



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Clínica

**ANÁLISIS DE LA CONSISTENCIA EN LA
IDENTIFICACIÓN DE MICROCRISTALES EN
LÍQUIDO SINOVIAL MEDIANTE
MICROSCOPIA ÓPTICA**

TESIS DOCTORAL DE:

D. José Antonio Bernal Vidal

DIRECTORES DE TESIS:

Prof. Dr. Eliseo Pascual Gómez

Dra. Paloma Vela Casasempere

Alicante, 2017

AGRADECIMIENTOS

A Sara y Martín por darme los momentos más bonitos. A mis padres, hermano y cuñada por preocuparse y escucharme. A mi primo Alejandro por su ayuda en el diseño.

A mis directores de tesis, aunque oficialmente figuren dos han sido tres todo el tiempo: Dr. Mariano Andrés, Dra. Paloma Vela y Prof. Eliseo Pascual.

Por supuesto también quiero agradecer a mis otros compañeros del estudio por dedicar su limitado tiempo a este proyecto (Dr. Salvador López y Dra. Vega Jovaní), y al resto de reumatólogos del Hospital General de Alicante por colaborar indirectamente (Dra. Isabel Ibero, Dr. Agustín Martínez y Dr. Ximo Esteve). También me gustaría nombrar a Silvia Gómez y Rocío Caño por su gran ayuda en la organización y recogida de datos.

ÍNDICE

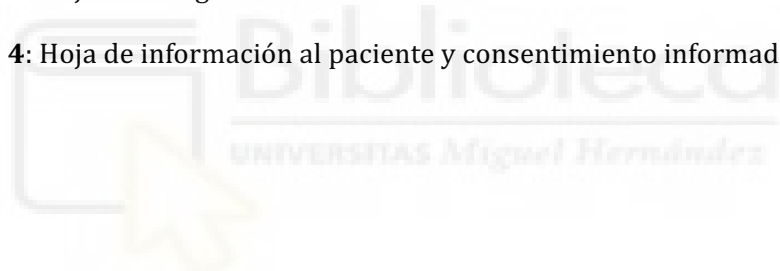
ABREVIATURAS	4
LISTA DE TABLAS	5
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 Enfermedades por microcristales	11
2.1.1 Gota	11
2.1.2 Artropatía por pirofosfato cálcico	14
2.2 Historia de la identificación de microcristales	15
2.3 Identificación de microcristales	18
2.3.1 La técnica	18
2.3.2 Validez y reproducibilidad de identificación de microcristales al microscopio óptico	22
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos	29
6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1 Diseño	30
6.2 Pacientes	30
6.2.1 Muestreo y reclutamiento	30
6.2.2 Criterios de selección	30
6.3 Variables del estudio	31
6.3.1 Variables principales	31

6.3.2 Variables secundarias	31
6.4 Procedimientos	32
6.5 Aspectos éticos.....	35
6.6 Aspectos estadísticos	36
6.6.1 Tamaño muestral	36
6.6.2 Análisis estadístico	36
6.7 Duración del estudio	38
6.8 Memoria económica	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Participación y características generales de las muestras analizadas...	39
7.2 Análisis de concordancia entre observadores	41
7.2.1 Influencia del tiempo que se tarda en analizar la muestra....	41
7.2.2 Comparación de expertos frente a no expertos	43
7.3 Análisis en las distintas fases del microscopio	44
7.3.1 Microscopía con luz simple	44
7.3.2 Microscopía con luz polarizada	45
7.3.3 Microscopía con compensador rojo de primer orden.....	47
8. DISCUSIÓN	49
8.1 Comparación con estudios previos	49
8.2 Datos descriptivos de la muestra	50
8.3 Concordancia	51
8.4 Análisis al microscopio óptico con luz simple	52
8.5 Análisis al microscopio óptico con luz polarizada	53
8.6 Influencia del tiempo en el análisis	54
8.7 Número de campos a analizar	55

8.8 Fortalezas	55
8.9 Limitaciones	56
8.10 Lecciones aprendidas	57
8.11 Futuras líneas de investigación a raíz de esta tesis doctoral	57
9. CONCLUSIONES	58
10. BIBLIOGRAFÍA	59

ANEXOS

Anexo 1: Aprobación del estudio por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante.....	66
Anexo 2: Hoja de recogida de datos. Extracción.....	67
Anexo 3: Hoja de recogida de datos. Análisis.....	68
Anexo 4: Hoja de información al paciente y consentimiento informado.....	69



ABREVIATURAS

ANKH: ankylosing homolog protein

AR: artritis reumatoide

CPPD: calcium pyrophosphate dihydrate

DE: desviación estándar

FN: falso negativo

FP: falso positivo

IFP: interfalángica proximal

κ: kappa

LS: líquido sinovial

NLR: node-like receptors

MSU: monosodium urate

MTF: metatarsofalángica

PC-1: plasma cell glycoprotein-1

PD: power Doppler

PFC: pirofosfato cálcico

TCDE: tomografía computarizada de doble energía

UMS: urato monosódico



LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
Tabla 1	Características microscópicas de UMS y PFC	19
Tabla 2	Estudios de la validez de la identificación de cristales al microscopio óptico	26
Tabla 3	Características generales de los pacientes de las observaciones realizadas	40
Tabla 4	Análisis de concordancia entre 5 observadores independientemente del tiempo que se tardó en analizar el líquido sinovial	41
Tabla 5	Análisis de concordancia entre 5 observadores siendo todas las observaciones realizadas antes de 24 horas	42
Tabla 6	Análisis de concordancia entre 5 observadores siendo alguna observación de cada una de las muestras posterior a 24 horas	42
Tabla 7	Comparación de κ de muestras analizadas antes de 24 horas frente a muestras con algún análisis posterior a 24 horas	42
Tabla 8	Análisis de concordancia entre los 3 observadores expertos	43
Tabla 9	Análisis de concordancia entre los 2 observadores no expertos	43
Tabla 10	Relación entre el diagnóstico al microscopio óptico y la conclusión final	44
Tabla 11	Análisis de concordancia entre los 5 observadores en el microscopio óptico	45
Tabla 12	Relación del diagnóstico con luz polarizada y la conclusión final	46
Tabla 13	Análisis de concordancia entre los 5 observadores en el microscopio con luz polarizada	46
Tabla 14	Relación del diagnóstico con compensador rojo y la conclusión final	47
Tabla 15	Análisis de concordancia entre los 5 observadores en el microscopio con compensador rojo	48
Tabla 16	Comparación de estudios de reproducibilidad entre múltiples observadores en diversas técnicas de amplio uso en práctica clínica	50

1. RESUMEN

Introducción

Las enfermedades por depósito de cristales más frecuentes son la artritis por pirofosfato cálcico (PFC) y la gota por el depósito de cristales de urato monosódico (UMS). La técnica *gold standard* para el diagnóstico de estas enfermedades es el análisis del líquido sinovial al microscopio óptico polarizado con compensador rojo. Distintos estudios han intentado demostrar la validez de la prueba con no muy buenos resultados y solo dos estudios la fiabilidad, con buenos resultados, pero no era su objetivo principal.

Hipótesis

La identificación de cristales al microscopio óptico será una prueba consistente entre varios observadores.

Objetivos

1) Determinar el grado de concordancia entre múltiples observadores en la detección e identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico; 2) Estimar la frecuencia de identificación correcta de cristales (sensibilidad) mediante la microscopía óptica con luz ordinaria; 3) Demostrar que el examen con filtro polarizado cruzado es el tipo de filtro que mejor identifica los cristales de UMS; 4) Evaluar si hay menor concordancia en los líquidos analizados después de 24 horas; y 5) Establecer el número de campos que es necesario analizar hasta identificar el primer cristal.

Métodos

Estudio observacional transversal realizado en un único centro con muestreo consecutivo de líquidos sinoviales. Estos se analizaron por 5 observadores al microscopio óptico para detectar e identificar microcristales, de forma independiente y ciega a los datos clínicos. El análisis del líquido sinovial se hizo en tres fases a 400x, la primera fue el análisis con microscopio óptico con luz simple, el segundo paso fue el análisis con luz polarizada y el último paso el análisis con compensador rojo de primer orden. En todas las fases se registró si habían cristales y si los había de qué tipo (No cristales, UMS, PFC y UMS+PFC). Se midió el grado de acuerdo entre los 5 observadores mediante la kappa de Cohen, con estimación de su intervalo de confianza al 95% (IC95%).

Resultados

El líquido sinovial se obtuvo principalmente de rodillas (67,3%) y tobillos (13,2%) de pacientes con patologías muy variadas vistos en consultas de reumatología. Se han incluido 31 muestras de líquido sinovial analizadas por los 5 observadores, en total 155 observaciones. Se obtuvo un κ global de 0,759 (IC95% 0,6274-0,8901) que corresponde con un grado de acuerdo bueno. El κ para UMS fue de 0,9058 (IC95% 0,7616-1,0496) y para el PFC se obtuvo un κ de 0,6559 (IC95% 0,4700-0,8411). Respecto al tiempo hasta el análisis se comparó el grado de concordancia de los líquidos en los que todas las observaciones se hicieron antes de 24 horas con los que alguna de ellas se hizo posterior a 24 horas y no se encontraron diferencias significativas. Respecto al número de campos la mediana para encontrar tanto PFC como UMS fue de 1 campo (p25-75 1-3).

Conclusión

Pese a exigir acuerdo entre múltiples observadores, la microscopía óptica polarizada se ha mostrado consistente en la detección e identificación de cristales en líquido sinovial, en especial para UMS, lo que confirma su elevada utilidad en práctica clínica.



ABSTRACT

Introduction

The gold standard for crystal-related arthritis diagnosis remains synovial fluid analysis by a microscope fitted with compensated polarized filters as it has been shown an immediate, valid, easy to learn, and reliable procedure (for the last, only in two studies not designed for this purpose). The objective was to analyze the agreement between multiple observers in crystal identification using a compensated polarized optic microscope. Finding good reliability results between multiple observers would reinforce the value of the technique.

Hypothesis

Crystal identification by polarized optic microscope will be a consistent test even among several observers.

Methods

Cross-sectional observational study performed at a single center with consecutive synovial fluid sampling. Samples were immediately analyzed when possible or kept refrigerated at 4°C. Five observers analyzed these samples under a compensated polarised optical microscope to detect and identify crystals, independently and blinded to clinical data. It was a 3-step analysis (first step was ordinary light; second was simple polarized light; and third was compensated polarized light) with observation at 400x fields. At every step the presence and type of crystal (No crystals, MSU, CPPD, MSU+CPPD) was recorded. It was necessary to analyze 30 fields to classify it as no

crystal sample. Also, sub-analyses were performed on a) time of sample visualization (≤ 24 hours or > 24 hours of sampling), b) expertise on crystal identification (≤ 10 years or > 10 years) and c) number of field where the first crystal was seen during ordinary light analysis. Inter-rater agreement by kappa (κ) statistic in every step was measure.

Results

The synovial fluids samples were obtained mostly from knees (67.3%), ankles (13.2%) and wrist (6.8%) of patients seen at rheumatology clinic or during admissions. Main rheumatic diseases were gout (33.8%), rheumatoid arthritis (18.4%), CPPD related arthritis (15%) and arthritis under study (8.3%). A total of 31 samples were analyzed by all five observers (155 observations). Overall κ was 0.759 (CI95% 0.6274-0.8901) thus indicating good agreement. Agreement for detection was κ 0.75 (CI95% 0.61-0,90) and κ for MSU was 0.91 (CI95% 0.76-1.05) while for CPPD was 0.66 (CI95% 0.47-0.84). Regarding secondary endpoints, no differences were noted between observations made before or after 24 hours (p 0.68 for κ comparison), nor in expertise in crystal analysis (p 0.63 for κ comparison). The median number of fields to identify crystals was 1 (p_{25-75} 1-3).

Conclusion

Even requiring agreement among multiple observers, compensated polarized microscopy remains consistent in the detection and identification of crystals in synovial fluid, confirming its high utility in clinical practice.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDADES POR MICROCRISTALES

Los tipos de cristales que se pueden observar a nivel articular y de partes blandas son muy variados, encontrándose entre ellos los cristales de fosfato cálcico básico (como la apatita), de oxalato cálcico, de colesterol o de corticoides. Pero las enfermedades por depósito articular de cristales más relevantes en la práctica clínica son la gota y la artritis por cristales de pirofosfato cálcico (PFC). La gota, causada por cristales de urato monosódico (UMS), es la causa más frecuente de artritis en varones; y la artritis por cristales de pirofosfato cálcico es una de las principales causas de artritis en mayores de 50 años. Ambas ocurren por el depósito de los respectivos cristales en el interior de las articulaciones y en otras áreas habitualmente periarticulares. Su capacidad de activar al sistema inmune innato al ser reconocidas como señales de peligro (1) activa el inflammasoma NALP3 (2). Su presentación clínica puede plantear diagnóstico diferencial con otras entidades, pero sobre todo con la artritis séptica, que requiere manejo urgente y hospitalización.

2.1.1 GOTA

La gota es la enfermedad que ocurre por el depósito de cristales de UMS en los tejidos del sistema musculoesquelético. Es la causa más frecuente de artritis aguda en adultos de países occidentales (3) y su prevalencia está aumentando en los últimos 50 años en todos los países en que se ha mirado (4). Afecta principalmente a varones adultos. Cuando afecta a mujeres, suele ser a mujeres posmenopáusicas (5) y de un perfil distinto al de los varones – mayor edad, mayor prevalencia de enfermedad renal crónica y mayor uso de diuréticos (6,7)-.

El depósito de cristales de UMS precisa de una situación de hiperuricemia mantenida. Hay varias definiciones de hiperuricemia pero se podrían admitir dos de ellas. Por un lado la epidemiológica, en relación a niveles de uricemia poblacionales, donde se considera hiperuricemia a niveles de ácido úrico sérico por encima de 6 mg/dL en varones y 5 mg/dL en mujeres (8). Sin embargo, desde un punto de vista fisiopatológico se define hiperuricemia como la concentración por encima del nivel de saturación del ácido úrico sérico -6,8 mg/dL- (9), dado que niveles persistentemente superiores al punto de saturación conllevarán la cristalización y depósito del UMS. Hay que destacar que no todos los pacientes con hiperuricemia presentan clínica de gota; de hecho, se estima que la incidencia anual de gota es del 5% en pacientes con hiperuricemia (10). Además, en estudios con ecografía y tomografía computarizada de doble energía se ha detectado que aproximadamente uno de cada cuatro pacientes con hiperuricemia asintomática presentan depósitos de cristales de UMS (11–13) y por lo tanto gota.

La manifestación clínica principal de la gota será consecuencia de la respuesta inflamatoria a los cristales, pero solo si hay afectación de estructuras con membrana sinovial, esencialmente artritis o bursitis. La respuesta inflamatoria en otras localizaciones (ej. tofos) suele pasar inadvertida. Los ataques de gota ocurren preferentemente en articulaciones de carga como la primera metatarsofalángica, el tobillo o la rodilla. Aunque también pueden ocurrir, con menos frecuencia, en otras localizaciones como carpo, metacarpofalángicas o bolsas sinoviales. Junto con el episodio de inflamación se pueden presentar síntomas sistémicos de inflamación como

fiebre o malestar general, sobre todo si se afectan articulaciones grandes o afectación poliarticular. En los primeros ataques de gota la clínica suele ser de monoartritis, y en pacientes en los que se mantiene la hiperuricemia, y con ella la formación de cristales, pueden presentar al cabo del tiempo episodios de inflamación oligo y poliarticular. Con el tiempo los ataques ocurren con más frecuencia e incluso son más duraderos, presentando inflamación mantenida poliarticular que se puede confundir con otras artritis crónicas. La aparición de tofos nos indica que se trata de una gota de larga evolución. Un tofo es un acúmulo de cristales de UMS rodeado de celularidad inflamatoria crónica con células gigantes multinucleadas. En la exploración física se muestran como nódulos subcutáneos, en bursas, tendones o periarticulares, y son de un aspecto blanco-amarillento cuyo interior es blanco.

La presencia de cristales de UMS en líquido sinovial se asocia a un leve aumento de celularidad a costa de leucocitos polimorfonucleares, incluso en articulaciones asintomáticas (14). Esto indica que hay un grado de inflamación subclínica, es decir asintomática, que podría justificar el aumento del riesgo cardiovascular en pacientes con hiperuricemia (15), independiente de otros factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo en pacientes con hiperuricemia asintomática este aumento del riesgo cardiovascular sigue siendo controvertido (16). La relevancia del depósito asintomático de cristales en estos pacientes es aún desconocida, pero datos preliminares sugieren un impacto negativo a nivel coronario (17). En definitiva, los pacientes con gota tienen un mayor riesgo cardiovascular, y así se demostró en este estudio donde se observó una mayor frecuencia de arteriosclerosis subclínica de la esperable calculada con herramientas de riesgo cardiovascular clásicas (18).

2.1.2 ARTROPATÍA POR PFC

La artropatía por PFC ocurre por el depósito de estos mismos cristales en cartílagos, fibrocartílagos y otras estructuras periarticulares. Se trata de un tipo de artritis claramente relacionada con la edad, es infrecuente por debajo de los 50 años y su prevalencia es mayor conforme se van cumpliendo años. Así lo demostraron Neame *et al* que observaron una prevalencia de condrocalcinosis del 3,7% en edades entre 55 y 59 años y del 17,5% en los que tenían entre 80 y 84 años (19). Hay que resaltar que el término condrocalcinosis se limita al hallazgo radiológico y no está presente en todos los pacientes con artropatía por PFC. Existen formas hereditarias, especialmente en España y Chile, con un patrón de herencia autosómico dominante y con distintos fenotipos. Por otro lado, la artropatía por pirofosfato cálcico también se ha descrito secundaria a enfermedades metabólicas que elevan el pirofosfato extracelular como la hemocromatosis, el hiperparatiroidismo, la hipomagnesemia o la hipofosfatasa (20); enfermedades que hay que plantearse en el diagnóstico diferencial de la enfermedad, sobre todo si es un paciente joven.

La formación del pirofosfato inorgánico es endógena ya que no puede absorberse por vía digestiva. Tres proteínas son las que parecen tener un papel más relevante en la formación de cristales: el transportador ANKH (*ankylosing homolog protein*), que extrae el pirofosfato inorgánico a la matriz extracelular del cartílago; la enzima PC-1 (*plasma cell glycoprotein-1*), que lo sintetiza a partir de grupos nucleótidos; y la fosfatasa alcalina, que lo hidroliza. Los mecanismos que desencadenan la inflamación son similares a los que ocurren en la gota: los cristales tienen capacidad para

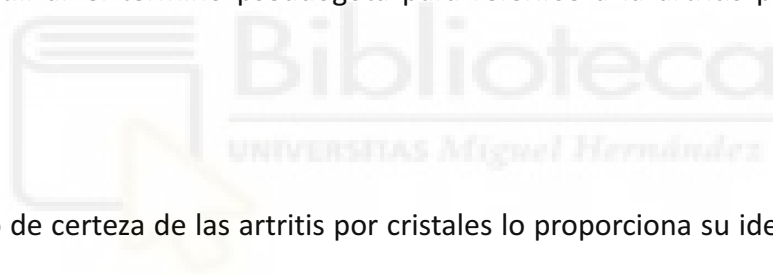
desencadenar inflamación porque son reconocidos por los *node-like receptors* (NLR) como señal de peligro, provocando la activación del inflamasoma NALP3 (2).

Respecto a la clínica la manifestación más común es la artritis aguda, generalmente monoarticular, y afecta principalmente a carpo y rodilla, aunque también puede tener afectación oligo y poliarticular. Este cuadro se puede desencadenar de forma espontánea o en situaciones de estrés, como una intervención quirúrgica o una enfermedad médica (21). De hecho no es raro que durante un ingreso hospitalario el paciente presente un episodio de artritis. Por otro lado, otro cuadro clínico que pueden presentar los pacientes con artropatía por PFC es la artropatía inflamatoria crónica que se caracteriza por ser una inflamación oligo o poliarticular de bajo grado con episodios de artritis aguda. Este cuadro clínico se puede confundir fácilmente con otros tipos de artritis crónicas y es por eso que es muy importante hacer una búsqueda activa de cristales en el líquido sinovial en el manejo de pacientes con artritis crónicas, ya que la identificación de cristales de PFC es el *gold standard* de diagnóstico de esta enfermedad. Ocasionalmente se pueden encontrar cristales en líquidos sinoviales de articulaciones con artrosis primaria, de dudosa interpretación.

2.2 HISTORIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE MICROCRISTALES

La identificación de microcristales por microscopía óptica es una técnica característica de la Reumatología, siendo estándar la utilización de un microscopio óptico polarizado provisto de compensador rojo de primer orden, técnica de identificación de cristales importada desde la Geología.

Joseph L. Hollander fue el primer autor en describir los cristales de UMS en el líquido sinovial de articulaciones inflamadas utilizando un microscopio óptico (22). Posteriormente, su discípulo Daniel McCarty, con ayuda de cristalógrafos, utilizó por primera vez el microscopio óptico polarizado con compensador rojo de primer orden (22). De forma inesperada, al analizar con microscopio polarizado con compensador rojo muestras de líquido sinovial de pacientes con un cuadro clínico similar a los que tenían cristales de UMS, McCarty descubrió unos cristales que no cumplían las características cristalográficas del UMS, incluso algunos con morfología de paralelepípedo. Tras analizar estos cristales con técnicas de difracción de rayos X, descubrió que se trataba de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado, y fue el primero en utilizar el término pseudogota para referirse a la artritis por pirofosfato cálcico.



El diagnóstico de certeza de las artritis por cristales lo proporciona su identificación en el líquido sinovial. Inicialmente esto se limitaba a muestras obtenidas durante un ataque agudo, estando los cristales invariablemente presentes en esas circunstancias (22,23), con lo que la presencia proporcionaba un diagnóstico inequívoco de gota o de artritis por cristales de PFC. Posteriormente se demostró que en articulaciones asintomáticas que previamente habían estado inflamadas por gota, y en personas que no recibían tratamiento hipouricemiante, los cristales de UMS persistían, permitiendo por tanto el diagnóstico de gota por artrocentesis en fases intercríticas (14,24). Respecto a la artritis por PFC, también se pueden identificar estos cristales en fases intercríticas como quedó demostrado en 2005 (25).

Gracias a los avances en las técnicas de imagen se pueden encontrar hallazgos sugerentes de depósitos de cristales. Probablemente la ecografía, debido a su cercanía al reumatólogo, es la técnica que más estudios tiene al respecto. Los hallazgos ecográficos sugerentes de UMS son, entre otros, el signo del doble contorno, áreas hiperecoicas sugerentes de tofos y punteados hiperecoicos ("snowstorm"); el hallazgo ecográfico más importante para la sospecha de depósito de PFC es la calcificación del cartílago hialino y/o del fibrocartílago de algunos meniscos. En un estudio multicéntrico internacional se analizaron 824 pacientes con ecografía (416 con gota y 408 controles) y se tomó como *gold standard* la identificación de UMS al microscopio. Tras el análisis estadístico, la identificación de signos ecográficos de UMS mostró una sensibilidad del 76,9% y una especificidad del 84,4% (26). En un estudio de diseño similar pero con depósitos de PFC se analizaron 33 pacientes y se encontró una sensibilidad del 86,7% y una especificidad del 96,4% (27). Otra técnica de imagen, utilizada principalmente en investigación, es la tomografía computarizada de doble energía (TCDE). Con la TCDE se detectaron depósitos de UMS en 16 de 19 pacientes con gota establecida (más de 3 años de evolución) (13). Estos estudios indican buenos resultados de las técnicas de imagen para el estudio de artritis microcristalinas, pero todavía con porcentajes relevantes de falsos positivos y negativos, lo que mantiene a la microscopía óptica como *gold standard* para el diagnóstico de las artritis microcristalinas.

2.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROCRISTALES

2.3.1 LA TÉCNICA

El microscopio óptico debe estar ubicado cerca de la consulta, o incluso dentro de la misma. Esto permitirá el análisis, tras la artrocentesis, para poder tomar una decisión terapéutica con el paciente en la consulta. El análisis se realiza en fresco y no precisa de centrifugación, fijación o tinción. Tan solo se precisa un microscopio óptico con 400 aumentos, polarizador con compensador rojo de primer orden y portaobjetos y cubreobjetos para colocar las muestras. Aunque es cierto que solo con luz ordinaria, y con experiencia, se pueden identificar la mayoría de cristales (28).

Se recomienda un análisis del líquido lo más rápido posible, sobre todo porque los leucocitos se degradan con el paso del tiempo, pero al mismo tiempo para establecer de forma rápida el diagnóstico y hacer una consulta clínica más resolutive. Son pocos los estudios que han tratado el tema del tiempo para el análisis del líquido sinovial y cómo conservarlo. Ya en 1982 Bible *et al* demostraron que se puede seguir observando UMS tras 24 horas, tanto refrigerado como almacenado a temperatura ambiente (29). Años más tarde Kerolous *et al* publicaron un artículo en el que habían estudiado 50 muestras de líquido sinovial -cinco con PFC y siete con UMS- conservadas a 4°C y 22°C con heparina, y las observaron periódicamente durante dos meses. Según sus conclusiones, el tiempo afectaba a la conservación de los cristales, sobre todo PFC, conservándose mejor refrigerado (30). En contestación a este artículo Mcknight y Agudelo reportaron seis muestras de líquido sinovial con PFC donde a las cuatro semanas, conservadas sin aditivos a temperatura ambiente, todavía se podían observar cristales de PFC (31). En respuesta al comentario, los autores del primer artículo dieron

la razón a Mcknight and Agudelo y además reportaron 9 casos en los que a los 9 meses todavía se encontraban cristales de PFC, aunque advierten de la posibilidad de formación de artefactos que se pueden confundir con PFC en las muestras que se conservan a aire ambiente. McGill *et al* publicaron los resultados de un estudio en el que observaron 11 muestras de PFC conservadas a temperatura ambiente, refrigeradas a 4°C y congeladas a -70°C. Tras 8 semanas había cristales en todas las muestras congeladas, en 10 de las refrigeradas y en 8 de las conservadas a temperatura ambiente (32). Por último, un estudio español publicado en 2002 demostró buenos datos refrigerando a 4°C detectando: UMS a las 24 horas en 90 de 93 y en 89 de 93 a 72 horas, y PFC en 90 de 90 a las 24 horas y en 87 de 90 a las 72 horas. También congelaron muestras a -80°C observándose todavía a los dos meses UMS en 25 muestras de 31 y PFC en 25 de 30 (33)

	Luz ordinaria	Luz polarizada simple	Luz polarizada con compensador de primer orden
UMS	Agujas	Birrefringencia intensa	Birrefringencia negativa (paralelo-amarillo, perpendicular-azul)
PFC	Agujas o paralelepípedos	Birrefringencia débil o nula	Birrefringencia positiva (paralelo-azul, perpendicular-amarillo)

Tabla 1- Características microscópicas de UMS y PFC

Para el análisis al microscopio óptico la muestra se coloca directamente desde la jeringa de extracción en un portaobjetos y cubreobjetos y de ahí al microscopio, sin necesidad de procesar la muestra. El análisis al microscopio óptico se realiza por fases (Tabla 1) y se comienza por la técnica más sencilla, la microscopía de luz ordinaria. Por lo general, un aumento de 400 es adecuado. Con la microscopía de luz ordinaria se

pueden identificar los cristales por morfología. Los cristales de UMS siempre tienen forma de aguja, sin embargo, los de PFC pueden presentar forma de paralelepípedos o también de aguja; y ambos cristales se pueden encontrar tanto intra como extracelulares independientemente de si es una articulación asintomática o inflamada (25,34). Una vez se ha detectado algún cristal, tanto si hay dudas sobre el tipo de cristal por morfología como por confirmar el diagnóstico, se puede pasar al segundo paso, la luz polarizada simple. Para la luz polarizada simple se precisa de dos filtros, uno localizado entre la fuente de luz y la platina donde está la muestra (polarizador), y otro en algún punto sobre la muestra y el observador (analizador). Cuando el eje óptico de ambos filtros están paralelos dejará pasar toda la luz, moviendo el polarizador se pueden cruzar los ejes hasta extinguir la luz cuando los dos ejes están perpendiculares, punto de extinción (Figura 1). En el punto de extinción toda la luz queda retenida en el analizador y se observa un campo completamente oscuro. Si hay un cristal birrefringente en la platina el haz de luz polarizada se divide en 2 componentes perpendiculares y es posible observar el cristal brillar sobre un campo oscuro (35). Con la luz polarizada los cristales de UMS se observan intensamente birrefringentes (brillan mucho sobre el campo oscuro) excepto cuando están en posición de extinción, es decir cuando el cristal está paralelo a uno u otro de a los ejes de los filtros cruzados. Sin embargo los cristales de PFC presentan una birrefringencia débil (brilla poco sobre el campo oscuro) observándose mejor con el microscopio óptico de luz simple (36).

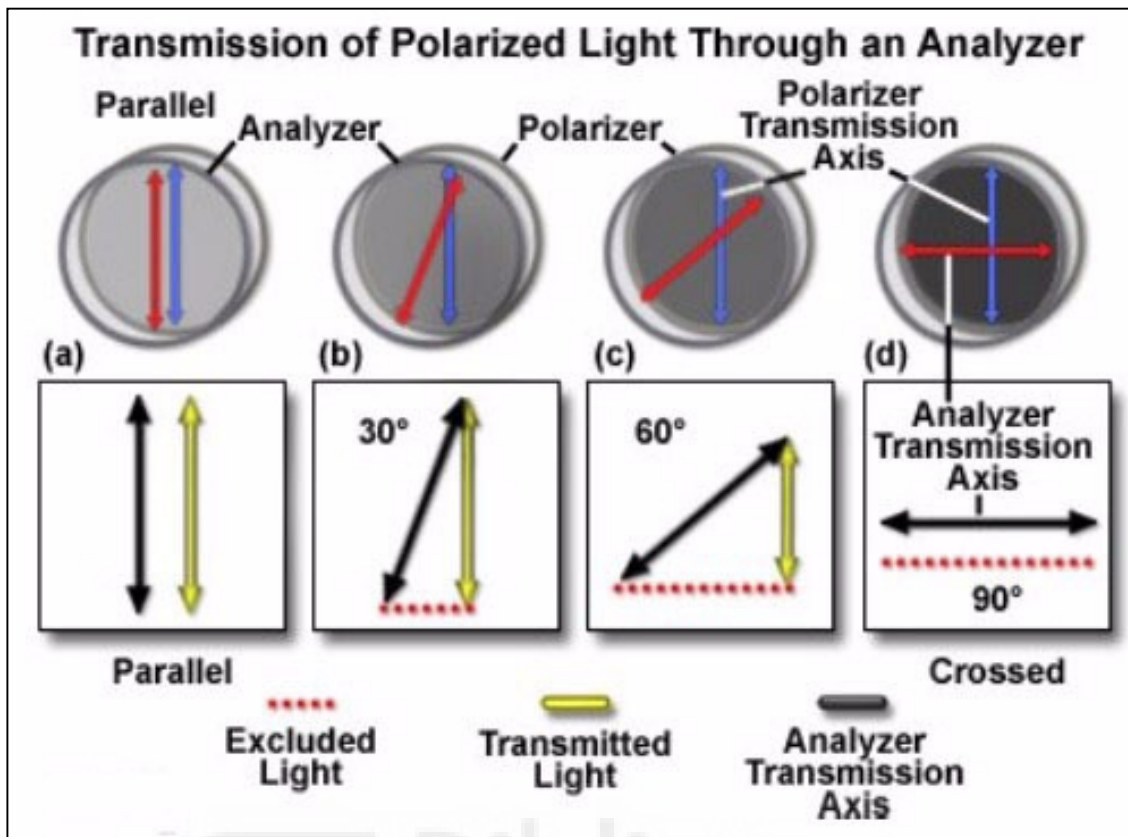


Figura 1- Mecanismo de acción de la polarización. Uso de imagen autorizado

El último paso es el uso del polarizador con compensador rojo de primer orden. Cuando la luz atraviesa el cristal genera un retardo de la longitud de onda, el compensador de primer orden es sensible a este retardo. La combinación de longitudes de onda (rápida y lenta producida por el retardo) produce los colores de interferencia, toda la gama de colores posibles está reflejada en la tabla de colores de interferencia (de Michel Levy) utilizada en mineralogía (Figura 2). Los dos grados de retardo que podemos observar en nuestro caso se llaman birrefringencia positiva y negativa. Los cristales de UMS presentan una birrefringencia negativa (menos retardo) que se observa como amarillo cuando el eje mayor del cristal es paralelo al eje del compensador o azul cuando es perpendicular. Sin embargo los cristales de PFC

presentan una birrefringencia positiva, que se observa como azul cuando el eje mayor del cristal es paralelo al eje del compensador y amarillo cuando es perpendicular.

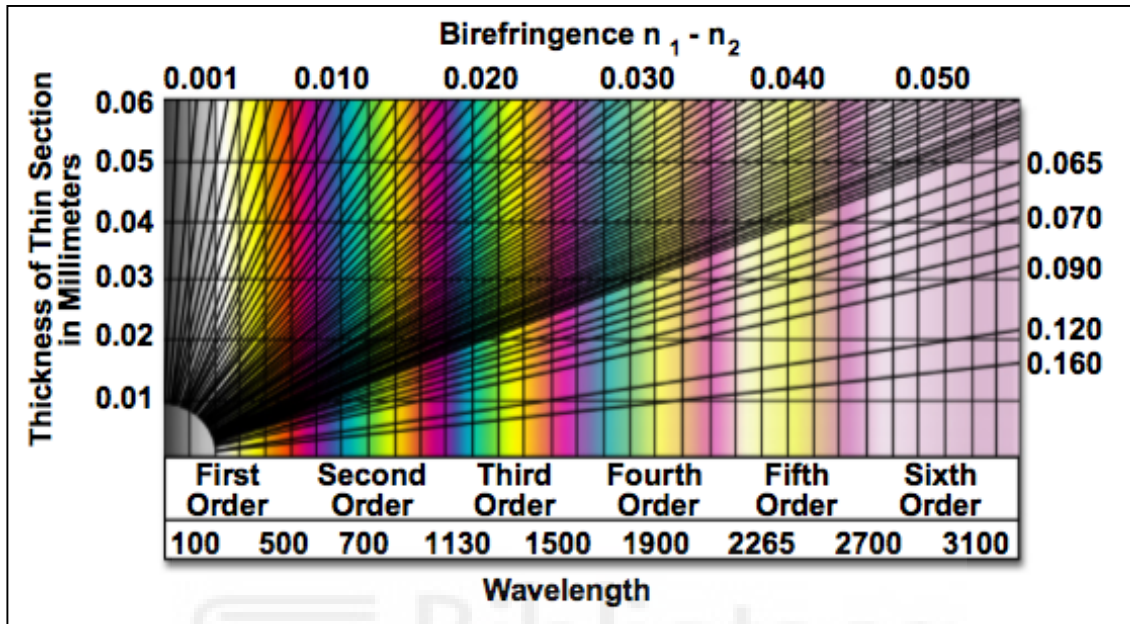


Figura 2- Tabla de Michel Levy. Procedente de www.olympusmicro.com

2.3.2 VALIDEZ Y REPRODUCIBILIDAD DE IDENTIFICACIÓN DE MICROCRISTALES AL MICROSCOPIO ÓPTICO

Pese a su sencillez e inmediatez, el uso del microscopio óptico entre los reumatólogos es muy irregular y sólo un porcentaje reducido de unidades de Reumatología lo emplea de manera rutinaria (37), en parte por considerar erróneamente que la gota es fácilmente diagnosticable por sus características clínicas, lo que se ha demostrado que falla en uno de cada cuatro casos (38,39).

Se han realizado muy pocos estudios (Tabla 2) que evalúen la microscopía óptica de líquido sinovial para la identificación de cristales, y sus resultados no han sido buenos,

lo que probablemente pueda ser atribuido a sus numerosas limitaciones metodológicas.

El primer estudio sobre validez en la detección de cristales lo realizó H. R. Schumacher *et al* en 1986 (40). Se enviaron muestras de líquido sinovial a tres laboratorios distintos y se encontraron diferencias en 7 de las 11 muestras analizadas (63,6%) comparando con el laboratorio de referencia. En realidad, la identificación de cristales era un objetivo secundario y el objetivo primario era el recuento de leucocitos. Un año más tarde P. Hasselbacher (41) remitió 4 muestras de líquido sinovial a 25 laboratorios -una muestra con PFC, otra con UMS, otra con UMS y PFC y otra sin cristales-. Solo un 49% de los análisis concordaron con el de referencia. En 1989 C. Gordon *et al* (42) realizó un estudio con cristales sintéticos de UMS y PFC añadidos a líquido sinovial a distintas concentraciones. En este artículo 6 observadores analizaron al microscopio óptico 166 muestras obteniendo para el UMS una sensibilidad del 69% y una especificidad del 97%, y para PFC una sensibilidad del 82% con una especificidad del 78%. Posteriormente en un estudio de calidad finlandés publicado 1990 (43) se analizaron cuatro muestras – las cuales contenían colesterol, triamcinolona, polvo de guantes y UMS- en 25 laboratorios. Se obtuvo que 19 de 25 laboratorios acertaron todo, identificando todos la muestra con UMS, sin embargo hubo un 24% de falsos positivos. Esto mismo lo repitieron anualmente desde 1989 hasta 1996 y participando entre 25 - el primer año- y 47 laboratorios, publicándose en 1998 (44). Los resultados en identificación de cristales no fueron demasiado satisfactorios, con una media de un 71,2% de resultados correctos. Un estudio similar se hizo en Australia (45), donde se enviaron 12 muestras de líquido sinovial a seis laboratorios encontrando un alto número de falsos negativos - 5 para UMS y 7 para PFC-. Por último en 1998 Petrocelli *et*

al (46), analizaron 11 muestras de líquido sinovial por 3 observadores obteniendo para UMS una sensibilidad del 78% y una especificidad del 100% y para PFC una sensibilidad del 56% y una especificidad del 96%. Todos estos estudios sobre identificación de cristales se resumen y analizan en dos revisiones (47,48), que concluyen diciendo que no es una prueba perfecta a pesar de ser el *gold standard* y que hacen falta más estudios sobre la validez en la identificación de cristales en líquido sinovial. De hecho, en uno de ellos (47), se sugiere la combinación del análisis del líquido sinovial junto con unas características clínicas para aumentar la probabilidad preprueba.

En cualquier caso, todos los trabajos revisados presentan limitaciones relevantes destacando la ausencia de comprobación de entrenamiento, fiabilidad y experiencia de los analistas. Pese a esto, estas referencias son las habitualmente utilizadas como argumento para obviar el análisis por cristales y recurrir para el diagnóstico a criterios clínicos tradicionales. En algún trabajo incluso se llega a justificar al considerar a la artrocentesis como un procedimiento “inconveniente”. Sin embargo, en nuestra experiencia la técnica de análisis de identificación de cristales es sencilla, y solo precisa de una formación y experiencia mínimas (49), habiendo demostrado que un corto entrenamiento previo permite a residentes de laboratorio clínico la identificación fiable de cristales de UMS y PFC en líquido sinovial (50).

Hasta ahora todos los estudios comentados tenían como objetivo principal evaluar la validez de la prueba, sin embargo ninguno de ellos evalúa la fiabilidad o reproducibilidad interobservador. Solo hay dos trabajos que hayan evaluado este aspecto. El primero es un estudio publicado por Pascual *et al* en 1989 (28), en este estudio se evaluaba la habilidad para detectar cristales con el microscopio con luz simple y además se calculaba el kappa (κ) global entre 2 observadores para

microscopía óptica con luz simple (κ 0,90 [0,897-0,902]) y con luz polarizada (κ 0,96 [0,958-0,961]). El segundo estudio, del mismo grupo (Lumbreras *et al* (50)), tenía por objetivo determinar el grado de concordancia entre un experto y 4 residentes tras un breve entrenamiento. Se analizaron 64 muestras y se obtuvieron las siguientes concordancias con el experto: observador 1 κ 0,80 (IC95% 0,58-1,02); observador 2 κ 0,94 (IC 0,76-1,13), observador 3 κ 0,85 (IC95% 0,63-1,06) y observador 4 κ 0,83 (IC95% 0,64-1,01). El κ global de los residentes con el experto fue de 0,85, siendo κ 0,84 para detección de cristales, κ 0,93 para MSU y κ 0,79 para PFC (IC no disponibles en el artículo original).

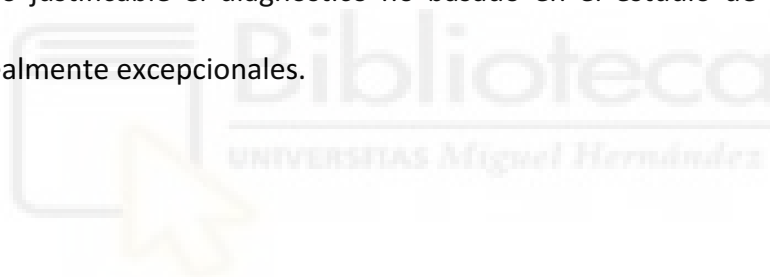
Se han realizado estudios de validez para el diagnóstico de microcristales empleando otras técnicas como la ecografía, la tomografía de doble energía dual (TECD) o la espectroscopía Raman. La espectroscopía Raman es una técnica analítica que se utiliza en química y que aporta información de la composición molecular; probablemente sea la técnica más novedosa. Li *et al* en 2016 (51) publicaron un trabajo en el que midieron el grado de consistencia entre el análisis de líquido sinovial al microscopio óptico con luz polarizada compensada y un aparato para realizar espectroscopía Raman especialmente diseñado para este fin. El κ para identificación de UMS fue de 0,84 (0,75-0,94) y para la identificación de PFC 0,61 (0,42-0,81). En el mismo año Abhishek *et al* (52) publicaron los resultados de un trabajo con una máquina diseñada para realizar una espectroscopía Raman en la primera metatarsofalángica *in vivo*, sin necesidad de artrocentesis. Detectaron UMS por espectroscopía en 7 de 10 pacientes con gota. Son necesarios más estudios pero esta técnica podría ser útil en el futuro para el diagnóstico de enfermedades microcristalinas.

	Quién analiza las muestras	Número de muestras y qué analizan	Resultados	Comentario
Schumacher <i>et al</i> , 1986	Técnicos de 3 laboratorios, uno de ellos de referencia	11 LS. 7 con UMS y 2 con PFC	UMS: correctos 8/14, 1 FP PFC: 1/4 correctos, 3 FP, 1 FN	Muestras heparinizadas. Objetivo primario: recuento de leucocitos.
Hasselbacher, 1987	25 laboratorios	4 LS. 1 PFC, 1 UMS, 1 UMS+PFC y 1 sin cristales	Muestra 1: 4/25 identifican el PFC. Muestra 2: 20/25 identifican UMS Muestra 3: 1/25 identifica PPCD y UMS. 18/25 solo ven UMS, 1/25 solo ve PFC Muestra 4: 24/25 no ven cristales	78% de precisión para UMS pero muy pobre la de PFC
Gordon <i>et al</i> , 1989	6 observadores: 1 técnico de laboratorio, 1 técnico de laboratorio con experiencia en identificación de cristales, 1 médico con poca experiencia en identificación de cristales, 2 residentes de reumatología y 1 reumatólogo con experiencia en identificación de cristales	96 LS. 41 con UMS sintético y 42 con PFC sintético	UMS: sensibilidad 69%, especificidad 93%. PFC: sensibilidad 83%, especificidad 78%	Son cristales sintéticos añadidos a LS a distintas concentraciones
von Essen <i>et al</i> , 1990	25 laboratorios	4 muestras de LS: 1 cristal colesterol, 1 triamcinolona, 1 polvo de guantes, 1 UMS	19/25 identifican todo. UMS 25/25 pero 24% FP	Este estudio se replica anualmente y se publica en conjunto (von Essen 1998)
McGill <i>et al</i> , 1991	6 laboratorios	Mandan 12 LS: 1 betametasona, 4 UMS, 4 PFC, 3 sin cristales	UMS: 19/24 identifican correctamente. PFC: 17/24 identifican correctamente.	2 laboratorios con ≤50% de resultados correctos.
Von Essen <i>et al</i> , 1998	Entre 25 y 47 laboratorios	3-4 muestras de LS con UMS, PFC, oxalato... dependiendo del año	71,2% de identificaciones correctas. 24,6% FN	De 1989 a 1996, anualmente se replicaba von Essen 1990
Petrocelli <i>et al</i> , 1998	3 observadores	11 LS: 3 UMS, 3 PFC y 5 sin cristales	UMS: sensibilidad 78% y 100% especificidad. PFC: sensibilidad 56% y especificidad 96%	Preparaciones por duplicado: tinción Gram y preparación húmeda

Tabla 2. Estudios de la validez de la identificación de cristales al microscopio óptico. Nota: LS: líquido sinovial, FP: falso positivo, FN: falso negativo

3. JUSTIFICACIÓN

El *gold standard* de diagnóstico de las enfermedades por depósito de cristales como la gota o la artropatía por PFC es la identificación de dichos cristales al microscopio óptico polarizado. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha incluido a observadores entrenados evaluando un número suficiente de muestras para permitir demostrar consistencia en la identificación de los distintos cristales. De hecho, como se ha mencionado anteriormente, los escasos estudios disponibles son poco alentadores. La demostración de la consistencia de la técnica siguiendo una metodología estructurada y homogénea establecerá sin lugar a dudas su valor, haciendo poco justificable el diagnóstico no basado en el estudio de cristales salvo situaciones realmente excepcionales.



4. HIPÓTESIS

Las hipótesis del presente estudio fueron:

- 1- La identificación de cristales al microscopio óptico será una prueba consistente entre varios observadores.
- 2- En la mayoría de los casos el microscopio con luz ordinaria será suficiente para confirmar el diagnóstico.
- 3- El filtro con luz polarizada será la técnica que mejor visualice los cristales de UMS.



5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal fue evaluar la consistencia en la identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico polarizado compensado.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el grado de concordancia entre varios observadores en la detección e identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico.
2. Estimar la frecuencia de identificación correcta de cristales (sensibilidad) mediante la microscopía óptica con luz ordinaria.
3. Demostrar que el examen con filtro polarizado cruzado es el tipo de filtro que mejor identifica los cristales de UMS.
4. Evaluar si la concordancia disminuye en los líquidos analizados después de 24 horas de su extracción.
5. Describir el número de campos que se analizan hasta detectar el primer cristal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO

Estudio observacional descriptivo de corte transversal realizado en un único centro, la sección de Reumatología del Hospital General Universitario de Alicante.

6.2 PACIENTES

6.2.1 MUESTREO Y RECLUTAMIENTO

El muestreo fue consecutivo. Se incluyeron en el estudio todos los líquidos sinoviales extraídos por práctica clínica habitual durante el periodo del estudio y que cumplieran con los criterios de inclusión/exclusión.

6.2.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión:

- Líquido sinovial procedente de espacios articulares, bursas sinoviales o vainas tendinosas.
- En muestras de líquido sinovial se debe de encontrar al menos un leucocito.

Criterios de exclusión:

- Líquido sinovial hemático
- Que hayan pasado más de 24 horas de la extracción **modificado durante el estudio, explicación en apartado 7.1*
- Aspirado de tofo

6.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

6.3.1 VARIABLES PRINCIPALES

Visualización al microscopio óptico en sus distintas fases (explicado con detalle en 6.4 procedimientos) y recogida de variables en cada una de ellas:

- Presencia de cristales (sí o no)
- Qué tipo de cristal se sospecha en cada fase (UMS, PFC, ambos, no está claro)
- Número de campo en el que se observa por primera vez un cristal (de 1 a 30)
- Conclusión final tras observación completa al microscopio (no hay cristales, UMS, PFC, UMS y PFC)*

* se registró si el observador veía UMS y PFC en la misma muestra pero para el análisis de datos esa variable se reconvirtió en UMS dada la dificultad de la clasificación como PFC cuando los cristales son poco frecuentes.

6.3.2 VARIABLES SECUNDARIAS

- Origen de la muestra (articular, bursa o vaina) y en localización (rodilla, primera metatarsofalángica...)
- Patología reumática de base (gota, artrosis, artritis reumatoide...)
- Edad (en años)
- Sexo de los participantes (hombre/mujer)
- Tiempo hasta la observación (en horas)
- Experiencia (observador experto/observador no experto) Experto: más de 10 años de experiencia analizando regularmente en busca de cristales al microscopio.

6.4 PROCEDIMIENTOS

Todo el equipo de reumatólogos del Hospital General Universitario de Alicante fue informado del estudio para reclutar muestras, pero solo cinco observadores participaron en el estudio (visualización de la muestra y recogida de variables). Los cinco observadores estaban entrenados en la identificación de cristales al microscopio óptico polarizado, siendo cuatro de ellos facultativos y uno médico interno residente de tercer año en reumatología. A cada observador se le asignó un número que solo conocía él y el investigador principal, para mantener el enmascaramiento. El aviso entre los observadores se realizó por medio de un chat móvil mediante la aplicación *Whatsapp*[®]. Todos los observadores eran ciegos a los datos clínicos del paciente excepto el que realizaba la extracción, que se encargaba también de obtener el consentimiento informado. Si otro compañero no investigador obtenía una muestra, avisaba al investigador principal para explicar/firmar el consentimiento informado y avisar al resto de observadores. Se invitó a los investigadores a realizar la observación al microscopio óptico de la muestra de líquido sinovial antes de 24 horas de la extracción, salvo si ésta se encontraba en un portaobjetos, que se limitó a 2 horas. Uno de los criterios de exclusión para incluir una observación era que hubieran pasado más de 24 horas desde la obtención del líquido sinovial. Sin embargo, aunque inicialmente solo se analizaran los líquidos antes de las 24 horas hubo que cambiar este criterio al haber cambiado el investigador principal de Hospital dificultando el análisis en las primeras 24 horas. Tras finalizar el reclutamiento, el investigador principal revisó las historias clínicas para completar las variables no recogidas.

Una vez obtenida la muestra y tras la firma del consentimiento informado por el paciente (anexo 4), se rellenaba la hoja de recogida de datos de extracción (anexo 2). Posteriormente, se etiquetaba la muestra y se almacenaba en frigorífico a 4°C (32,33) en fresco –sin adición de anticoagulantes (33)- dando aviso al resto de observadores. Finalmente, cada observador de forma individual y ciega analizaba la muestra y completaba la hoja de recogida de datos de análisis (una por cada observador, anexo 3) intentando, en la medida de lo posible, analizarlo en un tiempo menor a 24 horas. Se estableció ese período al haberse observado que hasta 72 horas no parece haber diferencias (33). (Figura 3)



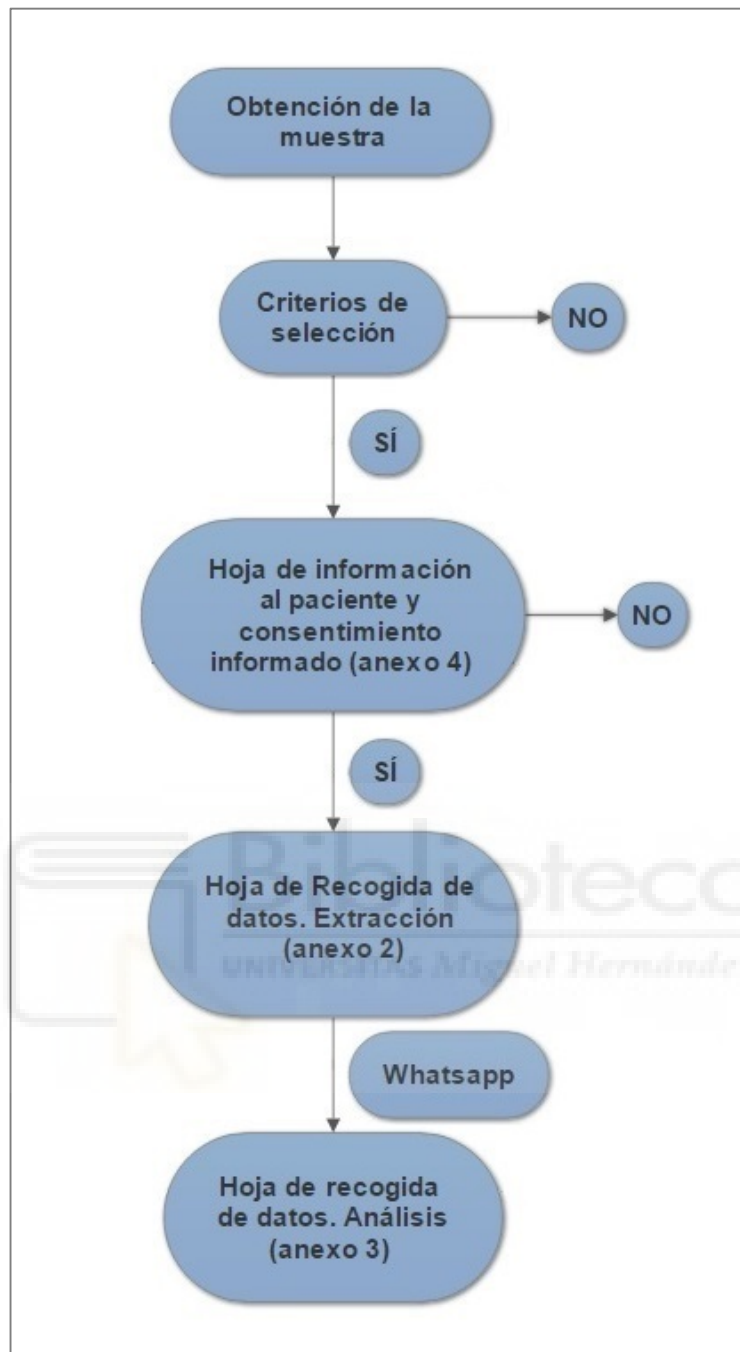


Figura 3- Flujo de trabajo

La metodología de análisis del líquido sinovial seguida por todos los observadores fue:

1º: Limpiar porta y cubreobjetos.

2º: Examen con luz ordinaria a 400x. En esta fase se confirma si hay o no cristales y, en el caso de que haya, de qué tipo por un análisis morfológico. Para considerar la ausencia de cristales se exigió el análisis de 30 campos.

Addendum: a partir de la muestra número 16 se decidió incluir el número de campo en el que se observaba el primer cristal.

3º: Examen con filtro polarizado cruzado a 400x. Estudio de intensidad de la birrefringencia que permitiese discernir ante qué tipo de cristal se encontraba el observador. De igual forma, si no se hallaron cristales tras 30 campos la muestra se dio como “sin cristales”.

4º: Examen con filtro polarizado y compensador rojo de primer orden a 400x. Este estudio permitió la identificación definitiva de UMS o PPCD según el tipo de birrefringencia (negativa o positiva, respectivamente).

Para el análisis de cristales se ha utilizado un microscopio marca Olympus BH equipado con polarizador simple y compensador rojo de primer orden.

6.5 ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio se ajusta a las normas deontológicas y todos los pacientes fueron informados de los objetivos, siendo la firma del consentimiento informado imprescindible para entrar en él. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante (PI2016/228) [ver anexo 1]. El manejo de los datos clínicos de los pacientes se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki y modificaciones posteriores, el código de buenas prácticas clínicas y la ley orgánica de protección de datos de carácter personal (15/1999).

Los datos fueron recogidos en una base de datos informatizada (Microsoft Excel®) a la cual solo tuvo acceso SG, coordinadora de estudios de HGUA y el investigador principal al final del reclutamiento.

6.6 ASPECTOS ESTADÍSTICOS

6.6.1 TAMAÑO MUESTRAL

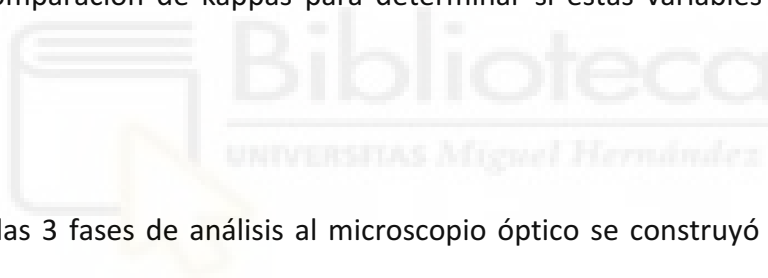
La estimación del tamaño muestral en base a estudios similares previos era difícil porque todos tenían un tamaño muestral pequeño, siendo ese uno de los principales inconvenientes. En un estudio de Pascual *et al* (28) en el que se demostró que el microscopio con luz simple era suficiente la mayoría de las veces para la identificación de cristales se calculó el grado de concordancia entre 2 observadores, siendo suficiente con un tamaño muestral de 63 muestras y 126 observaciones para obtener resultados significativos. Se estimó que un análisis de 60 muestras analizadas por 5 observadores, que equivalen a 300 potenciales observaciones, iba a ser suficiente para obtener resultados significativos, teniendo en cuenta las pérdidas ya que posiblemente no todos los observadores iban a poder observar todas las muestras.

6.6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas se presentan como frecuencias y porcentajes, y las cuantitativas como medidas de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o rango intercuartílico). Para las variables de estudio principales se estimó el intervalo de confianza al 95%.

El análisis estadístico de la concordancia entre observadores para responder al objetivo nº 1 empleó el coeficiente *kappa de Cohen*, que expresa el grado de concordancia de 0 a 1 siendo 0 la discordancia absoluta y 1 el acuerdo perfecto. Respecto a la interpretación de los resultados se consideró que entre 0,2 y 0,4 existía un grado de acuerdo bajo; entre 0,41 y 0,6 moderado; entre 0,61 y 0,8 se estimó un acuerdo bueno y mayor de 0,81 un grado de concordancia muy bueno o excelente. Dada la existencia de varios observadores y más de dos opciones se utilizó la técnica *jackknife*, con estimación del error estándar.

En el análisis de subgrupos (tiempo y experiencia) se utilizó el coeficiente *kappa de Cohen* y la comparación de kappas para determinar si estas variables influían en el acuerdo final.



Para evaluar las 3 fases de análisis al microscopio óptico se construyó una tabla 2x2 para cada uno de los hallazgos (No cristales, UMS y PFC) en cada una de las fases (luz simple, polarizada y con compensador rojo). En las columnas, como valor de referencia, se tomó la conclusión final. Se consideró como resultado positivo el número de observaciones con No cristales, UMS o PFC; y negativo el número de observaciones con Sí cristales, no UMS o no PFC. Finalmente se calculó la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo con un IC95%.

El análisis estadístico se realizó empleando los programas Epidat® 4.2 para *jackknife* y comparación de *kappas* y SPSS® 21 para el resto de cálculos. Se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0,050$.

6.7 DURACIÓN DEL ESTUDIO

El período de reclutamiento ha abarcado desde el 28 de noviembre de 2016 hasta el 26 de mayo de 2017 cuando se cerró el reclutamiento.

6.8 MEMORIA ECONÓMICA

Este estudio no ha precisado de un gasto económico adicional y se han utilizado los recursos ya disponibles en la Sección de Reumatología del Hospital General Universitario de Alicante.

Este estudio ha recibido una beca de la Fundación Valenciana de Reumatología.



7. RESULTADOS

7.1 PARTICIPACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MUESTRAS

ANALIZADAS

En el estudio se han incluido 60 muestras consecutivas de líquido sinovial. Al tratarse de 5 observadores, el número de potenciales observaciones era 300 potenciales observaciones. Finalmente se realizaron 266 observaciones (88,7%) de 60 líquidos sinoviales.

En la Tabla 3 se muestran las características de los pacientes de las 266 observaciones realizadas. La mayoría de las observaciones provienen de líquidos sinoviales de grandes articulaciones: 179 (67,3%) de rodilla, 35 (13,2%) de tobillo y 18 (6,8%) de carpo. También hay muestras procedentes de pequeñas articulaciones como metatarsofalángicas e interfalángicas proximales, e incluso hay 5 observaciones procedentes de una muestra procedente de líquido sinovial de bursa olecraniana.

Características generales de los pacientes de las observaciones realizadas	
Variable	Observaciones (n=266)
Edad en años, media (DE)	65 (16,62)
Sexo	
Hombres (%)	132 (49,6)
Mujeres (%)	134 (50,4)
Origen de la muestra	
Rodilla (%)	179 (67,3)
Tobillo (%)	35 (13,2)
Carpo (%)	18 (6,8)
1ª MTF (%)	13 (4,9)
IFP (%)	8 (3)
Codo (%)	5 (1,9)
Bursa olecraniana (%)	5 (1,9)
otras MTF (%)	3 (1,1)
Enfermedad de base	
Gota (%)	90 (33,8)
Artritis reumatoide (%)	49 (18,4)
Artritis por PFC (%)	40 (15)
Artritis sin filiar (%)	22 (8,3)
Derrame mecánico (%)	22 (8,3)
Artritis psoriática (%)	20 (7,5)
Artritis séptica (%)	9 (3,4)
Sjögren (%)	9 (3,4)
Still (%)	5 (1,9)

Tabla 3. Datos mostrados como n (%) salvo especificado de forma diferente. DE: desviación estándar; MTF: metatarsofalángica; IFP: interfalángica proximal; PFC: pirofosfato cálcico.

Respecto a la enfermedad de base diagnosticada por el médico responsable del paciente se encuentra mucha variabilidad. Se puede apreciar que los diagnósticos más frecuentes son gota, 90 observaciones (33,8%); artritis reumatoide, 49 (18,4%) y artritis por PFC, 40 (15%).

La mediana de tiempo en horas fue de 1,5 horas con un p25-75 de 0,5 y 4 horas siendo la observación más tardía a las 624 horas de la extracción. Un 85,2% de los análisis se realizaron antes de 24 horas.

7.2 ANÁLISIS DE CONCORDANCIA ENTRE OBSERVADORES

Solo 31 de las 60 muestras fueron evaluadas por los 5 observadores, por lo que el análisis principal de concordancia se llevó a cabo sobre estas 31 muestras. En primer lugar se realizó un análisis de concordancia en la detección de cristales, clasificando la muestra como "con" o "sin" cristales, y se obtuvo un κ de 0,7511 (IC95% 0,6058-0,8959). Respecto a la identificación de cristales (Tabla 4) la concordancia global se puede considerar como buena (κ 0,7590). Individualmente, cuando se concluye que hay PFC (κ 0,6559) la fuerza de concordancia se clasifica también como buena. Y finalmente para el UMS (κ 0,9058) el grado de acuerdo se considera como muy bueno o excelente.

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,7511	0,6058-0,8959	<0,001
UMS	0,9058	0,7616-1,0496	<0,001
PFC	0,6559	0,4700-0,8411	<0,001
Kappa global	0,7590	0,6274-0,8901	<0,001

Tabla 4. Análisis de concordancia entre 5 observadores independientemente del tiempo que se tardó en analizar el líquido sinovial. 31 muestras, 155 observaciones

7.2.1 INFLUENCIA DEL TIEMPO QUE SE TARDA EN ANALIZAR LA MUESTRA

El tiempo que pasa hasta el análisis es una variable que podría influir en la identificación. Por lo tanto se analizó por un lado la concordancia de 5 observadores en muestras en las que todos los análisis se realizaron antes de 24 horas (Tabla 5); y por otro lado la concordancia de muestras en las que alguna de las 5 observaciones fuera posterior a 24 horas (Tabla 6). Tanto en uno como en otro todos los resultados tienen un grado de concordancia bueno o muy bueno.

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,7778	0,5915-0,9627	<0,001
UMS	0,9240	0,7372-1,1082	<0,001
PFC	0,6947	0,4333-0,9533	<0,001
Kappa global	0,7830	0,6038-0,9605	<0,001

Tabla 5. Análisis de concordancia entre 5 observadores siendo todas las observaciones realizadas antes de 24 horas. 18 muestras, 90 observaciones

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,6972	0,3749-1,0149	<0,001
UMS	0,8805	0,5947-1,1627	<0,001
PFC	0,6100	0,2987-0,9176	<0,001
Kappa global	0,7196	0,4711-0,9646	<0,001

Tabla 6. Análisis de concordancia entre 5 observadores siendo alguna observación de cada una de las muestras posterior a 24 horas. 13 muestras, 65 observaciones

Finalmente se hizo una comparación de κ concluyendo que no había diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas antes de 24 horas frente a las muestras en las que alguna observación se realizó posterior a 24 horas (Tabla 7). En el análisis individualizado de presencia/ausencia de cristales o del tipo de cristal tampoco hubo diferencias significativas.

Categoría	Ji-cuadrado	Valor p
No cristales	0,1908	0,6622
UMS	0,0658	0,7976
PFC	0,1756	0,6752
Kappa global	0,1735	0,6771

Tabla 7. Comparación de κ de muestras analizadas antes de 24 horas frente a muestras con algún análisis posterior a 24 horas

7.2.2 COMPARACIÓN DE EXPERTOS FRENTE A NO EXPERTOS

Se consideró experto en identificación de cristales a los que tenían más de 10 años de experiencia, habiendo tres observadores expertos y dos con menos de 10 años de experiencia observando al microscopio.

Los tres observadores expertos observaron la misma muestra en 39 ocasiones y su grado de concordancia fue bueno para cualquier hallazgo y en el κ global (Tabla 8).

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,6750	0,4823-0,8673	<0,001
UMS	0,7249	0,5046-0,9447	<0,001
PFC	0,7058	0,5102-0,9011	<0,001
Kappa global	0,7001	0,5388-0,8611	<0,001

Tabla 8. Análisis de concordancia entre los 3 observadores expertos. 39 muestras, 117 observaciones

Los observadores que tenían menos de 10 años de experiencia observaron la misma muestra en 50 ocasiones (Tabla 9), obteniendo κ buenos para no cristales, PFC y κ global, y muy bueno para UMS (κ 0,9493). Se compararon los κ de expertos frente a no expertos sin obtener ninguna diferencia estadísticamente significativa por categorías ni en global (κ global Ji cuadrado 0,2268 y pvalor=0,6339).

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,7144	0,5104-0,9182	<0,001
UMS	0,9493	0,8460-1,0525	<0,001
PFC	0,6190	0,3675-0,8703	<0,001
Kappa global	0,7547	0,5914-0,9177	<0,001

Tabla 9. Análisis de concordancia entre los 2 observadores no expertos. 50 muestras, 100 observaciones

7.3 ANÁLISIS EN LAS DISTINTAS FASES DEL MICROSCOPIO

7.3.1 MICROSCOPIA CON LUZ SIMPLE

La primera fase en la observación de cristales al microscopio es la microscopía con luz sencilla. Del total de 266 observaciones en 258 el diagnóstico fue el mismo que en la conclusión final y en 8 fue diferente, es decir, un 96,99% de los diagnósticos al microscopio óptico coincidieron con la conclusión final (Tabla 10).

		Conclusión final		
		No cristales	UMS	PFC
Microscopio luz simple	No cristales	96	3	2
	UMS	0	70	0
	PFC	3	0	92

Tabla 10. Relación entre el diagnóstico al microscopio óptico y la conclusión final

Cuando no se observan cristales al microscopio óptico, en 96/101 ocasiones se concluirá que no hay cristales. Este hallazgo tiene una sensibilidad del 97,0% (IC95%:91,5-99) y una especificidad de 97,0% (IC95% 93,2-98,7), con un valor predictivo positivo del 95% (IC95% 88,9-97,9) y un valor predictivo negativo del 98,2% (IC95% 94,8-99,4). La sensibilidad para diagnóstico de UMS fue del 95,9% (IC95% 88,6-98,6), y la especificidad del 100% (IC95% 98,0-100). El valor predictivo positivo para el UMS fue del 100% (IC95% 94,8-100) y negativo del 98,5 (IC95% 95,6-99,5). Respecto a la detección de PFC con el microscopio óptico se obtuvo una sensibilidad del 97,9% (IC95% 92,6-99,4) y una especificidad del 98,3% (IC95% 95,0-99,4); además se calculó un valor predictivo positivo del 96,8% (IC95% 91,1-98,9) y un valor predictivo negativo del 98,8% (IC95% 95,8-99,7).

El valor del κ de concordancia entre 5 observadores en identificación de cristales con luz simple fue bueno para todos los análisis, con un κ global de 0,6888. Como ocurre en la conclusión final los resultados de acuerdo fueron mucho mejor para UMS que para PFC o la detección de cristales (Tabla 11).

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,6763	0,5073-0,8448	<0,001
UMS	0,7982	0,6004-0,9952	<0,001
PFC	0,6336	0,4386-0,8279	<0,001
Kappa global	0,6888	0,5428-0,8342	<0,001

Tabla 11. Análisis de concordancia entre los 5 observadores en el microscopio óptico con luz simple. 31 muestras, 155 observaciones

A partir de la muestra número 16 se incluyó en la recogida de datos el número de campo en el que se observaba por primera vez un cristal. En total se recogió este dato en 136 observaciones con una mediana de campo 1 (p25-75 1-3) para la identificación de cristales. En 61 ocasiones se registró el número de campo en el que se identificaba UMS con una mediana de campo 1 (p25-75 1-3). Para el pirofosfato hubo 75 registros del número de campo en el que se veía el primer cristal con una mediana de campo 1 (p25-75 1-3).

7.3.2 MICROSCOPIA CON LUZ POLARIZADA

El segundo paso en el análisis de identificación de cristales es la luz polarizada. Los hallazgos de las 266 observaciones se muestran en la Tabla 12. Como se refleja en dicha tabla, todas las veces que se concluye que hay UMS, previamente se habían observado con el microscopio polarizado. Sin embargo de 128 ocasiones en las que no se ven cristales al polarizar, en 31 se concluye que hay PFC.

		Conclusión final		
		No cristales	UMS	PFC
Microscopio luz polarizada	No cristales	97	0	31
	UMS	0	73	2
	PFC	2	0	61

Tabla 12. Relación del diagnóstico con luz polarizada y la conclusión final

La sensibilidad de concluir que no hay cristales con luz polarizada fue del 98% (IC95% 92,9-99,4), la especificidad de 81,4% (IC95% 74,9-86,6), el valor predictivo positivo de 75,8% (IC95% 67,7-82,4) y el valor predictivo negativo de 98,6% (IC95% 94,9-99,6). Sin embargo cuando se detectó UMS en el microscopio polarizado la sensibilidad fue del 100% (IC95% 95-100) y la especificidad del 99% (IC95%:96,3-99,7), así mismo el valor predictivo positivo fue de 97,3% (IC95% 90,8-99,3) y el valor predictivo negativo fue del 100% (IC95%:98-100). En cuanto a los cálculos con el PFC se obtuvo una sensibilidad del 64,9% (IC95% 54,8-73,8) y la especificidad del 98,8% (IC95% 95,9-99,7) con un valor predictivo positivo del 96,8% (IC95% 89,1-99,1) y negativo del 83,7% (IC95% 78,-88,2).

La concordancia entre 5 observadores al microscopio polarizado fue buena (Tabla 13) o muy buena en caso del UMS (κ 0,8940).

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,7240	0,5566-0,8908	<0,001
UMS	0,8940	0,7282-1,0591	<0,001
PFC	0,6514	0,4266-0,8751	<0,001
Kappa global	0,7453	0,5828-0,9071	<0,001

Tabla 13. Análisis de concordancia entre los 5 observadores en el microscopio con luz polarizada. 31 muestras, 155 observaciones

7.3.3 MICROSCOPIA CON COMPENSADOR ROJO

En el último paso, el compensador rojo, se hicieron 266 observaciones (Tabla 14). Concluir en esta fase que no había cristales tuvo una sensibilidad del 97% (IC95% 91,5-99) y una especificidad del 97% (IC95% 93,2-98,7), también se calculó un valor predictivo positivo de 95% (IC95% 88,9-97,9) y un valor predictivo negativo de 98,2% (IC95% 94,8-99,4). Respecto a la detección de UMS se obtuvo una sensibilidad del 98,6% (IC95%: 92,6-99,8) y una especificidad del 100% (IC95% 98-100) con un valor predictivo positivo también del 100% (IC95% 94,9-100) y un valor predictivo negativo del 99,5% (IC95% 97,1-99,9). Finalmente para la detección de PFC la sensibilidad fue del 95,7 % (IC95% 89,6-98,3) y la especificidad del 98,3% (IC95% 95,0-99,4), siendo el valor predictivo positivo del 96,8% (IC95% 90,9-98,9) y el valor predictivo negativo de 97,7% (IC95% 94,2-99,1).

		Conclusión final		
		No cristales	UMS	PFC
Microscopio con compensador rojo	No cristales	96	1	4
	UMS	0	72	0
	PFC	3	0	90

Tabla 14. Relación del diagnóstico con compensador rojo y la conclusión final

El cálculo del grado de concordancia entre 5 observadores mirando al microscopio con compensador rojo fue moderado para los hallazgos de no cristales y PFC, bueno para el κ global y muy bueno para UMS como se muestra en la Tabla 15.

Categoría	Kappa	IC (95%)	Valor p
No cristales	0,6003	0,5294-0,8507	<0,001
UMS	0,8474	0,6611-1,0330	<0,001
PFC	0,6014	0,3985-0,8035	<0,001
Kappa global	0,6965	0,5498-0,8426	<0,001

Tabla 15. Análisis de concordancia entre los 5 observadores en el microscopio con compensador rojo. 31 muestras, 155 observaciones



8. DISCUSIÓN

8.1 COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS

Este no es el primer estudio que analiza la concordancia en la identificación de cristales en líquido sinovial al microscopio óptico; pero sí que es el primero que exige el grado de acuerdo entre 5 observadores y se realiza en condiciones casi idénticas a la práctica clínica habitual, lo cual otorga a los resultados mayor relevancia.

Solamente dos estudios previos han evaluado la fiabilidad de la identificación de microcristales en líquido sinovial mediante microscopía óptica: el estudio de Pascual *et al* (28) se diseñó para estimar la utilidad del microscopio óptico con luz simple para detectar e identificar cristales. En él, 2 observadores examinaron 63 muestras de líquido sinovial, obteniendo un κ para detección de cristales de 0,96 (IC95% 0,958-0,961) con microscopía óptica con luz polarizada. El segundo estudio, de Lumbreras *et al* (50), obtuvo un grado de concordancia global de κ 0,85, realizándose el cálculo de cada uno de los residentes entrenados para identificar cristales frente al experto (es decir, dos observadores). En nuestro trabajo, el grado de concordancia obtenido (κ 0,7511) es inferior, pero de un enorme valor si se tiene en cuenta que son cinco los observadores. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en otros estudios que han empleado un número similar de observadores, encontramos resultados superponibles: en un estudio en el que se calcula la consistencia en la detección al microscopio de *Plasmodium falciparum* de 4 microscopistas experimentados (53), tras analizar 711 muestras se obtiene un κ 0,79, muy próximo a nuestro resultado de acuerdo global (κ 0,7590). Un segundo estudio evaluó el grado de acuerdo entre 4 patólogos especialistas en urología para dar el grado Gleason a 50

biopsias de próstata (54). El κ interobservador fue de 0,72, muy similar al obtenido en nuestro estudio (κ 0,7590). Finalmente, un estudio de ecografía en artritis reumatoide con cinco observadores encontró para la detección de sinovitis en modo B un κ de 0,77 (IC95% 0,70-0,83) y para el power Doppler de 0,83 (IC95% 0,73-0,86). (55). Es cierto que al ser técnicas distintas no se pueden comparar los κ pero permite tener una idea general de los grados de acuerdo multiobservador en otras técnicas ampliamente usadas e integradas en la práctica habitual: como se puede observar en la Tabla 16 los grados de acuerdo son muy similares cuando se calcula entre múltiples observadores por lo que los resultados obtenidos en nuestro trabajo se pueden considerar válidos.

	Observadores	Técnica	Qué miden	Kappa	IC 95%
Hammer, 2011	5	Ecografía- Modo B	Sinovitis en AR	0,770	0,70-0,830
		Ecografía-PD	Sinovitis en AR	0,830	0,73-0,860
Rodriguez-Urrego, 2011	4	Microscopio	Grado Gleason	0,720	No disponible
Killian, 2000	4	Microscopio	<i>P. falciparum</i>	0,790	No disponible
Bernal, 2017	5	Microscopio	Cristales	0,759	0,6247-0,8901

Tabla 16. Comparación de estudios de reproducibilidad entre múltiples observadores en diversas técnicas utilizadas en práctica clínica. AR: artritis reumatoide, PD: power Doppler

8.2 DATOS DESCRIPTIVOS DE LA MUESTRA

En este estudio se han incluido 60 muestras, al ser 5 observadores había 300 potenciales observaciones, aunque finalmente se realizaron 266. La distribución de la procedencia de la muestra ha sido similar entre hombres y mujeres. En relación al origen de la muestra destaca la rodilla (67,3%), seguida de lejos por el tobillo (13,2%). Un 33,8% de las muestras provenían de pacientes diagnosticados de gota por su

médico habitual, el 18,4% de pacientes con artritis reumatoide, el 15% de artritis por PFC, un 8,3% fueron derrames articulares mecánicos, el 3,4% artritis sépticas y un 1,9% enfermedad de Still. Esta variabilidad es reflejo de un diseño con muestreo consecutivo.

A continuación, en los siguientes puntos de este apartado se va a realizar una discusión detallada de los resultados por cada objetivo.

8.3 CONCORDANCIA

Objetivo 1. Determinar el grado de concordancia entre varios observadores en la detección e identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico.

Para el análisis de los datos de concordancia se utilizaron solo las muestras evaluadas por los 5 observadores, con el objetivo de tener resultados con mayor consistencia. El grado de concordancia en la detección de cristales, es decir, presencia o ausencia de cristales, fue κ de 0,7511. El resultado varía de forma notable dependiendo del tipo de cristal presente: para la identificación de UMS se obtuvo κ 0,9058, mientras que para la identificación de PFC la concordancia fue muy inferior, κ 0,6559. Estas diferencias de grado de acuerdo entre UMS y PFC, en beneficio del UMS, son esperables si tenemos en cuenta los estudios de validez de la técnica, comentados en la tabla 2, que muestran mayor sensibilidad y especificidad para identificar UMS que para el PFC. Por otro lado también es cierto que algunos líquidos sinoviales de pacientes con artrosis pueden contener cristales de PFC y no existe una definición de cuántos cristales es necesario observar para considerar la presencia de PFC patológica.

8.4 ANÁLISIS AL MICROSCOPIO ÓPTICO CON LUZ SIMPLE

Objetivo 2. Estimar la frecuencia de identificación correcta de cristales (sensibilidad) mediante la microscopía óptica con luz ordinaria.

El microscopio óptico con luz simple es el primer paso cuando se examina un líquido sinovial al microscopio óptico. Esta fase es fundamental, ya que un elevado porcentaje de cristales de PFC no tienen, o tienen muy débil, birrefringencia, lo que hace que puedan no ser detectados al utilizar el filtro de polarización (36).

En nuestro estudio el 96,99% de los resultados obtenidos con luz simple coinciden con la conclusión final tras haber pasado por el filtro polarizado y el compensador rojo. Tan solo se han encontrado 8/266 (3%) discrepancias con la conclusión final. Con estos datos se puede afirmar que la mayoría de las veces no es necesario un filtro polarizado y compensador rojo para llegar a un diagnóstico.

Se han calculado la sensibilidad, especificidad y valores predictivos tomando como resultado definitivo la conclusión final. Respecto a la detección de cristales, cuando tras el examen con luz simple se concluye que sí hay cristales, el valor predictivo positivo es del 98,2%, es decir, la probabilidad de acabar concluyendo que sí hay cristales es muy alta. Cabe destacar que en el caso del UMS, el valor predictivo positivo es del 100% y negativo del 98,5%. Tampoco son nada despreciables los valores predictivos del PFC, siendo el positivo del 96,8% y el negativo del 98,8%.

En la bibliografía solamente encontramos un estudio que haya evaluado las capacidades diagnósticas de la microscopía de luz simple frente a la luz polarizada (28).

En este trabajo Pascual *et al* obtienen resultados muy buenos con la luz simple, son 2

observadores: el primero detecta cristales en 26 de 27 líquidos con cristales (un falso negativo) y el segundo detecta cristales en 28 de 27 (un falso positivo). Estos buenos resultados se asemejan a los obtenidos en nuestro trabajo con la luz simple. La explicación al porqué de estos buenos resultados se debe al diagnóstico morfológico. La microscopía óptica nos da información sobre la morfología del cristal y la mayoría de las veces la morfología es clarificadora. Solo nos pueden generar dudas algunos cristales aciculares en los que precisemos aumentar el objetivo o ver su birrefringencia para caracterizarlo.

8.5 ANÁLISIS AL MICROSCOPIO ÓPTICO CON LUZ POLARIZADA

Objetivo 3. Demostrar que el examen con filtro polarizado cruzado es el tipo de filtro que mejor identifica los cristales de UMS.

En esta segunda fase también se realizaron 266 observaciones. Si se observa la Tabla 12 se puede percibir rápidamente los malos resultados obtenidos en esta fase para el PFC, con una sensibilidad de 64,9%. Pese a ello, el grado de acuerdo se clasifica como bueno (0,6514). Lo sucedido con el PFC tiene su explicación en que, por definición, los cristales de PFC presentan una birrefringencia débil y algunos aparecen como no birrefringentes. De hecho solo uno de cada 5 cristales muestran birrefringencia (36). Por este motivo, aunque se hayan visto en la fase anterior (con luz simple) dejarán de verse al polarizar.

Respecto al UMS la sensibilidad fue del 100%, la especificidad del 99% y los valores predictivos positivo y negativo fueron de 97,3% y 100% respectivamente. Para contestar al objetivo número 3, al comparar con el microscopio óptico con luz simple y

con el compensador rojo se aprecia que la luz polarizada es la fase más sensible con un 100% frente a un 95,9% con luz simple y un 98,6% con el compensador rojo. Sin embargo la especificidad en las otras dos fases es del 100% y en la polarización es del 99%. Con estos datos no se puede afirmar que el filtro polarizado sea la mejor fase para identificar UMS cuando se miran obligatoriamente 30 campos. Aunque probablemente sea la fase que los detecta más fácilmente y de forma más sencilla debido a la intensa birrefringencia que caracteriza al UMS. De hecho en ocasiones se recomienda mirar a 200x con el polarizador cruzado para detectar los cristales (35) y luego caracterizarlos a más aumentos.

8.6 INFLUENCIA DEL TIEMPO EN EL ANÁLISIS

Objetivo 4. Evaluar si hay menor concordancia en los líquidos analizados después de 24 horas.

Un 85,2% de los análisis se realizaron antes de 24 horas. Para descartar si el tiempo que se tardó en realizar el análisis influyó en los resultados se realizó por separado la concordancia de muestras donde todos los análisis se realizaron antes de 24 horas, y por otro lado la concordancia de muestras en las que alguno de sus análisis fue realizado posterior a 24 horas. Al comparar los κ de estos dos análisis no se obtuvieron diferencias significativas, si bien es cierto que se detecta una mayor tendencia al acuerdo cuando todas las observaciones se realizan dentro de las primeras 24 horas. En la literatura son pocos los artículos que hayan tratado este tema directamente. Quizás el más relevante sea el de Gálvez *et al* (33) que refrigeraron muestras de líquido sinovial con cristales a 4°C y las miraron de nuevo a las 24 horas identificando el UMS en el 97% de los casos y PFC en el 100%. Las mismas muestras se miraron a las 72

horas y se observó UMS en el 96% y PFC en el 97%. McGill *et al* en 1991 (32) hicieron otro estudio donde a las 8 semanas seguía viéndose PFC en 10/11 muestras refrigeradas. En nuestro caso todas las muestras estaban refrigeradas a 4°C hasta su análisis por lo que no es de extrañar que el tiempo no haya influido en el grado de acuerdo.

8.7 NÚMERO DE CAMPOS A ANALIZAR

Objetivo 5. Describir el número de campos que se analizan hasta detectar el primer cristal.

En el trabajo se muestra el número de campo en el que se observa el primer cristal en 136 observaciones. Obteniendo una mediana de 1 campo tanto para acabar identificando UMS como PFC, es decir, la mayoría de las veces que se identifica un cristal se observa en el primer campo. Estos datos coinciden con los publicados en un trabajo en 1995 de diagnóstico de gota intercrítica. En este trabajo también se analizan 30 campos y de 77 muestras con UMS en el 61% se encuentran cristales en el primer campo, y en el 90% de los casos se encontraban los cristales en los 5 primeros campos (24). Aunque no haya evidencia y se necesiten más estudios para demostrar cuántos campos es necesario analizar cuando se buscan cristales al microscopio óptico, se recomienda hacer búsquedas por número de campos más que por tiempo, y analizar 30 campos parece que es un número de campos razonable (35).

8.8 FORTALEZAS

La principal fortaleza de este estudio es que el grado de concordancia se ha medido en 5 observadores, lo que da mayor consistencia a los resultados. Por otro lado también hay que destacar que por el diseño del análisis al microscopio óptico todo el proceso

se asemeja bastante a la práctica habitual, esto hace que los resultados sean más cercanos a la realidad.

8.9 LIMITACIONES

- Para el objetivo 1 se han analizado 31 muestras que equivalen a 155 observaciones. El objetivo inicial eran 60 muestras, y se recogieron, pero no todos los observadores pudieron analizar las 60 muestras, motivo por el cual no se incluyeron en el análisis de concordancia todas las muestras recogidas, sino solo las 31 con 5 observadores.

- No todas las veces el observador era ciego a los datos clínicos del paciente. Si el observador era el que obtenía la muestra, su análisis se incluía sin ser ciego. Si bien el resto de observadores sí eran ciegos.

- No todos los observadores miraban los mismos campos. Cada observador preparaba la muestra individualmente y miraba al microscopio de forma individual, por lo que los campos eran distintos para cada una de las 5 observaciones.

- Se han incluido análisis de muestras realizados posterior a 24 horas. El diseño inicial no lo preveía así pero finalmente se optó por cambiar para facilitar la realización del estudio. Aunque es una posible limitación del trabajo, el estudio de concordancia de las muestras con algún análisis después de 24 horas, comparado con las muestras con todos los análisis antes de 24 horas, no mostró diferencias significativas.

- Los análisis que concluían con UMS y PFC se consideraron como UMS para el análisis de datos. Esta decisión se tomó por la dificultad para clasificar como patológicas algunas muestras con pocos cristales de PFC. Los datos finales podrían verse afectados en perjuicio del PFC.

8.10 LECCIONES APRENDIDAS Y QUÉ SE PODRÍA HABER HECHO DIFERENTE

- El tiempo hasta el análisis es un punto de controversia. Probablemente un diseño más laxo, permitiendo análisis hasta 72 horas hubiera permitido tener más muestras con 5 observaciones.

- Se decidió que analizar 30 campos era suficiente para concluir que no hay cristales. Este dato se consensuó durante el diseño pero no hay ningún trabajo que lo apoye. Cada observador miraba de forma independiente la muestra por lo que cada uno tenía sus propios campos. Esto hace que en líquidos con poca concentración de cristales el analizar 30 campos pudiera ser una limitación por lo que analizar más campos podría haber cambiado el grado de acuerdo.

8.11 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN A RAÍZ DE ESTA TESIS DOCTORAL

Tras finalizar este trabajo se abren varias líneas de posibles investigaciones, algunas de ellas ya se están poniendo en marcha en el grupo de investigación del doctorando. Las líneas de investigación tienen que permitir resolver los siguientes puntos:

- Estimar el número de campos necesarios a analizar para considerar a una muestra como "sin cristales".

- Evaluar cuánto tiempo puede pasar para analizar una muestra de líquido sinovial sin alterar el resultado final y cómo conservar la muestra hasta entonces.
- Establecer la relevancia clínica de encontrar un pequeño número de cristales de PFC.

9. CONCLUSIONES

- Existe un grado de concordancia interobservador (con 5 observadores) bueno para la detección e identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico.
- Para la identificación del UMS en líquido sinovial al microscopio óptico existe un grado de concordancia interobservador (con 5 observadores) muy alto.
- En la mayoría de los análisis se detecta e identifica el tipo de cristal en la primera fase, el microscopio óptico con luz simple.
- En nuestro estudio no hay diferencias en el acuerdo entre las muestras analizadas antes de 24 horas y en las que alguno de sus observadores realiza el análisis posterior a 24 horas.
- La mayoría de las veces que se detecta un cristal se realiza en los primeros campos que se observan.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003 Oct 2;425(6957):516–21.
2. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):237–41.
3. Roddy E, Choi HK. Epidemiology of gout. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014 May;40(2):155–75.
4. Kuo C-F, Grainge MJ, Zhang W, Doherty M. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Nov;11(11):649–62.
5. Mikuls TR, Farrar JT, Bilker WB, Fernandes S, Schumacher HR, Saag KG. Gout epidemiology: results from the UK General Practice Research Database, 1990-1999. *Ann Rheum Dis*. 2005 Feb;64(2):267–72.
6. Bernal JA, Andrés M, Sivera F, Carmona L, Vela P, Pascual E. THU0517 Women with Gout Show A Poorer Cardiovascular Profile after Structured Assessment. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jun 1;75(Suppl 2):379–379.
7. Harrold LR, Etzel CJ, Gibofsky A, Kremer JM, Pillinger MH, Saag KG, et al. Sex differences in gout characteristics: tailoring care for women and men. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017 Mar 14;18(1):108.
8. Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. *Curr Opin Rheumatol*. 2014 Mar;26(2):186–91.
9. Loeb JN. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum*. 1972 Apr;15(2):189–92.
10. Champion EW, Glynn RJ, DeLabry LO. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. *Am J Med*. 1987 Mar;82(3):421–6.

11. Pineda C, Amezcua-Guerra LM, Solano C, Rodríguez-Henríquez P, Hernández-Díaz C, Vargas A, et al. Joint and tendon subclinical involvement suggestive of gouty arthritis in asymptomatic hyperuricemia: an ultrasound controlled study. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jan 17;13(1):R4.
12. De Miguel E, Puig JG, Castillo C, Peiteado D, Torres RJ, Martín-Mola E. Diagnosis of gout in patients with asymptomatic hyperuricaemia: a pilot ultrasound study. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jan;71(1):157–8.
13. Dalbeth N, House ME, Aati O, Tan P, Franklin C, Horne A, et al. Urate crystal deposition in asymptomatic hyperuricaemia and symptomatic gout: a dual energy CT study. *Ann Rheum Dis*. 2015 May;74(5):908–11.
14. Pascual E. Persistence of monosodium urate crystals and low-grade inflammation in the synovial fluid of patients with untreated gout. *Arthritis Rheum*. 1991 Feb;34(2):141–5.
15. Krishnan E, Baker JF, Furst DE, Schumacher HR. Gout and the risk of acute myocardial infarction. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2688–96.
16. Nossent J, Raymond W, Divitini M, Knuiman M. Asymptomatic hyperuricemia is not an independent risk factor for cardiovascular events or overall mortality in the general population of the Busselton Health Study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016 Dec 15;16(1):256.
17. Andrés M, Quintanilla M-A, Sivera F, Sánchez-Payá J, Pascual E, Vela P, et al. Silent Monosodium Urate Crystal Deposits Are Associated With Severe Coronary Calcification in Asymptomatic Hyperuricemia: An Exploratory Study. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2016 Jun;68(6):1531–9.
18. Andrés M, Bernal JA, Sivera F, Quilis N, Carmona L, Vela P, et al. Cardiovascular

risk of patients with gout seen at rheumatology clinics following a structured assessment. *Ann Rheum Dis.* 2017 Jan 16;

19. Neame RL, Carr AJ, Muir K, Doherty M. UK community prevalence of knee chondrocalcinosis: evidence that correlation with osteoarthritis is through a shared association with osteophyte. *Ann Rheum Dis.* 2003 Jun;62(6):513–8.

20. Jones AC, Chuck AJ, Arie EA, Green DJ, Doherty M. Diseases associated with calcium pyrophosphate deposition disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1992 Dec;22(3):188–202.

21. O’Duffy JD. Clinical studies of acute pseudogout attacks: comments on prevalence, predispositions, and treatment. *Arthritis Rheum.* 1976 Jun;19 Suppl 3:349–52.

22. Mccarty DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med.* 1961 Mar;54:452–60.

23. Kohn NN, Hughes RE, McCARTY DJ, Faires JS. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the “pseudogout syndrome”. II. Identification of crystals. *Ann Intern Med.* 1962 May;56:738–45.

24. Pascual E, Batlle-Gualda E, Martínez A, Rosas J, Vela P. Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout. *Ann Intern Med.* 1999 Nov 16;131(10):756–9.

25. Martínez Sanchis A, Pascual E. Intracellular and extracellular CPPD crystals are a regular feature in synovial fluid from uninflamed joints of patients with CPPD related arthropathy. *Ann Rheum Dis.* 2005 Dec;64(12):1769–72.

26. Ogdie A, Taylor WJ, Neogi T, Fransen J, Jansen TL, Schumacher HR, et al. Performance of Ultrasound in the Diagnosis of Gout in a Multicenter Study: Comparison With Monosodium Urate Monohydrate Crystal Analysis as the Gold

Standard. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. 2017 Feb;69(2):429–38.

27. Filippou G, Frediani B, Gallo A, Menza L, Falsetti P, Baldi F, et al. A “new” technique for the diagnosis of chondrocalcinosis of the knee: sensitivity and specificity of high-frequency ultrasonography. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1126–8.

28. Pascual E, Tovar J, Ruiz MT. The ordinary light microscope: an appropriate tool for provisional detection and identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis*. 1989 Dec;48(12):983–5.

29. Bible MW, Pinals RS. Late precipitation of monosodium urate crystals. *J Rheumatol*. 1982 Jun;9(3):480.

30. Kerolus G, Clayburne G, Schumacher HR. Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis? *Arthritis Rheum*. 1989 Mar;32(3):271–8.

31. McKnight KM, Agudelo C. Comment on the article by Kerolus et al. *Arthritis Rheum*. 1991 Jan;34(1):118–20.

32. McGill NW, Swan A, Dieppe PA. Survival of calcium pyrophosphate crystals in stored synovial fluids. *Ann Rheum Dis*. 1991 Dec;50(12):939–41.

33. Gálvez J, Sáiz E, Linares LF, Climent A, Marras C, Pina MF, et al. Delayed examination of synovial fluid by ordinary and polarised light microscopy to detect and identify crystals. *Ann Rheum Dis*. 2002 May;61(5):444–7.

34. Pascual E, Jovaní V. A quantitative study of the phagocytosis of urate crystals in the synovial fluid of asymptomatic joints of patients with gout. *Br J Rheumatol*. 1995 Aug;34(8):724–6.

35. Pascual E, Sivera F, Andrés M. Synovial fluid analysis for crystals. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Mar;23(2):161–9.

36. Ivorra J, Rosas J, Pascual E. Most calcium pyrophosphate crystals appear as non-

birefringent. *Ann Rheum Dis.* 1999 Sep;58(9):582–4.

37. Pérez-Ruiz F, Carmona L, Yébenes MJG, Pascual E, de Miguel E, Ureña I, et al. An audit of the variability of diagnosis and management of gout in the rheumatology setting: the gout evaluation and management study. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis.* 2011 Oct;17(7):349–55.

38. Malik A, Schumacher HR, Dinnella JE, Clayburne GM. Clinical diagnostic criteria for gout: comparison with the gold standard of synovial fluid crystal analysis. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis.* 2009 Feb;15(1):22–4.

39. Pascual E, Andrés M, Vela P. Criteria for gout diagnosis? *J Rheumatol.* 2013 Apr;40(4):356–8.

40. Schumacher HR, Sieck MS, Rothfuss S, Clayburne GM, Baumgarten DF, Mochan BS, et al. Reproducibility of synovial fluid analyses. A study among four laboratories. *Arthritis Rheum.* 1986 Jun;29(6):770–4.

41. Hasselbacher P. Variation in synovial fluid analysis by hospital laboratories. *Arthritis Rheum.* 1987 Jun;30(6):637–42.

42. Gordon C, Swan A, Dieppe P. Detection of crystals in synovial fluids by light microscopy: sensitivity and reliability. *Ann Rheum Dis.* 1989 Sep;48(9):737–42.

43. Von Essen R, Hölttä AM. Quality control of the laboratory diagnosis of gout by synovial fluid microscopy. *Scand J Rheumatol.* 1990;19(3):232–4.

44. von Essen R, Hölttä AM, Pikkarainen R. Quality control of synovial fluid crystal identification. *Ann Rheum Dis.* 1998 Feb;57(2):107–9.

45. McGill NW, York HF. Reproducibility of synovial fluid examination for crystals. *Aust N Z J Med.* 1991 Oct;21(5):710–3.

46. Petrocelli A, Wong AL, Swezey RL. Identification of pathologic synovial fluid

crystals on gram stains. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis.* 1998 Apr;4(2):103–4.

47. Segal JB, Albert D. Diagnosis of crystal-induced arthritis by synovial fluid examination for crystals: lessons from an imperfect test. *Arthritis Care Res Off J Arthritis Health Prof Assoc.* 1999 Dec;12(6):376–80.

48. Swan A, Amer H, Dieppe P. The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jun;61(6):493–8.

49. Dieppe P, Swan A. Identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis.* 1999 May;58(5):261–3.

50. Lumbreras B, Pascual E, Frasquet J, González-Salinas J, Rodríguez E, Hernández-Aguado I. Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Ann Rheum Dis.* 2005 Apr;64(4):612–5.

51. Li B, Singer NG, Yeni YN, Haggins DG, Barnboym E, Oravec D, et al. A point of care Raman spectroscopy based device to diagnose gout and pseudogout: Comparison with the clinical standard microscopic analysis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2016 Feb 16;

52. Abhishek A, Curran DJ, Bilwani F, Jones AC, Towler MR, Doherty M. In vivo detection of monosodium urate crystal deposits by Raman spectroscopy-a pilot study. *Rheumatol Oxf Engl.* 2016 Feb;55(2):379–80.

53. Kilian AH, Metzger WG, Mutschelknauss EJ, Kabagambe G, Langi P, Korte R, et al. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. *Trop Med Int Health TM IH.* 2000 Jan;5(1):3–8.

54. Rodriguez-Urrego PA, Cronin AM, Al-Ahmadie HA, Gopalan A, Tickoo SK, Reuter VE, et al. Interobserver and intraobserver reproducibility in digital and routine

microscopic assessment of prostate needle biopsies. *Hum Pathol.* 2011 Jan;42(1):68–74.

55. Hammer HB, Bolton-King P, Bakkeheim V, Berg TH, Sundt E, Kongtorp AK, et al. Examination of intra and interrater reliability with a new ultrasonographic reference atlas for scoring of synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Nov;70(11):1995–8.



ANEXOS

ANEXO 1. APROBACIÓN DEL ESTUDIO POR EL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE.



(Ref. CEIC PI2017/13)

INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su sesión del día 22 de Febrero de 2017, y una vez estudiada la documentación presentada por el **Dr. José Antonio Bernal Vidal**, Médico Adjunto del Servicio de Reumatología del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado **"Análisis de la consistencia en la identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico"**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste, lo firma en Alicante con fecha tres de Abril de dos mil diecisiete.



Fdo. Mayte Domenech Varón
Secretaria del CEIC

ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS. EXTRACCIÓN.

SECCIÓN DE REUMATOLOGÍA
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS
Datos clínicos a rellenar por médico que realiza la artrocentesis

Nº Muestra ___ ___ ___ (lo asigna Jose)

Consentimiento informado

Fecha extracción _____ Hora extracción _____

Apuntar articulación en abucasis

Muestra en porta



ANEXO 3. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS. ANÁLISIS.

SECCIÓN DE REUMATOLOGÍA
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS Datos clínicos a rellenar por médico observador

Nº Muestra _____ Nº Observador _____

Fecha observación _____ Hora observación _____

Microscopía óptica con luz ordinaria

400x ¿hay cristales? No He mirado 30 campos
 Sí UMS PFC ambos
No está claro

Nº Campo

Microscopía con filtro polarizado cruzado

400x ¿hay cristales? No He mirado 30 campos
 Sí UMS PFC ambos
No está claro

Nº Campo

Microscopía con compensador rojo de primer orden

400x ¿hay cristales? No He mirado 30 campos
 Sí UMS PFC ambos
No está claro

Nº Campo

CONCLUSIÓN FINAL:

- No hay cristales
- Cristales de UMS
- Cristales de PFC
- Cristales de UMS+PFC

ANEXO 4. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO	ANÁLISIS DE LA CONSISTENCIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROCRISTALES EN LÍQUIDO SINOVIAL AL MICROSCOPIO ÓPTICO
CÓDIGO DE PROTOCOLO	IDE-CRIS-2016-1
VERSIÓN Y FECHA	V2 – 31/03/2017
PROMOTOR e IP	Dr. José Antonio Bernal Vidal

1. INTRODUCCIÓN

Su médico le invita a participar en un estudio en el que se analizará al microscopio el líquido sinovial que se le acaba de extraer. Antes de decidir si usted quiere participar o no, le rogamos que **lea con detenimiento esta hoja** donde le explicamos la finalidad del estudio, así como las implicaciones de la participación en el mismo. Puede preguntar todo lo que no entienda y solicitar más información a su médico.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

La inflamación articular (artritis) por depósito de cristales como urato monosódico (gota) o pirofosfato cálcico (pseudogota) es una de las causas más frecuentes de artritis. Para poder realizar un diagnóstico de estas enfermedades es necesario visualizar estos cristales en el líquido sinovial a través del microscopio óptico. Son pocos los estudios que han intentado comprobar que esta técnica es fiable para identificar los cristales, y además, con resultados dispares.

El principal objetivo de este estudio evaluar la consistencia en la identificación de microcristales en líquido sinovial al microscopio óptico.

Para ello en el estudio varios observadores (reumatólogos de la Sección de Reumatología del Hospital General Universitario de Alicante) que no conocen ningún dato sobre usted observarán el líquido sinovial que se le ha extraído de forma independiente, y posteriormente se analizará el grado de acuerdo. También se recogerá algún **datos clínico mediante entrevista clínica**, para posteriormente analizar qué variables pueden haber influido.

3. ¿ESTOY OBLIGADO A PARTICIPAR?

Su participación en este estudio es **voluntaria**, por lo que usted podrá decidir si desea o no participar en él, así como cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento. Si accede a tomar parte en el estudio, se le entregará este documento informativo, que deberá guardar, y se le pedirá que firme un consentimiento. Esta decisión no afectará a la asistencia sanitaria que reciba ni producirá perjuicio alguno en su tratamiento tanto si decide

participar como si no. Si decidiera revocar el Consentimiento sus datos no se extenderán a los datos resultantes de la investigación.

El estudio ha sido aprobado por el **Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HGUA**.

4. ¿QUÉ SUCEDERÁ SI DESEO PARTICIPAR?

Si usted decide aceptar el líquido sinovial que se le ha extraído será analizado por varios reumatólogos. El hecho de participar en el estudio no requiere ninguna prueba más puesto que solo se analizan líquidos sinoviales que se han extraído por necesidad clínica, es decir para realizar el diagnóstico o con actitud terapéutica.

5. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El hecho de participar en este estudio no alterará la atención médica que se merece. Si decide no participar, este hecho no tendrá ningún efecto en su atención. Los médicos que le atenderán no modificarán sus decisiones por el hecho de que participe o no en este estudio. Participando en este estudio usted no obtendrá ningún beneficio de su participación en el estudio. Por otra parte, esperamos que la información obtenida sirva para demostrar que la identificación de cristales en el líquido sinovial con el microscopio es una técnica fiable.

6. DERECHO A SER INFORMADO Y DERECHO A NO SER INFORMADO

Si lo desea se le hará llegar una copia de los resultados del estudio. Los datos serán almacenados garantizando el derecho al acceso.

7. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (**versión octubre 2013**), las normas de Buena Práctica Clínica y la orden ministerial SAS/3470/2009, legislación vigente en España relativa a la realización de estudios observacionales. Su información clínica será sometida a un proceso de anonimización, es decir, en el momento de la recogida de sus datos se le asignará un código numérico. Los datos del paciente serán proporcionadas de forma codificada a los investigadores. Ni su nombre, ni ninguna información que le identifique aparecerán en ningún escrito y/o comunicación derivada de este estudio.

La recogida y tratamiento de dichos datos se llevarán a cabo de acuerdo con la legislación aplicable en materia de privacidad. Se cumplirá en todo momento con lo establecido por la **Ley Orgánica 15/1999**, de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. Se adoptarán las medidas oportunas para **garantizar la debida protección de los datos en todo momento**, sin violación alguna de la confidencialidad. Usted tiene derecho a solicitar la rectificación de cualquier dato incorrecto o incompleto. Ni usted ni ninguna otra persona que

pueda ver los resultados del estudio podrán identificar a las personas que han participado en el mismo.

8. RETIRADA DEL ESTUDIO

Usted puede retirarse del estudio en cualquier momento sin haber de dar explicaciones y en cualquier momento del desarrollo de este trabajo. También podrá solicitar que se destruya su información clínica o que se excluyan del estudio los resultados o datos obtenidos con ella. Para retirarse del estudio ha de comunicar su voluntad de retirarse al investigador del centro hospitalario donde usted entró a participar en este estudio (el nombre del investigador figura en la última página de este consentimiento).

INFORMACIÓN ADICIONAL

Si desea comentar en algún otro momento con detalle este estudio, puede dirigirse al Dr. José Antonio Bernal Vidal en el teléfono 965-933-015.

Gracias por su atención. Si accede a participar en este estudio, su médico le entregará una copia de esta hoja de información para el paciente y una copia firmada del formulario del Consentimiento Informado.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO	ANÁLISIS DE LA CONSISTENCIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROCRISTALES EN LÍQUIDO SINOVIAL AL MICROSCOPIO ÓPTICO
CÓDIGO DE PROTOCOLO	IDE-CRIS-2016-1
VERSIÓN Y FECHA	V1 – 03/10/2016
PROMOTOR e IP	Dr. José Antonio Bernal Vidal

Yo, _____ (nombre completo del participante) al firmar abajo indico que estoy de acuerdo con los siguientes puntos:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Declaro bajo mi responsabilidad que:

- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

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.

FIRMA DEL PARTICIPANTE:	FIRMA DEL INVESTIGADOR:
NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA: