

Artículo original

Validación de la utilidad de los parámetros de deformación miocárdica para excluir el rechazo agudo tras el trasplante cardiaco: un estudio multicéntrico



Josebe Goirigolzarri Artaza^{a,*}, Susana Mingo Santos^a, José María Larrañaga^b, Ana Osa^c, Mario Sutil-Vega^d, Martín Ruiz Ortiz^e, Cecilia Corros^f, Bárbara Vidal^{g,h}, Vanessa Moñivas Palomero^a, Nicolás Maneiro^b, Cayetana María Barbeito^b, Raquel López-Vilella^c, Chi-Hion Li^d, Sara Rodríguez Diego^e, José Luis Lambert^f, Franciris Velásquez^g, María G. Crespo-Leiro^{b,h}, Luis Almenar^{c,h}, Sonia Mirabet^d, Alejandro Martínez Mingoⁱ y Javier Segovia Cubero^{a,h}

^aServicio de Cardiología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España

^bServicio de Cardiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Universidad de A Coruña, La Coruña, España

^cServicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, España

^dServicio de Cardiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB Sant Pau, Universidad Autónoma Barcelona, Barcelona, España

^eServicio de Cardiología, Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba, España

^fServicio de Cardiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

^gInstitut Clínic Cardiovascular (ICCV), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^hCentro de investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto Carlos III, Madrid, España

ⁱDepartamento de Psicología Social y Metodología, Facultad de Psicología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 15 de agosto de 2019

Aceptado el 30 de enero de 2020

On-line el 3 de junio de 2020

Palabras clave:

Speckle-tracking

Strain

Rechazo agudo

Trasplante cardiaco

RESUMEN

Introducción y objetivos: Algunos estudios indican que los parámetros de *strain* por *speckle-tracking* pueden ser una alternativa no invasiva a la biopsia endomiocárdica para excluir el rechazo celular agudo (RCA) moderado o grave (≥ 2 R) tras el trasplante cardiaco (TxC). En una cohorte inicial, unos puntos de corte del 15,5% para el *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo (SLGVI) y el 17% para el *strain* de pared libre del ventrículo derecho mostraron un valor predictivo negativo del 100% para excluir RCA ≥ 2 R. Nuestro objetivo es analizar la utilidad del *strain* y validar estos puntos de corte en una cohorte multicéntrica prospectiva externa.

Métodos: Estudio multicéntrico y prospectivo que incluyó a pacientes con seguimiento el primer año tras el TC. Se compararon los resultados de biopsias electivas con ecocardiogramas realizados el mismo día.

Resultados: Se incluyó a 99 pacientes y 501 pares de biopsias-ecocardiogramas. El RCA ≥ 2 R en las biopsias fue del 7,4%. El SLGVI y el *strain* longitudinal de pared libre del ventrículo derecho fueron menores durante los RCA ≥ 2 R en el análisis univariante. En el análisis multivariante, el SLGVI se asoció de manera independiente con el RCA ≥ 2 R. Los puntos de corte originales mostraron un valor predictivo negativo del 94,3% el RCA ≥ 2 R.

Conclusiones: Este estudio mantiene un alto valor predictivo negativo para excluir RCA ≥ 2 R tras el TxC y el SLGVI se asoció de manera independiente con el RCA ≥ 2 R. El *strain* y, principalmente, el SLGVI pueden ser de utilidad en el diagnóstico y el tratamiento no invasivo del RCA.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Validation of the usefulness of 2-dimensional strain parameters to exclude acute rejection after heart transplantation: a multicenter study

ABSTRACT

Introduction and objectives: Two-dimensional speckle-tracking echocardiography has emerged as a promising alternative to endomyocardial biopsy to rule out acute cellular rejection after orthotopic heart transplantation (OHT) in single center studies. In an original cohort, 15.5% and 17% of cutoff points for left ventricular global longitudinal strain (LVGLS) and free-wall right ventricular longitudinal strain, respectively, achieved 100% negative predictive value to exclude moderate or severe acute cellular rejection (ACR ≥ 2 R). Our objective was to demonstrate the usefulness of speckle-tracking and validate these cutoff points in an external cohort.

Keywords:

Speckle-tracking

Strain

Acute rejection

Heart transplantation

* Autor para correspondencia: Insuficiencia cardiaca, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Manuel de Falla 2, 28222 Majadahonda, Madrid, España.

Correo electrónico: josebegoiri@gmail.com (J. Goirigolzarri Artaza).

Methods: A prospective, multicenter study that included patients who were monitored during their first year after OHT was conducted. Echocardiographic studies analyzed by local investigators were compared with simultaneous paired endomyocardial biopsies samples.

Results: A total of 501 endomyocardial biopsy-echocardiographic studies were included in 99 patients. $ACR \geq 2R$ was present in 7.4% of samples. LVGLS and free-wall right ventricular longitudinal strain were significantly reduced during $ACR \geq 2R$ on univariate analysis. On multivariate analysis, LVGLS was independently associated with the presence of $ACR \geq 2R$. The original cutoff points demonstrated a negative predictive value of 94.3% to exclude $ACR \geq 2R$.

Conclusions: This study maintained a strong negative predictive value to exclude $ACR \geq 2R$ after OHT and LVGLS was independently associated with the presence of $ACR \geq 2R$. We propose the use of speckle-tracking, especially LVGLS, as part of the noninvasive diagnosis and management of ACR.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

BEM: biopsia endomiocárdica
 RCA: rechazo celular agudo
 SLGVI: *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo
 SLVD: *strain* longitudinal del ventrículo derecho
 STE: ecocardiografía con *speckle-tracking*
 TxC: trasplante cardiaco

INTRODUCCIÓN

Los avances en la inmunosupresión han llevado a una disminución de la incidencia del rechazo celular agudo (RCA) tras el trasplante cardiaco (TxC) ortotópico¹. Sin embargo, el RCA continúa siendo un importante motivo de preocupación, puesto que su aparición se relaciona con la pérdida del injerto y una reducción de la supervivencia a largo plazo². La vigilancia activa del RCA, por lo tanto, es imprescindible después de un TxC. Esto tiene especial importancia, dado que la técnica de referencia para la detección del RCA es la biopsia endomiocárdica (BEM), que es un método invasivo no exento de complicaciones^{3,4}. La ecocardiografía es una técnica ampliamente disponible y se han realizado muchos estudios en los que se ha evaluado su uso para el diagnóstico del RCA. Los parámetros clásicos han mostrado resultados poco uniformes, y no hay ningún parámetro que haya permitido por sí solo diagnosticar correctamente el RCA⁵⁻¹⁰.

Más recientemente, el *strain* (deformación) del miocardio ha surgido como una herramienta prometedora gracias a su mayor sensibilidad en la detección de la disfunción miocárdica en muchas situaciones clínicas^{11,12}. Varios estudios han descrito una relación significativa entre el RCA y la ecocardiografía bidimensional con *speckle-tracking* (STE)¹³⁻¹⁵. En 2015 se publicó un estudio sobre la utilidad del *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo (SLGVI) y el *strain* longitudinal de la pared libre del ventrículo derecho (SLVD) para descartar el RCA en una cohorte de un solo centro¹⁶. Los puntos de corte del 15,5 y el 17% (valores absolutos) para el SLGVI y el SLVD de la pared libre proporcionaron altas sensibilidad y especificidad para descartar RCA y alcanzaron también un valor predictivo negativo (VPN) del 100% combinando ambas variables.

Esta evidencia se basa en estudios unicéntricos, con criterios de inclusión diferentes, y se han propuesto valores de corte distintos para el diagnóstico del RCA. Además, no todos los estudios han descrito resultados positivos^{17,18}. Nuestro objetivo es realizar una validación externa de la utilidad de la STE y de los valores de corte originales propuestos para descartar con seguridad un $RCA \geq 2R$. Nuestra hipótesis era que una medición más sensible del SLGVI y el SLVD de la pared libre podría ser una herramienta útil y reproducible en el tratamiento no invasivo del RCA.

MÉTODOS

Este estudio multicéntrico se llevó a cabo en 7 centros de TxC de España. Se incluyó prospectivamente en el estudio a los pacientes consecutivos ingresados para un TxC desde diciembre de 2015 hasta diciembre de 2016, y se les dio seguimiento durante el primer año siguiente al TxC. Se evaluaron muestras emparejadas de BEM y exploraciones ecográficas realizadas en las 24 h tras la BEM y siempre antes del tratamiento del RCA en los casos que necesitaron este tratamiento.

Se realizaron las BEM a los 15 días y a los 1, 2, 3, 6 y 12 meses del TxC (tabla 1 del material adicional). Se incluyeron también las BEM de control realizadas después de un RCA moderado o grave. Las BEM fueron interpretadas por anatomopatólogos locales y se estableció un grado de afección según las recomendaciones de 2005 de la *International Society of Heart and Lung Transplantation* para el diagnóstico de RCA¹⁹. Estos resultados se consideran el patrón de referencia y la necesidad de tratamiento en los pacientes estables (generalmente aceptada en los casos con un $RCA \geq 2R$) se dejó al criterio de los clínicos locales. Todas las BEM se examinaron sistemáticamente en la búsqueda de posibles signos histológicos de rechazo mediado por anticuerpos. Las técnicas inmunopatológicas y la evaluación de la presencia de anticuerpos contra antígenos leucocitarios humanos circulantes característicos de este tipo de rechazo se llevaron a cabo según los protocolos locales de cada centro. Ecocardiografistas locales de cada centro, con enmascaramiento de los resultados de la BEM, realizaron y analizaron las exploraciones ecocardiográficas. Los criterios de exclusión principales fueron el fallo primario derecho o izquierdo grave del órgano trasplantado según la guía de la *International Society for Heart and Lung Transplantation*²⁰ y la ausencia de una ventana ecocardiográfica adecuada para evaluar los parámetros de STE. Nuestro estudio se llevó a cabo cumpliendo lo establecido en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por todos los comités de ética de investigación locales. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes en el estudio.

Se enviaron los datos relativos a los parámetros demográficos y las características clínicas y de BEM, que se introdujeron en una base de datos. Cada centro mantuvo su propio protocolo de inmunosupresión y de seguimiento tras el TxC, con la inclusión de visitas no programadas en caso necesario. Cada centro siguió su propio protocolo de vigilancia angiográfica de la aparición de enfermedad vascular del injerto (EVI) tras el TxC.

Ecocardiografía bidimensional

Tamaño de las cámaras y evaluación clásica de la función cardiaca

Todos los estudios se realizaron con un equipo de ecocardiografía (IE33, Phillips Medical Systems, Países Bajos). Se tomaron imágenes de cine empleando la imagen armónica en las

proyecciones estándares apical y paraesternal. Se determinaron los grosores del tabique interventricular y de la pared posterior, así como los diámetros telesistólico y telediastólico a partir de imágenes en modo M o bidimensional en la proyección paraesternal de eje largo. Se calcularon las dimensiones del ventrículo izquierdo (VI) y el ventrículo derecho (VD), la fracción de eyección del VI con el método de Simpson, el desplazamiento sistólico en el plano del anillo tricuspídeo y el cambio de área fraccional del VD siguiendo las recomendaciones de la *American Society of Echocardiography*²¹. Se utilizó Doppler pulsado para la medición de la onda E, la onda A (y el cálculo de la relación E/A), el tiempo de deceleración de la onda E (TDE) y el tiempo de relajación isovolumétrica. El Doppler tisular se obtuvo con el volumen de muestra en el anillo medial y lateral del VI para calcular la E' medial y la E' lateral respectivamente y luego se estimaron los cocientes E/E' medial y E/E' lateral. Se utilizó también el Doppler tisular para calcular la velocidad pico sistólica tricuspídea (S').

Parámetros derivados del speckle-tracking

Antes del inicio del estudio, se llevó a cabo una reunión de los ecocardiografistas de los diferentes hospitales con el objetivo de estandarizar los criterios para el análisis *offline* de la STE. Todos los ecocardiografistas seleccionados para este estudio tenían experiencia previa en el análisis de STE en su práctica clínica cotidiana. Los ecocardiogramas se realizaron y se analizaron en cada hospital y se enviaron luego a un segundo ecocardiografista del hospital organizador del estudio, que supervisó el *tracking* y recogió los datos. Cuando el segundo ecocardiografista consideraba que el *tracking* de la deformación era inadecuado, los ecocardiografistas locales realizaron nuevos intentos de obtener un *tracking* apropiado. En los casos infrecuentes en los que, a pesar de varios intentos de los ecocardiografistas locales, el ecocardiografista central consideró inadecuado el *tracking*, se excluyeron las proyecciones correspondientes y no se incluyeron en el análisis.

Se registraron digitalmente los datos de 3 ciclos cardiacos consecutivos para un posterior análisis *offline* mediante un programa informático comercial (QLab versión 10.2, 10.3 y 10.5) y se optimizó la frecuencia de fotogramas para cada proyección (entre 55 y 90 fps). Se determinó el pico sistólico de *strain* longitudinal por STE en los planos apicales de 4 y 2 cámaras según el modelo de 12 segmentos del VI (el mismo modelo que se utilizó en la cohorte original)¹⁶. Se calculó la media de ambos valores para determinar SLGVI. El SLGVD se obtuvo de un modelo de 6 segmentos, y el SLVD de la pared libre se determinó con el promedio de los 3 segmentos laterales. Se seleccionaron 3 regiones de interés en cada proyección y se generaron automáticamente los valores de *strain*, que se expresan en cifras absolutas en aras de una mayor claridad. Los segmentos en los que no se obtuvo un *tracking* adecuado se ajustaron manualmente hasta obtener un *tracking* correcto fotograma a fotograma. Se excluyeron las proyecciones con más de 2 segmentos con visualización endocárdica o *tracking* inadecuados.

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos con métodos gráficos y con el método de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [intervalo intercuartílico] para las variables con una distribución no normal, y los datos cualitativos se expresan mediante frecuencias y porcentajes. Con el fin de analizar la capacidad para excluir RCA, los estudios se dividieron en 2 grupos en función de que se diera un $RCA \geq 2$ R. Se utilizó la prueba de la χ^2 y la prueba de t de Student para la comparación de las variables cualitativas y

Tabla 1
Características de los pacientes (n=99)

Pacientes, n	99
Varones	78 (79)
Edad del donante (años)	51 [41-57]
Edad del receptor (años)	58 [48-64]
Hipertensión	45 (45)
Tiempo medio de isquemia (min)	218 \pm 66
Media del tiempo de circulación extracorpórea (min)	119 \pm 29
Diabetes mellitus	29 (29)
Hipercolesterolemia	44 (44)
Razones del TxC	
Miocardiopatía isquémica	31 (31)
Miocardiopatía dilatada idiopática	30 (30)
Shock tras IAM	7 (7)
Valvulopatía	7 (7)
Otras	24 (24)
Cateterismo cardiaco derecho antes de un TxC (n=80)	
Presión arterial pulmonar sistólica (mmHg)	42,5 \pm 15,8
Media de presión arterial pulmonar (mmHg)	27,3 \pm 10,2
Presión capilar pulmonar enclavada (mmHg)	19,7 \pm 8,5
Gradiente de presión transpulmonar (mmHg)	8,5 \pm 4,2
Resistencia vascular pulmonar (UW)	1,4 \pm 2,9

IAM: infarto agudo de miocardio; TxC: trasplante cardiaco ortotópico. Salvo otra indicación, los valores expresan n (%), media \pm desviación estándar o mediana [intervalo intercuartílico].

cuantitativas respectivamente. Para las variables de distribución no normal, se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ indicaba significación estadística. Los factores predictivos de un $RCA \geq 2$ R, seleccionados en función de un valor de $p < 0,05$ se introdujeron en un análisis multivariante. Para dicho análisis se utilizó una regresión logística binaria con un enfoque escalonado anterógrado. Se calcularon las curvas ROC para el SLGVI y el SLVD de la pared libre. La reproducibilidad interobservadores se evaluó con el coeficiente de correlación intraclase y con gráficos de Bland-Altman. Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS versión 20 (SPSS Inc.; Estados Unidos). Los gráficos de Bland-Altman se realizaron con el programa R (R Core Team, 2019)²².

RESULTADOS

Entre diciembre de 2015 y diciembre de 2016, se incluyó en el estudio a un total de 99 pacientes (tabla 2 del material adicional). Se excluyó a 5 pacientes a causa de una ventana ecocardiográfica deficiente. En principio se incluyeron 516 pares de BEM y ecocardiografías, pero se excluyeron 15 pares (2,9%) a causa de un material insuficiente en la BEM que impedía su comparación con las ecocardiografías. Finalmente se analizaron 501 BEM y sus

Tabla 2
Grados de RCA detectados durante el seguimiento

Pacientes, n	501
0R	241 (48,1)
1R	223 (44,5)
2R	36 (7,2)
3R	1 (0,2)

RCA: rechazo celular agudo. Los valores expresan n (%).

Tabla 3

Parámetros de ecocardiografía convencional, basada en Doppler y STE, y su relación con la presencia de un RCA \geq 2 R en el análisis univariante (los resultados de la STE se presentan en valores absolutos)

Variable	RCA < 2R (n = 464)	RCA \geq 2 R (n = 37)	p
<i>Parámetros clásicos</i>			
FEVI (%)	65,3 \pm 7,3	63,9 \pm 8,6	0,29
Tabique interventricular (mm)	11,4 \pm 0,2	11 \pm 0,2	0,3
Pared posterior (mm)	10 \pm 0,2	10 \pm 0,1	0,6
Tiempo de relajación isovolumétrica (s)	80 [60-100]	70 [50-91,5]	0,02*
E (cm/s)	81 [67,5-96]	87 [72,8-115,5]	0,016*
A (cm/s)	47,8 \pm 14,1	51 \pm 18,8	0,1
Cociente E/A	1,8 \pm 0,6	2 \pm 0,9	0,1
E medial en la exploración por Doppler tisular (cm/s)	7,9 \pm 2,4	7,9 \pm 2,5	0,9
Cociente E/E' medial	11 \pm 4,2	11,1 \pm 4,2	0,8
E lateral en la exploración por Doppler tisular (cm/s)	12 \pm 3,1	11 \pm 3,4	0,1
Cociente de E/E' lateral	6,8 [5,2-8,8]	8,2 [5,7-11,3]	0,009**
CAFVD (%)	47,3 \pm 9,7	48,5 \pm 11,5	0,5
DSPAT (mm)	14 [12-16]	13 [10-16]	0,021*
S' en exploración por Doppler tisular tricuspídea (cm/s)	9,8 \pm 2,3	9,1 \pm 3,5	0,2
PAPs ecocardiográfica	33,5 \pm 10	35,2 \pm 8,6	0,4
Grosor del ventrículo derecho (mm)	5 [4,5-6,6]	6 [4,9-7,2]	0,026*
<i>Parámetros de la STE</i>			
SLGVI 4 C (%)	17,5 \pm 3,1	15,8 \pm 3,5	0,004**
SLGVI 2 C (%)	17,5 \pm 3,4	16,1 \pm 3,5	0,029*
SLGVI (%)	17,5 \pm 3	16,1 \pm 3,4	0,01*
SLGVD (%)	18,8 \pm 3,3	17,5 \pm 4	0,028*
SLVD de pared libre (%)	19,5 \pm 3,4	18 \pm 3,9	0,019*

CAFVD: cambio de área fraccional del ventrículo derecho; DSPAT: desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; PAPs: presión arterial pulmonar sistólica; RCA: rechazo celular agudo; SLGVD: *strain* longitudinal global del ventrículo derecho; SLGVI 2 C: *strain* longitudinal del ventrículo izquierdo en proyección bicameral; SLGVI 4 C: *strain* longitudinal del ventrículo izquierdo en proyección tetracameral; SLGVI: *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo; SLVD: *strain* longitudinal del ventrículo derecho; STE: ecocardiografía con *speckle tracking*.

Los valores expresan media \pm desviación estándar o mediana [intervalo intercuartílico].

* p < 0,05.

** p < 0,01.

correspondientes evaluaciones ecocardiográficas. El número medio de BEM por paciente fue 4 (intervalo, 1-10). Las características basales de los pacientes se muestran en la **tabla 1**.

En la **tabla 2** se presenta el grado de RCA observado durante el seguimiento en las 501 BEM. Las BEM se dividieron en 2 grupos según hubiera o no un RCA \geq 2 R. Se halló RCA \geq 2 R en 37 muestras (7,4%) y correspondía a 26 pacientes, de los que 9 habían tenido más de un episodio de RCA \geq 2 R. Se observaron signos inmunopatológicos de rechazo mediado por anticuerpos en 3 exámenes (pAMR1-1), sin que hubiera ningún otro signo o síntoma de rechazo. Ninguno se consideró significativo ni tuvo un RCA \geq 2 R simultáneamente. Hubo 1 muerte debida a un RCA resistente en el momento de la tercera BEM. Las demás muertes durante el seguimiento se debieron a 2 casos de sepsis, 1 muerte súbita cardiaca (en un paciente sin coronariografía previa) y 1 caso de fallo multiorgánico (sin exploraciones ecocardiográficas con análisis de STE debido a un curso clínico indolente).

Análisis univariante

En la **tabla 3** se muestran los parámetros de ecocardiografía convencional y de STE relacionados con la presencia de un RCA \geq 2 R en el análisis univariante. La fracción de eyección del VI no mostró diferencias significativas entre estos 2 grupos, como tampoco en el grosor en la pared posterior o septal del VI. El tiempo de relajación isovolumétrica fue significativamente inferior

en los pacientes con un RCA \geq 2 R. Además, los valores de E y del cociente E/E' lateral fueron notablemente superiores. La presencia de un derrame pericárdico significativo (moderado o grave) fue más frecuente en los exámenes en que se halló un RCA \geq 2 R (el 8,3 frente al 24,3%; p = 0,008).

El SLGVI y el SLGVD mostraron una reducción significativa en los pacientes con RCA \geq 2 R en el análisis univariante (**figura 1**). El SLGVI fue del 17,5% \pm 3% en los pacientes con RCA < 2 R y del 16,1% \pm 3,4% en aquellos con RCA \geq 2 R (p = 0,01). Se observaron diferencias similares entre los 2 grupos en cuanto al SLVD de la pared libre (el 19,5% \pm 3,4% con RCA < 2 R frente al 18% \pm 3,9% con RCA \geq 2 R; p = 0,019).

Análisis multivariante

En el análisis multivariante, el tiempo de relajación isovolumétrica, el cociente E/E' lateral y el SLGVI continuaron mostrando una relación independiente con la ausencia de RCA \geq 2 R (**tabla 4**). El SLGVI fue el mejor parámetro para descartar un RCA \geq 2 R.

Valores de corte

El área bajo la curva de características operativas del receptor fue 0,67 para el SLGVI y de 0,60 para el SLVD de la pared libre. Se aplicaron a nuestra cohorte los valores de corte originales del SLGVI y del SLVD de la pared libre (valores absolutos del 15,5 y el

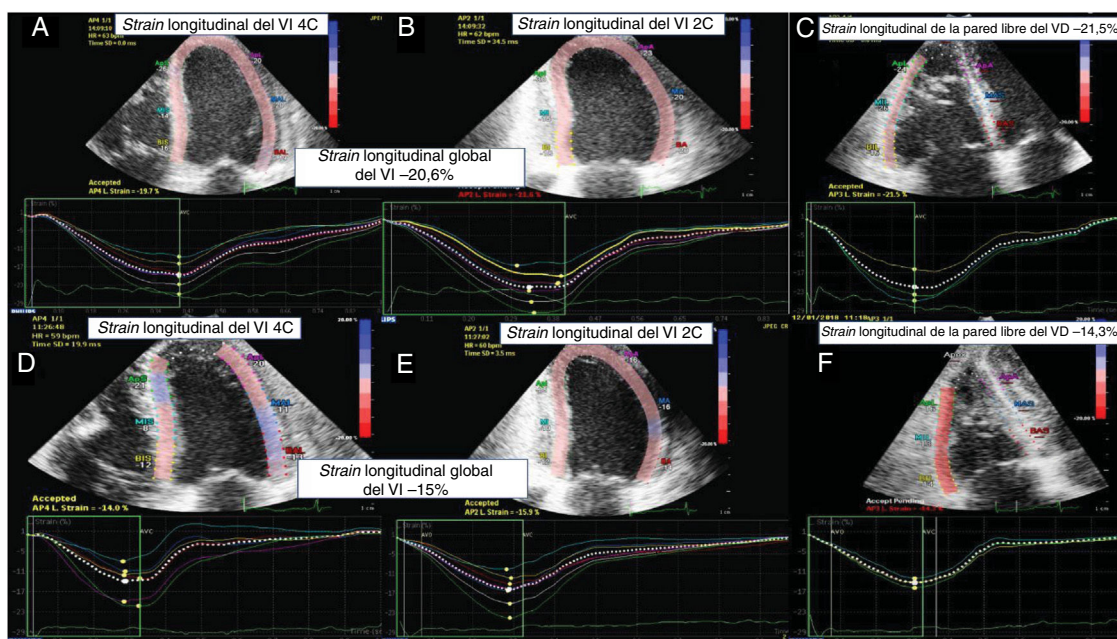


Figura 1. Imágenes de STE de un paciente. A-C: BEM clasificada como de grado 0 R. D-F: un episodio de RCA \geq 2 R. De izquierda a derecha: *strain* longitudinal del VI tetracameral, *strain* longitudinal del VI bicameral y *strain* longitudinal de la pared libre del VD. BEM: biopsia endomiocárdica; RCA: rechazo celular agudo; STE: ecocardiografía *speckle-tracking* bidimensional; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

Tabla 4

Parámetros ecocardiográficos relacionados con la ausencia de RCA \geq 2 R en el análisis multivariante

Variable	OR (IC95%)	p
SLGVI	1,23 (1,1-1,4)	0,01
TRIV	1,01 (1-1,03)	0,04
Cociente E/E' lateral	0,9 (0,82-0,98)	0,02

IC95%: intervalo de confianza del 95%; OR: *odds ratio*; RCA: rechazo celular agudo; SLGVI: *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo; TRIV: tiempo de relajación isovolumétrica.

17% respectivamente), así como las variables cualitativas correspondientes a los pacientes con un SLGVI $>$ 15,5% y un SLVD de la pared libre $>$ 17% (SLGVI $>$ 15,5% + SLVD de la pared libre $>$ 17%). En la **tabla 5** se muestran los resultados del rendimiento de la prueba con cada valor por lo que respecta a excluir RCA \geq 2 R. El VPN fue del 93,7% para el *strain* de la pared libre del VD, del 94,1% para el SLGVI y del 94,3% para el SLGVI + SLVD de la pared libre.

Del total de 501 BEM y ecocardiogramas incluidos inicialmente, en 20 casos no fue posible un análisis de STE por razones técnicas (4%). De las 481 exploraciones restantes, no se pudo analizar el SLGVI del 2,3% y el SLVD de la pared libre del 6,6% a causa de una visualización endocárdica deficiente a pesar del ajuste manual. Se

evaluó la reproducibilidad interobservadores en 28 exámenes que incluían ecocardiografías de todos los centros. El coeficiente de correlación intraclass general para el SLGVI fue de 0,86 (intervalo de confianza del 95% [IC95%], 0,72-0,93) y para el SLVD de la pared libre fue de 0,93 (IC95%, 0,86-0,97). Los gráficos de Bland-Altman se muestran en la **figura 2**.

Enfermedad vascular del injerto

La enfermedad vascular del injerto (EVI) se clasificó angiográficamente según la clasificación de la ISHLT (EVI₀₋₃)²³. Dos pacientes presentaron una EVI grave (EVI₃). En el primero de ellos hubo una angiografía inicial sin estenosis significativas, y varios meses después del TxC sufrió un infarto agudo de miocardio. Tan solo se incluyeron los ecocardiogramas anteriores al infarto. En el segundo paciente no hubo episodios de RCA \geq 2 R durante el seguimiento, como tampoco en el único paciente con una EVI moderada (EVI₂). No se dispuso de información de 26 pacientes (26,2%) sobre el estado de la coronariografía 1 año después del TxC. En la mayor parte de los casos, esto se debió a los protocolos locales de supervisión angiográfica de EVI que realizaban la primera coronariografía de control más de 1 año después del TxC (tiempo de seguimiento del estudio).

Tabla 5

Valores de corte originales del SLGVI y el SLVD de la pared libre relacionados con el diagnóstico de RCA \geq 2 R y sus valores de prevalencia, sensibilidad, especificidad, predictivo positivo, predictivo negativo, *hazard ratio* y exactitud

Valor de corte de la STE	PMS (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Exactitud (%)	HR (IC95%)
SLVD de pared libre $<$ 17%	77,7	33	78,6	11	93,7	75	1,6 (0,93-2,6)
SLGVI $<$ 15,5%	75,1	38,2	76,1	11,1	94,1	73	1,6 (1,01-2,5)
SLGVI $<$ 15,5% + SLVD de pared libre $<$ 17%	63,5	51,5	64,7	10,7	94,3	64	1,5 (1,02-2,1)

HR: *hazard ratio*; IC95%: intervalo de confianza del 95%; PMS: prevalencia de las medidas en la muestra; RCA: rechazo celular agudo; SLGVI: *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo; SLVD: *strain* longitudinal del ventrículo derecho; STE: ecocardiografía con *speckle-tracking*; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

Valores de *hazard ratio* para el análisis univariante de predicción del RCA \geq 2 R.

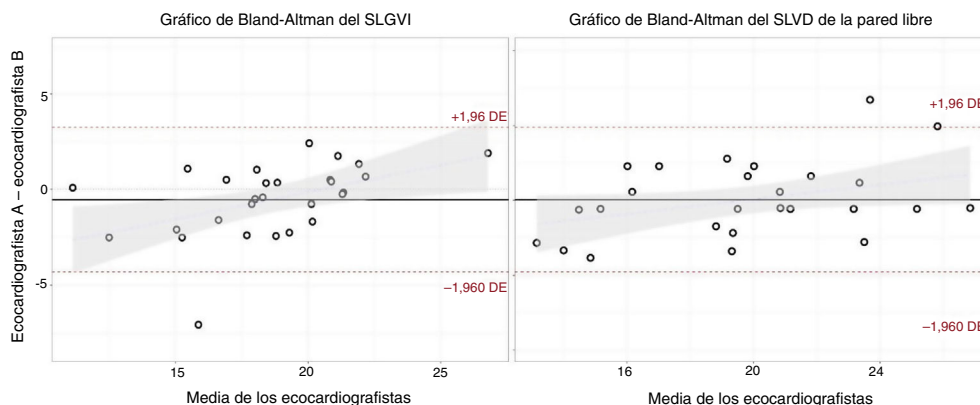


Figura 2. Análisis de Bland-Altman de la variabilidad interobservadores. Análisis de Bland-Altman del *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo (izquierda) y del *strain* longitudinal de la pared libre del ventrículo derecho (derecha). SLGVI: *strain* longitudinal global del ventrículo izquierdo; SLVD: *strain* longitudinal del ventrículo derecho.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio multicéntrico es validar la utilidad de los parámetros de la STE para descartar el RCA en pacientes asintomáticos durante el primer año tras un TxC. Este es el primer estudio multicéntrico en el que se ha evaluado la utilidad de la STE en el RCA tras el TxC. Se evaluó también la utilidad del análisis del *strain* del VD, que hasta la fecha se ha descrito muy poco en este contexto.

Nuestro estudio confirma la reducción de los parámetros de la STE del VI y el VD durante el RCA ≥ 2 R. Además, en el análisis multivariante, el SLGVI mostró asociación independiente con el RCA ≥ 2 R. Por último, este estudio halla un fuerte VPN cuando se combinan el SLGVI y el SLVD de la pared libre, que por lo tanto podría ser una herramienta útil para el tratamiento no invasivo del RCA y la optimización de las pautas de tratamiento inmunosupresor.

Los parámetros de la STE se han propuesto anteriormente en varios estudios como instrumento para el diagnóstico no invasivo del RCA, pero continúa habiendo debate al respecto^{13–18}. Estos estudios previos son unicéntricos y se han utilizado criterios de inclusión y poblaciones heterogéneas. Además, no todos han mostrado una reducción significativa del SLGVI o algún otro parámetro de *strain* en contextos de RCA^{17,18}. A este respecto, la mayor parte de los estudios describen la utilidad del SLGVI más tarde tras el TxC, y la evidencia existente para respaldar su uso durante el primer año siguiente al TxC es menor^{13,16,18}. Ambardekar et al.¹⁸ no pudieron mostrar ningún cambio en el análisis de la STE durante los episodios de rechazo asintomáticos (cualquier grado de RCA). En nuestro estudio solo se tuvo en cuenta un RCA ≥ 2 R, ya que uno leve asintomático (RCA = 1R) no suele ser objeto de tratamiento, y ello puede explicar en parte la diferencia observada en nuestros resultados.

Son importantes puntos fuertes de este estudio su carácter multicéntrico y su diseño concebido para una amplia aplicabilidad a pacientes con un TxC y para que refleje la práctica clínica real en los centros de TxC. Esto conlleva, naturalmente, una mayor variabilidad y unos resultados menos favorables que en la cohorte original. De hecho, los valores de STE mostraron un mayor solapamiento entre los 2 grupos (RCA < 2 R frente a ≥ 2 R) y hubo una ligera disminución del VPN (el 94,3% en la presente cohorte frente al 100% en la cohorte original para la variable SLGVI $> 15,5\%$ + SLVD de la pared libre $> 17\%$)¹⁶.

Tras el análisis multivariante, el SLVD de la pared libre dejó de mostrar una asociación significativa con la aparición de un RCA ≥ 2 R. Estos resultados podrían estar influidos por varios factores. En primer lugar, la obtención y el análisis de las proyecciones del

VD es más difícil que para las proyecciones apicales del VI; por consiguiente, pueden ser menos fiables que el SLGVI en la práctica clínica cotidiana. Esto se confirma por el hecho de que hubiera más segmentos ventriculares derechos no analizables (6,6%), en comparación con el SLGVI (2,3%). Además, la presencia de hipertensión pulmonar en pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada está relacionada con la insuficiencia del VD después del TxC. Además, en una fase temprana tras muchas intervenciones de cirugía cardiaca (no exclusivamente en el caso del TxC) se produce un cambio natural del patrón de contractilidad y la geometría del VD, con una pérdida relativa del acortamiento longitudinal²⁴. Todos estos hechos contribuyen a la función del VD después de un TxC, incluso en ausencia de RCA.

La variabilidad y la reproducibilidad de la STE continúan siendo un importante motivo de preocupación no solo entre los diferentes proveedores, sino también en lo que respecta a las actualizaciones del *software* para la valoración del *strain*^{25–28}. El optimismo es general en cuanto a que esta limitación se reducirá con los avances tecnológicos^{12,29–31}. Actualmente se recomienda realizar ecocardiografías seriadas con los mismos proveedor y *software*, si bien las actualizaciones parecen inevitables y los estudios realizados con una tecnología antigua tienen escasos valor y utilidad. La cohorte original se analizó con el programa de Phillips QLab 7. La cohorte de este estudio multicéntrico se evaluó con su actualización, QLab 10, y ello puede explicar en parte la pérdida de capacidad para descartar el RCA en esta cohorte con nuestros valores de corte originales.

La BEM se ha considerado el patrón de referencia para el diagnóstico del RCA y se acepta de manera generalizada que un RCA ≥ 2 R debe ser objeto de tratamiento. Sin embargo, la capacidad de la BEM de ser un verdadero patrón de referencia es cuestionable y la consideración de un RCA ≥ 2 R no debiera ser el único criterio para establecer un determinado régimen inmunosupresor^{32,33}. Es importante resaltar la variabilidad interobservadores de la BEM, que claramente han mostrado los investigadores de los estudios CARGO y CARGO II^{34–37}. Esta variabilidad entre los anatomopatólogos es superior en las muestras con algún grado de rechazo, de modo que la BEM resulta más objetiva para descartar el RCA que para diagnosticarlo. Esto contrasta con la inseguridad de haber tomado muestras de tejido lesionado por RCA en la BEM y que se produzca un error de muestreo, dada la naturaleza parcheada del RCA. Así pues, cabe la posibilidad de que se evalúen las BEM erróneamente como ausencia de RCA y, por lo tanto, no se aplique tratamiento.

La determinación del perfil de expresión génica en sangre periférica ha resultado útil para descartar el RCA ≥ 2 R en pacientes con bajo riesgo, y una estrategia basada en esta técnica resulta

segura en el seguimiento de esta complicación y sus consecuencias tras el TxC^{33,36,37}. Hoy es el método más comúnmente utilizado en el tratamiento no invasivo del RCA después de un TxC. Sin embargo, no se ha evaluado la utilidad de determinar el perfil precozmente (< 2 meses) después de un TxC o un RCA reciente^{33,37}. En el estudio CARGO II, se mantuvo un VPN excelente (el 98,1% para un valor de corte de 34), que aumentó a un 100% al modificar el punto de corte y reducir simultáneamente el valor predictivo positivo a un 2%. De igual modo, en este estudio se obtuvo un VPN del 94,3% para el SLGVI + SLVD de la pared libre (con un valor predictivo positivo del 10,7%). La prevalencia de un RCA ≥ 2 R en el estudio CARGO II fue de tan solo un 3,2% (frente a un 7,4% en nuestra serie), lo cual contribuye a explicar el elevado VPN y el escaso valor predictivo positivo, que es un hallazgo frecuente en los estudios de tratamiento no invasivo para descartar el RCA. La presencia de ADN libre procedente del donante en la sangre periférica del receptor (*donor-derived cell-free DNA*) permite también un diagnóstico no invasivo del RCA³⁸⁻⁴⁰. Sin embargo, los métodos iniciales requerían el genotipo tanto del receptor como del donante, y ello limitaba su aplicabilidad^{38,39,41}. Hay nuevas técnicas que parecen prometedoras en este campo, pero serán necesarios nuevos estudios para validarlas^{40,42}.

En comparación con estas alternativas, la ecocardiografía proporciona información acerca de otros parámetros básicos, además de la presencia de RCA, que tienen consecuencias en el pronóstico y el tratamiento (como la función del injerto) y pueden verse afectados por otras complicaciones derivadas del TxC. Además, estos métodos, al igual que otras técnicas de diagnóstico por la imagen como la resonancia magnética, no son tan accesibles ni están tan disponibles como la ecocardiografía. Creemos que los parámetros de la STE (en especial el SLGVI, según nuestros resultados) pueden ser una herramienta útil como parte del diagnóstico y el tratamiento no invasivos del RCA. Pueden ser de especial utilidad en pacientes asintomáticos sin ningún otro signo o síntoma de rechazo y con valores absolutos de STE más altos (en los que se prevé un mayor VPN). A estos pacientes se los puede considerar en bajo riesgo y se podría plantear un tratamiento no invasivo del RCA con un seguimiento estrecho, en especial en los centros de TxC en que las BEM se realizan tempranamente o en pacientes con complicaciones o dificultades para la BEM. Además, cuando se utiliza en la práctica clínica cotidiana, la variación que se produce con el tiempo puede ser también de interés. Un descenso brusco en los parámetros de *strain* en cuanto a los valores absolutos (con un VPN inferior) en comparación con las exploraciones ecocardiográficas previas también podría ser útil a los clínicos como parte del tratamiento de los pacientes con un TxC. Así pues, se recomienda su medición en la práctica clínica cotidiana para mejorar la evaluación de esos pacientes. En cualquier caso, el estudio no pretende reemplazar la BEM, sino enriquecer las posibilidades del tratamiento no invasivo del RCA.

Limitaciones

Este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, la baja prevalencia del RCA ≥ 2 R observada en nuestro estudio puede haber sobrestimado el VPN. Debe tenerse en cuenta también la necesidad de una estandarización continua de la técnica de STE, de manera que la necesaria ausencia de cambios de proveedor o de *software* sería una limitación, como puede haber ocurrido en nuestro estudio. Asimismo, no se utilizó un laboratorio central para el análisis de las biopsias ni para las mediciones de parámetros ecocardiográficos, si bien todos los datos fueron supervisados por un segundo ecocardiografista. A pesar de que nuestros resultados reflejan una mayor variabilidad, nuestro objetivo es evaluar la efectividad de STE en la práctica clínica real. Por último, no hubo un

protocolo común para la determinación de rechazo mediado por anticuerpos o de EVI en los diversos centros, y ello puede haber modificado ligeramente los resultados.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran un VPN sólido para descartar RCA ≥ 2 R cuando se combinan el SLGVI y el SLVD de la pared libre, lo cual proporciona una herramienta útil en el tratamiento no invasivo de esta complicación. Además, el SLGVI se asoció de manera independiente con la presencia de RCA ≥ 2 R. Se propone el uso sistemático de los parámetros de STE tras el TxC, sobre todo en pacientes con bajo riesgo y clínicamente estables con unos valores absolutos de STE más altos, para quienes puede ser de utilidad para disminuir la carga de BEM repetidas. Serán necesarios nuevos estudios con un tamaño muestral más amplio para confirmar estos resultados.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- El uso de parámetros de *strain* se ha propuesto en estudios unicéntricos como posible alternativa no invasiva a la BEM en el diagnóstico del RCA.
- En la cohorte original, los valores de corte del 15,5% del SLGVI y del 17% del SLVD de la pared libre mostraron un VPN del 100% para descartar el RCA.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Este es el primer estudio multicéntrico en el que se analiza la utilidad de los parámetros de la STE en el RCA.
- Los pacientes con un RCA ≥ 2 R mostraron una reducción del SLGVI y del SLVD de la pared libre en el análisis univariante.
- El SLGVI continuó siendo un factor independiente predictivo de RCA ≥ 2 R en el análisis multivariante y fue el mejor parámetro relacionado con un RCA ≥ 2 R.
- Un SLGVI > 17% y un SLVD de la pared libre > 15,5% mostraron un VPN del 94,3% para descartar el RCA ≥ 2 R.
- Los parámetros de la STE pueden usarse como parte del tratamiento no invasivo del RCA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores dan las gracias a Fina Casals, Zulaika Grille, Paula Blanco y todas las unidades de trasplante cardiaco y de diagnóstico por la imagen cardiaco que colaboraron en este proyecto.

FINANCIACIÓN

Este estudio contó con financiación mediante una subvención de investigación del Grupo de Trabajo sobre Insuficiencia Cardiaca y Trasplante Cardiaco de la Sociedad Española de Cardiología.

CONFLICTO DE INTERESES

C.-H. Li declara haber recibido pagos por conferencias de Philips, sin relación con el trabajo presentado. Los demás autores no declaran ningún conflicto de intereses.

ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.01.033>

BIBLIOGRAFÍA

1. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth Adult Heart Transplantation Report-2018; Focus Theme: Multi-organ Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37:1155–1168.
2. Radovancevic B, Konuralp C, Vrtovec B, et al. Factors predicting 10-year survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:156–159.
3. From AM, Maleszewski JJ, Rihal CS. Current status of endomyocardial biopsy. *Mayo Clin Proc*. 2011;86:1095–1102.
4. Chan MCY, Giannetti N, Kato T, et al. Severe tricuspid regurgitation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:709–717.
5. Sun JP, Abdalla IA, Asher CR, et al. Non-invasive evaluation of orthotopic heart transplant rejection by echocardiography. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:160–165.
6. Dandel M, Hummel M, Müller J, et al. Reliability of tissue Doppler wall motion monitoring after heart transplantation for replacement of invasive routine screenings by optimally timed cardiac biopsies and catheterizations. *Circulation*. 2001;104(12 Suppl 1):1184–1191.
7. Mena C, Wencker D, Krumholz HM, McNamara RL. Detection of heart transplant rejection in adults by echocardiographic diastolic indices: a systematic review of the literature. *J Am Soc Echocardiogr*. 2006;19:1295–1300.
8. Dandel M, Hetzer R. Post-transplant surveillance for acute rejection and allograft vasculopathy by echocardiography: Usefulness of myocardial velocity and deformation imaging. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:117–131.
9. Stengel SM, Allemann Y, Zimmerli M, et al. Doppler tissue imaging for assessing left ventricular diastolic dysfunction in heart transplant rejection. *Heart*. 2001;86:432–437.
10. Badano LP, Miglioranza MH, Edvardsen T, et al. European Association of Cardiovascular Imaging/Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology recommendations for the use of cardiac imaging to assess and follow patients after heart transplantation. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16:919–948.
11. Bansal M, Kasliwal RR. How do i do it? Speckle-tracking echocardiography. *Indian Heart J*. 2013;65:117–123.
12. Collier P, Phelan D, Klein A. A Test in Context: Myocardial Strain Measured by Speckle-Tracking Echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:1043–1056.
13. Clemmensen TS, Løgstrup BB, Eiskjær H, Poulsen SH. Changes in longitudinal myocardial deformation during acute cardiac rejection: The clinical role of two-dimensional speckle-tracking echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:330–339.
14. Sera F, Kato TS, Farr M, et al. Left ventricular longitudinal strain by speckle-tracking echocardiography is associated with treatment-requiring cardiac allograft rejection. *J Card Fail*. 2014;20:359–364.
15. Ruiz Ortiz M, Peña ML, Mesa D, et al. Impact of asymptomatic acute cellular rejection on left ventricle myocardial function evaluated by means of two-dimensional speckle tracking echocardiography in heart transplant recipients. *Echocardiography*. 2015;32:229–237.
16. Mingo-Santos S, Moñivas-Palomero V, Garcia-Lunar I, et al. Usefulness of Two-Dimensional Strain Parameters to Diagnose Acute Rejection after Heart Transplantation. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:1149–1156.
17. Eleid MF, Caracciolo G, Cho EJ, et al. Natural history of left ventricular mechanics in transplanted hearts: relationships with clinical variables and genetic expression profiles of allograft rejection. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3:989–1000.
18. Ambardekar AV, Alluri N, Patel AC, Lindenfeld J, Dorosz JL. Myocardial strain and strain rate from speckle-tracking echocardiography are unable to differentiate asymptomatic biopsy-proven cellular rejection in the first year after cardiac transplantation. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:478–485.
19. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, et al. Revision of the 1996 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:1229–1242.
20. Kobashigawa J, Zuckermann A, Macdonald P, et al. Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33:327–340.
21. Mitchell C, Rahko PS, Blauwet LA, et al. Guidelines for Performing a Comprehensive Transthoracic Echocardiographic Examination in Adults: Recommendations from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2019;32:1–64.
22. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>. Consultado 27 Ene 2020.
23. Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:717–727.
24. Raina A, Vaidya A, Gertz ZM, Susan Chambers. Forfia PR. Marked changes in right ventricular contractile pattern after cardiopulmonary surgery: Implications for post-surgical assessment of right ventricular function. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32:777–783.
25. Nagata Y, Takeuchi M, Mizukoshi K, et al. Intervendor variability of two-dimensional strain using vendor-specific and vendor-independent software. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:630–641.
26. Castel AL, Menet A, Ennezat PV, et al. Global longitudinal strain software upgrade: Implications for intervender consistency and longitudinal imaging studies. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016;109:22–30.
27. Farsalinos KE, Daraban AM, Ünlü S, Thomas JD, Badano LP, Voigt JU. Head-to-Head Comparison of Global Longitudinal Strain Measurements among Nine Different Vendors: The EACVI/ASE Inter-Vendor Comparison Study. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:1171–1181.
28. Costa SP, Beaver TA, Rollor JL, Vanichakarn P, Magnus PC, Palac RT. Quantification of the variability associated with repeat measurements of left ventricular two-dimensional global longitudinal strain in a real-world setting. *J Am Soc Echocardiogr*. 2014;27:50–54.
29. D'Hooge J, Heimdal A, Jamal F, et al. Regional Strain and Strain Rate Measurements by Cardiac Ultrasound: Principles Implementation and Limitations. *Eur J Echocardiogr*. 2000;1:154–170.
30. Voigt JU, Pedrizzetti G, Lysyansky P, et al. Definitions for a common standard for 2 D speckle tracking echocardiography: consensus document of the EACVI/ASE/ Industry Task Force to standardize deformation imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16:1–11.
31. Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, et al. Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endorsed by the Japanese society of echocardiography. *Eur J Echocardiogr*. 2011;12:167–205.
32. Baran DA, Taylor DO, Kobashigawa JA. Immunosuppression and Heart Transplantation: How Do We Define Success? *Am J Transplant*. 2010;10:205–206.
33. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, et al. Gene-Expression Profiling for Rejection Surveillance after Cardiac Transplantation. *N Engl J Med*. 2010;362:1890–1900.
34. Marboe CC, Billingham M, Eisen H, et al. Nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) cause significant variability in diagnosis of ISHLT Grade 2 and 3 A rejection in cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(7 SUPPL.):219–226.
35. Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, et al. Concordance among pathologists in the second Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study (CARGO II). *Transplantation*. 2012;94:1172–1177.
36. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant*. 2006;6:150–160.
37. Crespo-Leiro MG, Stypmann J, Schulz U, et al. Clinical usefulness of gene-expression profile to rule out acute rejection after heart transplantation: CARGO II. *Eur Heart J*. 2016;37:2591–2601.
38. De Vlaminck I, Valentine HA, Snyder TM, et al. Circulating Cell-Free DNA Enables Noninvasive Diagnosis of Heart Transplant Rejection. *Sci Transl Med*. 2014;6:241ra77–241ra77.
39. Hidestrand M, Tomita-Mitchell A, Hidestrand PM, et al. Highly Sensitive Noninvasive Cardiac Transplant Rejection Monitoring Using Targeted Quantification of Donor-Specific Cell-Free Deoxyribonucleic Acid. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1224–1226.
40. Beck J, Bierau S, Balzer S, et al. Digital Droplet PCR for Rapid Quantification of Donor DNA in the Circulation of Transplant Recipients as a Potential Universal Biomarker of Graft Injury. *Clin Chem*. 2013;59:1732–1741.
41. Snyder TM, Khush KK, Valentine HA, Quake SR. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:6229–6234.
42. Grskovic M, Hiller DJ, Eubank LA, et al. Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *J Mol Diagn*. 2016;18:890–902.