month and the precise

distribution of the clinical syndromes are detailed in Fig. 2 and Table S1. The cumulative incidences of CMV disease at months 6 and 12 after transplant according to the D/R CMV serostatus are shown in Table S2.

Predictive role of total lymphocyte and PBLs counts in the non-ATG group

There were no significant differences in the PBLs counts at baseline between patients with or without opportunistic infection during the early period (data not shown). On the opposite, total lymphocyte, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and NK-cell counts at month 1 were significantly decreased in those patients who subsequently developed an opportunistic infection during the intermediate period (Fig. 3a). At month 6, we also found significant differences in CD8⁺ T-cell counts between patients with and without late infection (Fig. 3b).

When performing auROC analyses, the CD8⁺ T-cell count at month 1 was found to be the most predictive parameter for the subsequent occurrence of overall opportunistic infection (auROC: 0.739; P -value <0.001) and CMV disease (auROC: 0.685; P -value = 0.004) during the intermediate period. At month 6, CD8⁺ T-cell count was also the most predictive parameter for both late overall opportunistic infection (auROC: 0.738; P -value = 0.03) and late CMV disease (auROC: 0.756; P -value = 0.05) (Table S3). There was a statistically significant negative correlation between recipient age and the CD8⁺ T-cell count at month 1 after transplantation (r = -0.326; P -value <0.0001), but not at month 6.

As shown in Table 2, patients with a CD8⁺ T-cell count <0.100 $\times 10^3$ cells/ μ l at month 1 had higher cumulative incidences of overall opportunistic infection (P -value <0.001), CMV disease (P -value = 0.007) and CMV end-organ disease (P -value = 0.02) at the end of the intermediate period. The incidence rates of overall opportunistic infection and, specifically, CMV disease throughout such period were also significantly higher (P -values <0.001 for both comparisons). These associations remained essentially unchanged in sensitivity analyses stratified by the use of basiliximab induction or the receipt of antirejection therapy during the early post-transplant period (Tables S4 and S5). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of this cut-off value for predicting subsequent infection are detailed in Table 3.

With regards to the late period, patients with a CD8⁺ T-cell count <0.600 $\times 10^3$ cells/ μ l at month 6 had higher cumulative incidences of overall opportunistic infection (P -value = 0.003) and CMV disease (P -value = 0.03), as well as significantly higher incidence rates of both events (Table 2). The performance of this cut-off value for predicting late infection is shown in Table 3.

Table 1. Clinical characteristics and post-transplant outcome in the study cohort.

Variable	Overall (n = 304)	Non-ATG group (n = 164)	ATG group (n = 140)	P-value*
Age of recipient, years (mean ± SD)	55.0 ± 14.9	59.4 ± 15.3	49.9 ± 12.7	<0.001
Gender (male) [n (%)]	191 (62.8)	110 (67.1)	81 (57.9)	0.097
Pretransplant chronic comorbidities [n (%)]				
Diabetes mellitus	76 (25.0)	43 (26.2)	33 (23.6)	0.595
Heart disease	72 (23.7)	39 (23.8)	33 (23.6)	0.966
Chronic lung disease	41 (13.5)	28 (17.1)	13 (9.3)	0.048
Peripheral arterial disease	28 (9.2)	18 (11.0)	10 (7.1)	0.249
Chronic liver disease	16 (5.3)	12 (7.3)	4 (2.9)	0.083
Pretransplant immunosuppressive therapy [n (%)]	38 (12.5)	18 (11.0)	20 (14.3)	0.395
Previous solid organ transplantation [n (%)]	66 (21.7)	27 (16.5)	39 (27.9)	0.016
≥2 previous transplants	16 (5.3)	2 (1.2)	14 (10.0)	0.001
Etiology of underlying ESRD [n (%)]				
Glomerulonephritis	68 (22.4)	36 (22.0)	32 (22.9)	0.550
Diabetic nephropathy	54 (17.8)	29 (17.7)	25 (17.9)	
Nephroangiosclerosis	42 (13.8)	25 (15.2)	17 (12.1)	
Polycystosis	36 (11.8)	18 (11.0)	18 (12.9)	
Chronic interstitial nephropathy	25 (8.2)	15 (9.1)	10 (7.1)	
Reflux nephropathy	13 (4.3)	6 (3.7)	7 (5.0)	
Unknown	23 (7.6)	13 (7.9)	10 (7.1)	
Other	43 (14.1)	22 (13.4)	21 (15.0)	
Baseline serostatus [n (%)]				
Hepatitis C virus	31 (10.2)	15 (9.1)	16 (11.4)	0.512
Hepatitis B virus	4 (1.3)	3 (1.8)	1 (0.7)	0.373
CMV status D+/R-	23 (7.6)	11 (6.7)	12 (8.6)	0.540
CMV status D-/R-	4 (1.3)	2 (1.2)	2 (1.4)	0.627
Pretransplant renal replacement therapy [n (%)]				
Hemodialysis	248 (81.6)	130 (79.3)	118 (84.3)	0.299
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	35 (11.5)	15 (9.1)	20 (14.3)	0.207
Age of donor, years (mean ± SD)	53.3 ± 16.8	59.7 ± 17.1	45.8 ± 12.8	<0.001
Type of donor [n (%)]				
DBD donor	204 (67.1)	146 (89.0)	58 (41.4)	<0.001
DCD donor	87 (28.6)	5 (3.0)	82 (58.6)	
Living donor	13 (4.3)	13 (7.9)	0 (0.0)	
Number of HLA mismatches [median (IQR)]	4.0 (4.0-5.0)	4.0 (3.0-5.0)	4.5 (4.0-5.0)	0.031
Cold ischemia time, hours (mean ± SD)	16.7 ± 6.8	18.5 ± 7.1	14.7 ± 5.7	<0.001
Induction therapy [n (%)]				
None	53 (17.4)	53 (32.3)	-	-
Basiliximab	111 (36.5)	111 (67.7)	-	-
ATG	140 (46.1)	-	140 (100.0)	-
Primary immunosuppression scheme [n (%)]				
Tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroids	268 (88.9)	147 (89.6)	125 (89.3)	0.767
Tacrolimus, azathioprine, and steroids	31 (10.2)	16 (9.8)	15 (10.7)	0.783
Post-transplant complications [n (%)]				
Delayed graft function	182 (59.9)	79 (48.2)	103 (73.6)	<0.001
Requirement of surgical reintervention†	40 (13.2)	18 (11.0)	22 (15.7)	0.223
Renal artery stenosis	56 (18.4)	31 (18.9)	25 (17.9)	0.815
De novo post-transplant diabetes mellitus	42 (13.8)	22 (13.4)	20 (14.3)	0.766
≥1 episode of acute graft rejection	67 (22.0)	40 (24.4)	27 (19.3)	0.285
2 episodes	7 (2.3)	5 (3.0)	2 (1.4)	0.294
Overall patient mortality [n (%)]	19 (6.3)	12 (7.3)	7 (5.0)	0.405
Infection-related mortality	12/19 (63.1)	8/12 (66.7)	4/7 (57.1)	0.367
Graft loss [n (%)]	18 (5.9)	8 (4.9)	10 (7.1)	0.404

ATG, antithymocyte globulin; CMV, cytomegalovirus; D, donor; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; ESRD, end-stage renal disease; HLA, human leukocyte antigen; IQR, interquartile range; KT, kidney transplant; R, recipient; SD, standard deviation.

*Comparison between non-ATG and ATG groups.

†Within the first post-transplant month.

PBLs and infection in kidney transplantation

Fernández-Ruiz et al.

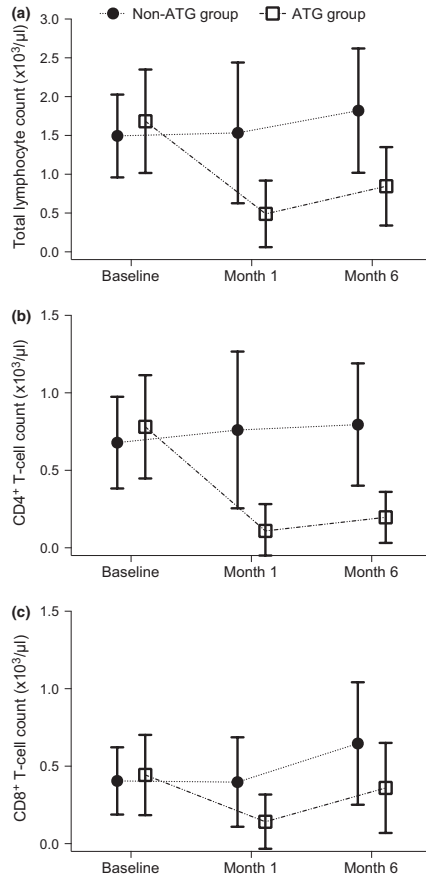


Figure 1 Dynamics at different time points of total lymphocyte (a), CD4⁺ (b) and CD8⁺ T-cell counts (c) in the non-ATG and ATG groups (ATG, antithymocyte globulin).

In the multivariate Cox regression models, a CD8⁺ T-cell count $<0.100 \times 10^3$ cells/ μ l at month 1 was identified as an independent risk factor for overall opportunistic infection (HR: 3.55; 95% CI: 1.56–8.06; *P*-value = 0.002) and, separately, for CMV disease (HR: 4.19; 95% CI: 1.79–9.77; *P*-value = 0.001) during the intermediate period (Table S6). The low number of events beyond the month 6 prevented us from performing a multivariate Cox model for the late period.

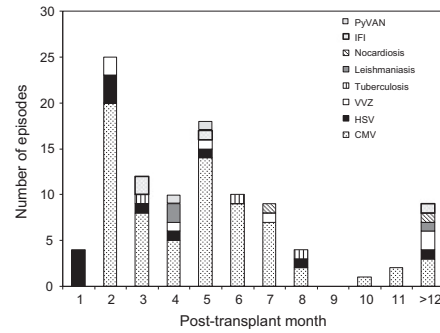


Figure 2 Incidence of different types of opportunistic infection according to the post-transplant month (CMV, cytomegalovirus; HSV, herpes simplex virus; IFI, invasive fungal infection; PyVAN, polyomavirus BK-associated nephropathy; VZV, varicella-zoster virus).

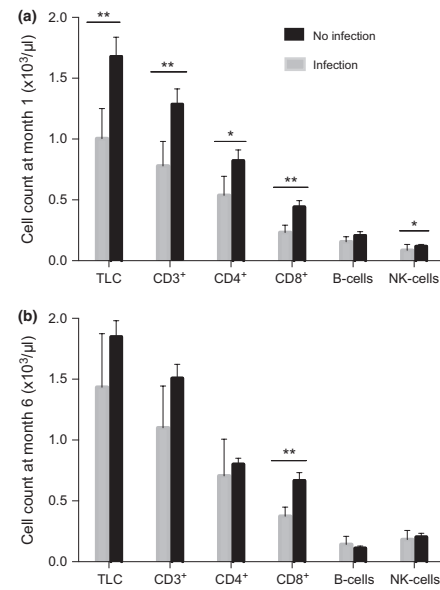


Figure 3 Non-ATG group: Mean values of total lymphocyte and PBLs counts at months 1 and 6 according to the occurrence of opportunistic infection during the intermediate (a) and late (b) post-transplant periods, respectively. Whiskers indicate 95% confidence interval. **P*-value = 0.001; ***P*-value <0.001 (ATG, antithymocyte globulin; NK, natural killer; TLC, total lymphocyte count).

Table 2. Overall opportunistic infection and CMV disease in the non-ATG group during the intermediate (months 1–6) and late periods (>6 months) according to CD8⁺ T-cell counts (unless otherwise specified, cumulative incidence rates are shown).

Infection in the intermediate period (months 1–6)	CD8 ⁺ T-cell count at month 1		P-value
	<0.100 × 10 ³ cells/μl (n = 16)	≥0.100 × 10 ³ cells/μl (n = 125)	
Overall opportunistic infection*	10 (62.5)	21 (16.8)	<0.001
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	6.77	1.55	<0.001
CMV disease	8 (50.0)	17 (13.6)	0.007
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	4.96	1.05	<0.001
CMV end-organ disease	3 (18.8)	3 (2.4)	0.02
Nonviral opportunistic infection	2 (12.5)	2 (1.6)	0.06
Infection in the late period (>6 months)	CD8 ⁺ T-cell count at month 6		P-value
	<0.600 × 10 ³ cells/μl (n = 58)	≥0.600 × 10 ³ cells/μl (n = 57)	
Overall opportunistic infection†	8 (13.8)	0 (0.0)	0.003
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	0.95	0.00	<0.001
CMV disease	5 (8.6)	0 (0.0)	0.03
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	0.59	0.00	0.02
CMV end-organ disease	2 (3.4)	0 (0.0)	0.3
Nonviral opportunistic infection	2 (3.4)	0 (0.0)	0.3

ATG, antithymocyte globulin; CMV, cytomegalovirus.

*Data on the CD8⁺ T-cell count at month 1 were absent in 5 patients.

†Data on the CD8⁺ T-cell count at month 6 were absent in 4 patients.

Table 3. Performance of CD8⁺ T-cell counts at months 1 and 6 for predicting the occurrence of overall opportunistic infection and, specifically, CMV disease in the non-ATG group.

Cut-off value	Predicted event	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
CD8 ⁺ T-cell count at month 1 <0.100 × 10 ³ cells/μl	Opportunistic infection in months 1–6	0.32 (0.16–0.49)	0.95 (0.90–0.99)	0.63 (0.39–0.86)	0.83 (0.77–0.90)
	CMV disease in months 1–6	0.32 (0.14–0.50)	0.93 (0.88–0.98)	0.50 (0.26–0.75)	0.86 (0.80–0.90)
CD8 ⁺ T-cell count at month 6 <0.600 × 10 ³ cells/μl	Opportunistic infection beyond month 6	1.00 (1.00–1.00)	0.53 (0.44–0.63)	0.14 (0.05–0.23)	1.00 (1.00–1.00)
	CMV disease beyond month 6	1.00 (1.00–1.00)	0.52 (0.42–0.61)	0.09 (0.01–0.16)	1.00 (1.00–1.00)

ATG, antithymocyte globulin; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Predictive role of total lymphocyte and PBLs counts in the ATG group

We found no significant differences in the PBLs counts at baseline between patients with or without opportunistic infection during the early period (data not shown). Total lymphocyte, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts at month 1 were significantly lower in those patients with subsequent opportunistic infection during the intermediate period (Fig. 4a). At month 6, total lymphocyte, CD3⁺ and CD4⁺ T cells, and B cells and NK-cell counts were also significantly lower in patients with opportunistic infection during the late period (Fig. 4b).

The CD4⁺ T-cell count at month 1 was the most predictive parameter for the subsequent occurrence of overall opportunistic infection (auROC: 0.668; *P*-value = 0.02) and, specifically, CMV disease (auROC: 0.634; *P*-value = 0.08). Again, there was a statistically significant negative

correlation between recipient age and the CD8⁺ T-cell count at month 1 after transplantation (*r*: -0.361; *P*-value <0.0001). At month 6, total lymphocyte count emerged as the most predictive parameter for overall opportunistic infection (auROC: 0.820; *P*-value = 0.005) and CMV disease (auROC: 0.837; *P*-value = 0.006) during the late period (Table S3).

Patients in the ATG group with a CD4⁺ T-cell count <0.050 × 10³ cells/μl at month 1 had higher cumulative incidences of overall opportunistic infection (*P*-value = 0.003), CMV disease (*P*-value = 0.03), and nonviral opportunistic infection (*P*-value = 0.05) at the end of the intermediate period (Table 4). The pattern of these associations remained similar in a sensitivity analysis stratified by the receipt of antirejection therapy during the early period (Table S7). The sensitivity, specificity, PPV, and NPV of this cut-off value are shown in Table 5.

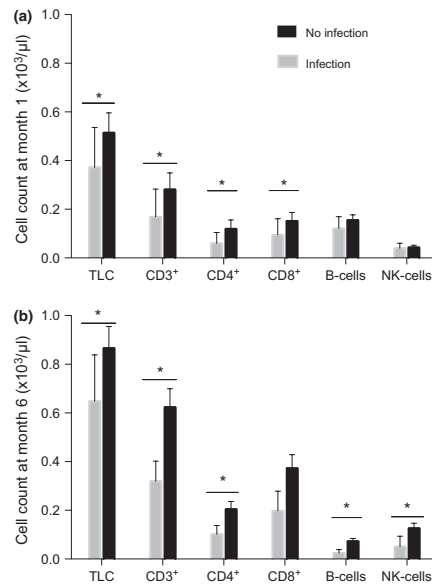


Figure 4 ATG group: Mean values of total lymphocyte and PBLs counts at months 1 and 6 according to the occurrence of opportunistic infection during the intermediate (a) and late (b) post-transplant periods, respectively. Whiskers indicate 95% confidence interval. **P*-value <0.005 (ATG, antithymocyte globulin; NK, natural killer; TLC, total lymphocyte count).

Throughout the late period, patients with a total lymphocyte count $<0.750 \times 10^3$ cells/ μ l at month 6 had higher cumulative incidences of overall opportunistic infection and CMV disease (*P*-values = 0.02 for both). The incidence rates of overall opportunistic infection (*P*-value = 0.004) and CMV disease (*P*-value = 0.02) were also significantly increased (Table 4). The performance of this cut-off value for predicting late infection is shown in Table 5.

In the final multivariate Cox regression model for overall opportunistic infection during the intermediate period, the CD4⁺ T-cell count $<0.050 \times 10^3$ cells/ μ l at month 1 was retained without reaching statistical significance (HR: 2.53; 95% CI: 0.88–7.26; *P*-value = 0.08) (Table S8). The low number of late events precluded multivariate analysis for the late post-transplant period.

Discussion

In the present study, we demonstrate that an affordable approach to the post-transplant CMI status based on the

scheduled monitoring of total lymphocytes and selected PBLs may have a role in predicting opportunistic infection in KT recipients. We also found that stratifying by the use of ATG induction permits to separate two different subgroups with respect to the most predictive parameter. In patients not receiving ATG, a low CD8⁺ T-cell count at month 1 was associated with a 3.5-fold increase in the risk of opportunistic infection and, specifically, a 4.2-fold increase in the risk of CMV disease. In the group receiving ATG induction, a low CD4⁺ T-cell count at month 1 was associated with a nearly significant 2.5-fold increase in the risk of overall opportunistic infection. Interestingly, the selected cut-offs at each time point exhibited excellent NPVs for the subsequent occurrence of infection. Through the identification of those patients at a very low risk of infection in which prophylaxis and/or viral monitoring could be safely discontinued, this strategy provides an opportunity for individualizing and optimizing post-transplant practices.

There are few studies on the usefulness of monitoring of lymphocyte counts to predict immunosuppression-related adverse events after KT [11–13,27–29]. Nonetheless, the increased risk of infection carried by patients receiving T-cell-depleting antibodies (ATG, OKT3 or alemtuzumab) has been extensively documented for CMV [30,31] and other agents [32–35]. Various studies have reported that KT recipients with *P. jiroveci* pneumonia have significantly lower lymphocyte counts than controls [36–40], and it has been proposed that the kinetics of the CD4⁺ T-cell subset may help to determine the duration of certain prophylaxis regimens [37,41].

In the ATG group, we found that a cut-off value in CD4⁺ T-cell count at month 1 of 0.050×10^3 cells/ μ l had good sensitivity (76%) and excellent NPV (92%) for the occurrence of infection during the intermediate period. At month 6, a total lymphocyte count of 0.750×10^3 cells/ μ l exhibited even better sensitivity (83%) and NPV (97%) for late infection. Thus, these surrogate markers of CMI accurately stratified the risk of infection within a subgroup of KT recipients at high risk *per se* for infectious complications.

Notably, we were able to reproduce these findings in the absence of previous induction with ATG. As these patients are not subject to an obvious cause of T-cell depletion, most clinicians would not have probably considered post-transplant lymphocytopenia as a predictable complication. A cut-off value in CD8⁺ T-cell count at month 1 of 0.100×10^3 cells/ μ l showed a very good NPV for predicting subsequent opportunistic infection (83%) during the intermediate period, whereas a cut-off of 0.600×10^3 cells/ μ l at month 6 had a NPV of 100% for late infection. Although the PPVs at months 1 and 6 were suboptimal (63% and 15%, respectively), the appeal of monitoring CD8⁺ T-cell counts lies in the ability to effectively discriminate low-risk

Table 4. Overall opportunistic infection and CMV disease in the ATG group during the intermediate (months 1–6) and late periods (>6 months) according to total lymphocyte and CD4⁺ T-cell counts (unless otherwise specified, cumulative incidence rates are shown).

Infection in the intermediate period (months 1–6)	CD4 ⁺ T-cell count at month 1		P-value
	<0.050 × 10 ³ cells/μl (n = 58)	≥0.050 × 10 ³ cells/μl (n = 66)	
Overall opportunistic infection*	16 (27.6)	5 (7.6)	0.003
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	1.91	0.52	0.01
CMV disease	12 (20.7)	5 (7.6)	0.03
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	1.43	0.52	0.08
CMV end-organ disease	3 (5.2)	1 (1.5)	0.3
Nonviral opportunistic infection	4 (6.9)	0 (0.0)	0.05
Infection in the late period (>6 months)	Total lymphocyte count at month 6		P-value
	<0.750 × 10 ³ cells/μl (n = 68)	≥0.750 × 10 ³ cells/μl (n = 63)	
Overall opportunistic infection	10 (14.7)	2 (3.2)	0.02
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	1.22	0.16	0.004
CMV disease	8 (11.8)	1 (1.6)	0.02
Incidence rate (episodes per 1000 transplant-days)	0.81	0.08	0.02
CMV end-organ disease	1 (1.5)	0 (0.0)	0.5
Nonviral opportunistic infection	3 (4.4)	1 (1.6)	0.3

ATG, antithymocyte globulin; CMV, cytomegalovirus.

*Data on the CD4⁺ T-cell count at month 1 were absent in 3 patients.

Table 5. Performances of CD4⁺ T-cell count at month 1 and total lymphocyte count at month 6 for predicting the occurrence of overall opportunistic infection and, specifically, CMV disease in the ATG group.

Cut-off value	Predicted event	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
CD4 ⁺ T-cell count at month 1 <0.050 × 10 ³ cells/μl	Opportunistic infection in months 1–6	0.76 (0.58–0.94)	0.59 (0.50–0.69)	0.28 (0.16–0.39)	0.92 (0.86–0.99)
	CMV disease in months 1–6	0.71 (0.49–0.92)	0.57 (0.48–0.66)	0.21 (0.10–0.31)	0.92 (0.86–0.99)
Total lymphocyte count at month 6 <0.750 × 10 ³ cells/μl	Opportunistic infection beyond month 6	0.83 (0.62–1.04)	0.51 (0.42–0.60)	0.15 (0.06–0.23)	0.97 (0.92–1.01)
	CMV disease beyond month 6	0.91 (0.74–1.08)	0.51 (0.42–0.60)	0.14 (0.06–0.22)	0.98 (0.95–1.01)

ATG, antithymocyte globulin; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

patients, even by assuming that the actual odds of opportunistic infection in the group below the cut-off value might turn out to be relatively low. Overall, these findings could be applied in the clinical practice to reduce the length of prophylaxis with trimethoprim–sulfamethoxazole or acyclovir or the frequency of clinical follow-up in patients with PBLs counts over the protective threshold.

The administration of ATG exerted a differential impact on the kinetics of some PBLs. As shown in the Fig. 1b, the absolute count of CD4⁺ T-cell lymphocytes in patients receiving ATG showed a dramatic drop from baseline to month 1, with only a slight recovery at month 6. Conversely, in the non-ATG group, the kinetics experienced a moderate but steady increase from baseline to month 6. This notion that there is no “one-size-fits-all” when seeking the best predictive PBLs among different induction

therapy groups is further supported by a recent study with a design similar to ours, in which the prognostic accuracy of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations were retrospectively analyzed in 48 heart and 42 KT recipients [13]. The authors found that the CD4⁺ T-cell counts were associated with the risk of opportunistic infection only in heart transplant recipients, whereas the CD8⁺ T-cell subset performed better in KT recipients. Of note, 90% of patients in the former group had undergone ATG induction, whereas most in the latter group had received basiliximab [13]. We also found a strong negative correlation between recipient age at transplantation and either CD8⁺ or CD4⁺ T-cell counts at month 1 in the non-ATG and ATG groups, respectively. As recently demonstrated, reduced thymic output seems to play a role in the age-related decrease in T-cell numbers [40].

One of the potential contributions of our study may lie on the utility of monitoring of PBLs to stratify the risk of CMV disease. Growing interest has been focused in the past years to measure individual's CMV-specific CMI response by a number of approaches [5,6,42,43]. Nevertheless, these techniques are not widespread because of the lack of standardized cut-off values, their labor-intensive nature, and the need of specialized equipment [6]. The ATG group was formed by recipients deemed at increased risk of CMV disease regardless their D/R serostatus and, in accordance to the current guidelines [31,44], received antiviral prophylaxis for 3 months. Using the aforementioned cut-off values for CD4⁺ T-cell and total lymphocyte counts, we obtained excellent NPVs for predicting subsequent CMV disease. This approach could identify those recipients that will not likely benefit from the extended use of anti-CMV agents beyond the standard prophylaxis regimen of 3 months in view of the very low risk of subsequent CMV disease. Conversely, it could be reasonable to continue valganciclovir in those with persistent lymphocyte depletion. The non-ATG was more heterogeneous in terms of CMV infection risk, as it comprised high- (D+/R-), intermediate- (R+), and low-risk patients (D-/R-) on the basis of their serology status. Notwithstanding this fact, the selected cut-off values for CD8⁺ T-cell count at months 1 and 6 also showed excellent NPVs. Furthermore, in the Cox regression model, the impact of CD8⁺ T-cell count at month 1 remained even after adjusting for CMV mismatch and use of antiviral prophylaxis.

This study has some limitations. Firstly, and despite the large sample size, the incidence of late infection was relatively low and prevented us from performing further multivariate analyses. The high NPVs obtained for PBL counts may be influenced by this circumstance. As previously discussed, the selected cut-offs exhibited only moderate PPVs and, in some cases, poor sensitivity values (i.e., CD8⁺ T-cell count at month 1 in the non-ATG group). CMV disease accounted for most of the observed episodes, thus limiting our capacity to assess the accuracy of the proposed strategy for predicting non-CMV infection. On the other hand, the potential feasibility of monitoring of PBLs to guide CMV prophylaxis should be taken with caution as different serology risk categories were jointly analyzed and remain to be validated in separate cohorts. Moreover, we did not systematically monitor CMV antigenemia in intermediate-risk patients. Finally, our approach to the CMI status was based solely on quantitative parameters measured at two post-transplant time points: We did not perform any functional assay [4-6], nor break down the CD4⁺ or CD8⁺ T-cell pools into their different subsets. Perhaps, it might be worth considering the convenience of intensifying this

schedule of testing to get better detail into the dynamics of immune recovery throughout the post-transplant period. Nevertheless, we do consider that the strength of our findings lies on the very affordability of the monitoring strategy that we propose, thus facilitating its application in day-to-day practice. Enumeration of PBLs may be performed in a fully automated way, with reliable and reproducible results [20]. Although previous studies had analyzed the impact of PBLs kinetics on the occurrence of various outcomes after KT [11-13,27,28], ours is unique in terms of prospective design, large sample size, and detailed assessment of infectious events.

To conclude, monitoring of PBL counts may be a useful tool to predict the occurrence of opportunistic infection in KT recipients. In particular, patients not receiving ATG induction with CD8⁺ T-cell counts above 0.100×10^3 and 0.600×10^3 cells/ μ l at months 1 and 6, respectively, had a very low risk of developing subsequent infection. The same would apply to patients with a CD4⁺ T cell above 0.050×10^3 cells/ μ l at month 1 after induction therapy with ATG. We have previously demonstrated that post-transplant hypogammaglobulinemia acts as an independent risk factor for bacterial infection, namely acute pyelonephritis and bloodstream infection [18]. Therefore, our findings overall offer support for tailoring of immunosuppressive and prophylactic regimens according to individual's risk profile and pave the way for future intervention studies based on these simple approaches to the infection risk assessment after KT.

Authorship

MFR, FLM, EPA and JMA: designed research. MFR, FLM, LMA, AA, RSJ, CL and JMM: performed research. MFR and AGR: collected data. MFR, FLM and LMA: analyzed data. MFR and FLM: wrote the paper. AA, JMM, EPA and JMA: revised and completed the final draft of the manuscript.

Funding

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS 11/01538] and the Fundación Mutua Madrileña de Investigación Médica [FMM 2010/0015]. M Fernández-Ruiz holds a research training contract "Rio Hortega" (CM11/00187) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Instituto de Salud Carlos III). F López-Medrano is partially supported by a grant from the Research Intensification Programme in the National Health Care System (I3SNS) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Instituto de Salud Carlos III).

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Description of the clinical syndromes and causative agents involved in the 104 episodes of post-transplant opportunistic infection.

Table S2. Cumulative incidences of CMV disease at months 6 and 12 after transplantation according to the donor/recipient CMV serostatus.

Table S3. auROC analysis of total lymphocyte and PBLs counts at months 1 and 6 for predicting the subsequent occurrence of opportunistic infection.

Table S4. Sensitivity analysis stratified by the use of basiliximab induction in the non-ATG group.

Table S5. Sensitivity analysis stratified by the receipt of antirejection therapy during the early post-transplant period (month 1) in the non-ATG group.

Table S6. Cox regression models for overall opportunistic infection and, specifically, CMV disease in the non-ATG group during the intermediate post-transplant period (months 1–6).

Table S7. Sensitivity analysis stratified by the receipt of antirejection therapy during the early post-transplant period (month 1) in the ATG group.

Table S8. Cox regression models for overall opportunistic infection and, specifically, CMV disease in the ATG group during the intermediate post-transplant period (months 1–6).

References

1. Linares L, Cofán F, Cervera C, *et al.* Infection-related mortality in a large cohort of renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; **39**: 2225.
2. Legendre C, Canaud G, Martínez F. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; **27**: 19.
3. Khurana A, Brennan DC. Current concepts of immunosuppression and side effects. In: Liapis H, Wang HL, eds. *Pathology of Solid Organ Transplantation*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2011: 11–30.
4. Ling X, Xiong J, Liang W, *et al.* Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis *Transplantation* 2012; **93**: 737.
5. Manuel O, Husain S, Kumar D, *et al.* Assessment of Cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of Cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 817.
6. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art on monitoring of cytomegalovirus-specific cell mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 1678.
7. Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, *et al.* Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2009; **58**: 1.
8. Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, *et al.* Idiopathic CD4+ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood* 2008; **112**: 287.
9. Carbone J, Micheloud D, Salcedo M, *et al.* Humoral and cellular immune monitoring might be useful to identify liver transplant recipients at risk for development of infection. *Transpl Infect Dis* 2008; **10**: 396.
10. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Romo EM, *et al.* Pre-transplant lymphocyte count predicts the incidence of infection during the first two years after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; **15**: 1209.
11. Ducloux D, Carron PL, Racadot E, *et al.* CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; **30**: 2859.
12. Carter JT, Melcher ML, Carlson LL, Roland ME, Stock PG. Thymoglobulin-associated Cd4+ T-cell depletion and infection risk in HIV-infected renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; **6**: 753.
13. Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, *et al.* Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation* 2012; **93**: 112.
14. Sarmiento E, Del Pozo N, Gallego A, *et al.* Decreased levels of serum complement C3 and natural killer cells add to the predictive value of total immunoglobulin G for severe infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; **14**: 526.
15. Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, *et al.* Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; **64**: 1432.
16. Bas J, Mestre M, Grinyó JM, *et al.* Peripheral blood lymphoid subsets and long-term clinical course of kidney recipients: a longitudinal study. *Cytometry* 1998; **34**: 103.
17. Martins L, Ventura A, Dias L, Henriques A, Sarmento A, Guimarães S. Long-term effects of ATG therapy on lymphocyte subsets. *Transplant Proc* 2001; **33**: 2186.
18. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, *et al.* Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant* 2012; **12**: 2763.
19. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, *et al.* Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant* 2013; **13**: 685.
20. Ruiz P, Borowitz MJ, Tilahun H, *et al.* BD Biosciences Application Note. Productivity and efficiency of 6-color BD Multitest and BD Trucount technologies. 2007. Available at: <http://www.bd.com/resource.aspx?ID=17742>. (last review 1 November 2013).

21. Humar A, Kumar D, Caliendo AM, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 2002; **73**: 599.
22. Garrido RS, Aguado JM, Diaz-Pedroche C, et al. A review of critical periods for opportunistic infection in the new transplantation era. *Transplantation* 2006; **82**: 1457.
23. Torre-Cisneros J, Doblas A, Aguado JM, et al. Tuberculosis after solid-organ transplant: incidence, risk factors, and clinical characteristics in the RESITRA (Spanish Network of Infection in Transplantation) cohort. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1657.
24. Humar A, Michaels M, AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**: 262.
25. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1813.
26. European Expert Group on Renal Transplantation (EBPG), European Renal Association (ERA-EDTA), European Society for Organ Transplantation (ESOT). European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1). *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15**(Suppl 7): S1.
27. Ducloux D, Carron PL, Motte G, et al. Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2002; **15**: 393.
28. Thibaudin D, Alamartine E, Mariat C, Absi L, Berthou F. Long-term kinetic of T-lymphocyte subsets in kidney-transplant recipients: influence of anti-T-cell antibodies and association with posttransplant malignancies. *Transplantation* 2005; **80**: 1514.
29. Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, et al. Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 868.
30. Issa NC, Fishman JA. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 772.
31. de la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; **29**: 735.
32. Yu X, Han F, Wu J, et al. *Nocardia* infection in kidney transplant recipients: case report and analysis of 66 published cases. *Transpl Infect Dis* 2011; **13**: 385.
33. Martina MN, Cervera C, Esforzado N, et al. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. *Transpl Int* 2011; **24**: e6.
34. Oh CS, Stratta RJ, Fox BC, Sollinger HW, Belzer FO, Maki DG. Increased infections associated with the use of OKT3 for treatment of steroid-resistant rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1988; **45**: 68.
35. Peleg AY, Husain S, Kwak EJ, et al. Opportunistic infections in 547 organ transplant recipients receiving alemtuzumab, a humanized monoclonal CD-52 antibody. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 204.
36. De Castro N, Xu F, Porcher R, Pavie J, Molina JM, Peraldi MN. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients occurring after discontinuation of prophylaxis: a case-control study. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 1375.
37. Struijk GH, Gijzen AF, Yong SL, et al. Risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients long after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**: 3391.
38. Fily F, Lachkar S, Thiberville L, Favennec L, Caron F. Risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients long after renal transplantation. *Med Mal Infect* 2011; **41**: 526.
39. Brunot V, Pernin V, Chartier C, et al. An epidemic of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a renal transplantation center: role of T-cell lymphopenia. *Transplant Proc* 2012; **44**: 2818.
40. Schürmann M, Schürmann D, Schindler R, et al. Impaired thymic function and CD4+ T lymphopenia, but not mannose-binding lectin deficiency, are risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2013; **28**: 159.
41. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology. Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections (version 1.2012). Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/infections.pdf. (last review 30 October 2013).
42. Sund F, Lidehall AK, Claesson K, et al. CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clin Transplant* 2010; **24**: 401.
43. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; **46**: 1437.
44. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; **89**: 779.

Anexo 5.

CORRESPONDENCE

Assessing the Risk of De Novo Malignancy in Kidney Transplant Recipients: Role for Monitoring of Peripheral Blood Lymphocyte Populations

We have read with interest the recent article by Lim et al, assessing the impact of the use of T-cell-depleting antibodies as antirejection therapy on the development of de novo malignancy after kidney transplantation (KT) (1). They found that recipients who experienced acute rejection (AR) and were treated with T-cell-depleting antibodies exhibited a 1.4-fold increase in the adjusted risk of incident cancer as compared to those who did not experience AR. Interestingly, such an effect was not observed in patients with rejection episodes that did not require therapy with T-cell-depleting agents (1). Following the suggestion made by Snanoudj and Legendre in their editorial (2), we attempted to analyze whether the use of such agents as induction therapy also increases the risk of posttransplant malignancy. In addition, in view that the decrease in antitumor and antiviral T-cell-mediated immune surveillance seems to be the most relevant mechanism underlying the association reported by Lim et al. (1), we explored the potential utility of a monitoring strategy based on some easily available proxy for the posttransplant status of the cell-mediated immunity in an attempt to individualize cancer prevention in this population.

All patients undergoing KT at our institution from November 2008 are being enrolled in an ongoing immunomonitoring study in which data on major posttransplant complications are prospectively collected (3, 4). Peripheral blood lymphocyte subpopulations (PBLs) counts are enumerated at baseline and posttransplant months 1 and 6 using a six-color flow cytometric assay (4). In this substudy, we included patients with a minimum posttransplant follow-up of 90 days, unless death or graft loss occurred earlier. The study outcome was the occurrence of de novo cancer (excluding nonmelanocytic skin cancer) after transplantation. We preestablished two subgroups: those patients who received

antithymocyte globulin (ATG) as induction therapy (ATG group), and those who received anti-CD25 monoclonal antibodies or no induction therapy (non-ATG group). Areas under receiver operating characteristic curves (auROC) were used to assess the accuracy of each PBL count in predicting the development of de novo malignancy. The best cutoff values were then assessed through the calculations of sensitivity and specificity. Survival curves were plotted by the Kaplan-Meier method, and univariate and multivariate Cox

regression models were used to evaluate the association between the most predictive parameter identified by auROC analysis and the study outcome.

We analyzed 297 patients (162 and 135 in the non-ATG and ATG groups, respectively) throughout a median follow-up of 72.7 months (interquartile rank, 32.8–53.5 months; risk exposure period, 360,248 transplant days). At the end of this period, 255 of them (85.9%) were still alive and with a functioning graft. Seventeen patients (5.7%)

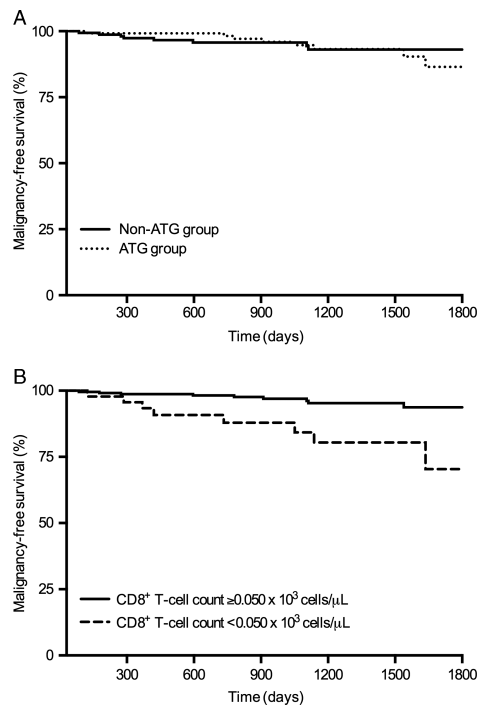


FIGURE 1. Kaplan-Meier curves for de novo malignancy-free survival according to: (A) the use of ATG as induction therapy (log-rank $P=0.614$); and (B) the CD8⁺ T-cell count at month 1 (log-rank $P=0.001$). ATG, antithymocyte globulin.

were diagnosed with a de novo malignancy within a median of 24.1 months (interquartile rank, 9.2–36.4 months) after transplantation. These malignancies comprised 12 solid tumors, three Kaposi's sarcomas, two myeloproliferative syndromes, and one posttransplant lymphoproliferative disorder. There were no differences in the malignancy-free survival between ATG and non-ATG groups (Fig. 1A). Of note, only 4 of 73 (5.5%) episodes of AR (occurring in 66 patients) were treated with ATG. The CD8⁺ T-cell count at month 1 was found to be the most predictive parameter for the subsequent occurrence of posttransplant cancer (auROC, 0.648; $P=0.047$). By using a cutoff of 0.050×10^3 cells/ μ L, we obtained sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 50.0%, 83.6%, 16.7%, and 96.2%, respectively. One-year and three-year malignancy-free survival rates were significantly lower in patients with a CD8⁺ T-cell count below this threshold at month 1 (91% and 80% vs. 98% and 94%, respectively; $P=0.001$) (Fig. 1B). In the Cox model, after adjusting for recipient and donor age, dialysis vintage, number of pretransplant comorbidities, and occurrence of AR within the first 6 months, a CD8⁺ T-cell count less than 0.050×10^3 cells/ μ L at month 1 acted as an independent risk factor for de novo malignancy (hazard ratio, 5.03; 95% confidence interval: 1.82–13.91; $P=0.002$).

Despite the use of ATG as induction therapy in 45.5% of the recipients included in our cohort, we have not been able to demonstrate any discernible direct effect of such a T cell-depleting agent on the incidence of cancer. Although limited by the relatively low number of events, this result suggests that the inflammatory status underlying AR episodes should play a relevant role in the association found in the Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry (1). On the other hand, the long-lasting dose-dependant T-cell depletion induced by polyclonal antithymocyte preparations (5, 6) offers the opportunity of using the kinetics of certain PBLs as predictors for de novo

cancer development (7). Previous studies have shown a correlation between low CD4⁺ and CD28⁺ CD8⁺ T-cell counts and the risk of posttransplant malignancy in kidney (8, 9) and liver transplant recipients (10), respectively. We propose a cutoff for CD8⁺ T-cell count at month 1 with an excellent negative predictive value for predicting the subsequent occurrence of cancer. Although the positive predictive value was suboptimal, monitoring of this PBLs may effectively discriminate low-risk patients, thus allowing to focus screening and prevention efforts on those KT recipients with CD8⁺ T-cell counts below the protective threshold. Further studies with larger patient samples might help to identify whether monitoring of specific PBLs according to the type of induction therapy used could increase the predictive accuracy of this approach.

Mario Fernández-Ruiz¹
Francisco López-Medrano¹
Luis M. Allende²
Amado Andrés³
Estela Paz-Artal²
José María Aguado¹

¹ Unit of Infectious Diseases
Instituto de Investigación, Hospital
Universitario 12 de Octubre
Madrid, Spain

² Department of Immunology
Instituto de Investigación, Hospital
Universitario 12 de Octubre
Madrid, Spain

³ Department of Nephrology
Instituto de Investigación, Hospital
Universitario 12 de Octubre
Madrid, Spain

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS] project 11/01538) and the Fundación Mutua Madrileña de Investigación Médica (FMM grant 2010/0015). Francisco López-Medrano is partially supported by a grant from the Research Intensification Programme in the National Health Care System (I3SNS) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Instituto de Salud Carlos III).

The authors declare no conflicts of interest.

Address correspondence to: Mario Fernández-Ruiz, M.D., Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre," Centro de Actividades Ambulatorias, 2^a planta, bloque D. Avda. de Córdoba, s/n. 28041, Madrid, Spain. E-mail: mario_fdezruiz@yahoo.es

M.F.-R., F.L.-M., E.P.-A., and J.M.A. designed the original research. M.F.-R., F.L.-M., L.M.A., and A.A. performed the research. M.F.-R. wrote the letter. L.M.A., A.A., E.P.A., and J.M.A. revised and completed the final draft of the article.

Received 29 April 2014.

Accepted 9 May 2014.

Copyright © 2014 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/14/9805-e36

DOI: 10.1097/TP.0000000000000297

REFERENCES

1. Lim WH, Turner RM, Chapman JR, et al. Acute rejection, T-cell-depleting antibodies, and cancer after transplantation. *Transplantation* 2014; 97: 817.
2. Snaouidj R, Legendre C. T-cell-depleting antibodies and risk of cancer after transplantation. *Transplantation* 2014; 97: 808.
3. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, et al. Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant* 2013; 13: 685.
4. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; 27: 674.
5. Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; 64: 1432.
6. Bas J, Mestre M, Grinyó JM, et al. Peripheral blood lymphoid subsets and long-term clinical course of kidney recipients: a longitudinal study. *Cytometry* 1998; 34: 103.
7. Sherston SN, Carroll RP, Harden PN, et al. Predictors of cancer risk in the long-term solid-organ transplant recipient. *Transplantation* 2014; 97: 605.
8. Ducloux D, Carron PL, Rebibou JM, et al. CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1270.
9. Thibaudin D, Alamartine E, Mariat C, et al. Long-term kinetic of T-lymphocyte subsets in kidney-transplant recipients: influence of anti-T-cell antibodies and association with posttransplant malignancies. *Transplantation* 2005; 80: 1514.
10. Boleslawski E, Othman SB, Aoudjehane L, et al. CD28 expression by peripheral blood lymphocytes as a potential predictor of the development of de novo malignancies in long-term survivors after liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 299.

The Authors' Reply

Cancer occurs as an imbalance between uncontrolled cellular proliferation and dysregulation of cell apoptosis. The initiation, progression, and invasion of cancer involve a complex

interplay between innate and adaptive immunity and inflammation (1). Dendritic cells are potent antigen-presenting cells capable of initiating both innate and adaptive antigen-specific immune

responses. Dendritic cells, along with other cell types, including effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells and natural killer cells have critical roles in antitumor immunity. Although regulatory T cells have

Anexo 6.

Consentimiento informado del paciente

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título: IMPACTO DE LA SITUACIÓN INMUNOLÓGICA DEL RECEPTOR DE TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO SOBRE LA INCIDENCIA DE COMPLICACIONES INFECCIOSAS

Investigador principal: Francisco López Medrano. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario "12 de Octubre"

Promotor: Trabajo de investigación promovido por los propios investigadores

Centro: Hospital Universitario "12 de Octubre"

• Objetivo/finalidad del estudio

Sabemos que, al ser usted receptor de un órgano trasplantado, presenta más riesgo de padecer determinadas infecciones a lo largo de su evolución, en comparación con una persona sana. Estamos investigando los factores que aumentan la posibilidad de que ocurra dicha infección, y más concretamente, la influencia que pueda ejercer el estado de su sistema inmunitario ("las defensas del organismo") sobre su aparición. Por ello, solicitamos su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal es determinar el impacto de la situación inmunológica del receptor de un trasplante de órgano sólido (recuento total de linfocitos y subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica, recuento de inmunoglobulinas y complemento) sobre la incidencia y gravedad de la infección en el periodo post-trasplante.

Si concede usted su consentimiento para participar en este estudio, procederemos a recoger determinados datos de su historia clínica y de las pruebas que le sean realizadas a lo largo del seguimiento. También solicitamos su permiso para que, al mismo tiempo que se le realizan las analíticas rutinarias programadas por su equipo médico, podamos extraer un volumen extra de 10 centímetros cúbicos de sangre, en 3 ocasiones a lo largo de los 6 primeros meses tras la realización del trasplante. Analizaremos dichas muestras para determinar cuál es el estado de su sistema inmunitario.

• Participación voluntaria

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que precise. La relación con el equipo médico que le atiende no va a verse en modo alguno afectada por la naturaleza de su decisión.

Antes de tomar una decisión lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee para asegurarse que lo ha entendido y desea participar.

• Beneficios

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la determinación de la situación inmunológica basal y evolutiva post-trasplante, y su influencia sobre la aparición de complicaciones infecciosas en situaciones como la suya, podría beneficiar en un futuro a otros pacientes igualmente sometidos a un trasplante de órgano sólido.

• Compensación

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación.

Consentimiento informado del paciente

• **Confidencialidad**

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y tratada de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y Ley de Investigación Biomédica 14/2007. Para garantizar el anonimato de su identidad cada una de las muestras del estudio recibirá un código (nunca su nombre) y/o se anonimizarán.

Se le ha pedido a su médico que guarde esta hoja de información con su consentimiento otorgado y su firma, así como la relación entre su código y su identidad en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica.

Las conclusiones de este estudio podrían ser presentadas en reuniones y/o revistas científicas, pero siempre de forma global y sin que pueda identificarse individualmente a ninguno de los participantes.

• **Información adicional**

Si usted precisa mayor información sobre Este estudio puede contactar con el investigador principal y/o otros investigadores del estudio (teléfono):

• **Consentimiento Informado**

Yo, Declaro que
(nombre y apellidos del paciente)

- ❖ He leído la Hoja de información que se me ha entregado
- ❖ He recibido suficiente información
- ❖ He podido formular las preguntas que he considerado oportuna
- ❖ He hablado con (nombre del MEDICO:.....)

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Nombre (**paciente**) Firma Fecha

Nombre (**médico**) Firma Fecha

Anexo 7.

 <p>Hospital Universitario 12 de Octubre SaludMadrid</p>	 Comunidad de Madrid
Comité Ético de Investigación Clínica	
CODIGO INTERNO: <u>09/176</u>	
<p>Dña. MARIA UGALDE DIEZ, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doce de Octubre.</p>	
<p>CERTIFICA:</p>	
<p>Que este Comité, en la reunión celebrada el día 30/06/2009, ha analizado el Proyecto de Investigación titulado:</p>	
<p>IMPACTO DE LA EVOLUCIÓN INMUNOLÓGICA DEL RECEPTOR DE TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO SOBRE LA INCIDENCIA DE COMPLICACIONES INFECCIOSAS POST-TRASPLANTE (ESTUDIO ATALANTA)</p>	
<p>Cuyo Investigador Principal es el Dr. Francisco LOPEZ MEDRANO, Del Servicio de UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS</p>	
<p>Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, y que es viable en todos sus términos, por lo que lo ha considerado adecuado y ha decidido su APROBACIÓN.</p>	
<p>Lo que firmo en Madrid, a 03 de julio de 2009,</p>	
	
<p>Firmado: Dra. María Ugalde Diez</p>	
<p>SECRETARIA DE GESTION DE ENSAYOS CLINICOS, HOSPITAL MATERNO INFANTIL, AVDA. DE CÓRDOBA, S/N, SOTANO - 2, 28041 MADRID ceic@h12o.es TEL/FAX 91.390.85.46</p>	