

## LAVORO ORIGINALE

# La colorazione con Diff-Quik<sup>®</sup> per l'identificazione di cristalli di urato monosodico e pirofosfato di calcio diidrato nel liquido sinoviale

*Diff-Quik<sup>®</sup> staining method for detection and identification of monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals in synovial fluids*

S. Manganelli, E. Selvi, M. Catenaccio, S. Cucini, R. De Stefano,  
E. Frati, M. Hammoud, R. Marcolongo

Istituto di Reumatologia, Università degli Studi di Siena

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate whether DQ could prove useful to identify monosodium urate (MSU) and calcium pyrophosphate dehydrate (CPPD) crystals on permanent mounted stained slides.

To this end, we studied 27 synovial fluid (SF) samples obtained from the knees of patients with the pseudogout (n=21) and acute gouty arthritis (n=6). Wet analysis for crystal detection and identification was performed within one hour of joint aspiration. In addition, we studied 16 inflammatory synovial effusions obtained from patients with knee arthritis not induced by crystals. For each SF, DQ stained slides were analyzed by 2 experienced doctors in SF analysis. The observers were blinded to the type of crystal present in the SF. Each slide was analyzed by compensated polarized and transmitted light microscopy. SF was considered positive if intracellular and/or extracellular crystals were clearly identified. In addition, the observers were asked to identify the type of the crystals using compensated polarized light microscopy. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the DQ staining method were determined.

51 true positive and 28 true negative specimens were correctly classified (39 CPPD samples, 12 MSU samples, and 28 samples of crystals-unrelated arthropathies). All MSU specimens were correctly diagnosed.

Reumatismo, 2001; 53(4):305-308

## INTRODUZIONE

Nella pratica clinica, per accertare la presenza ed eventualmente per identificare i cristalli di urato monosodico (UMS) e di pirofosfato di calcio diidrato (PPCD) nel liquido sinoviale (LS), si procede all'osservazione di campioni a fresco al microscopio a luce polarizzata con compensatore rosso di primo ordine.

L'esame citologico e le formule leucocitarie possono essere effettuati su preparati sia citocentrifugati sia strisciati in strato sottile e successivamente colorati. L'identificazione dei microcristalli non può però essere routinariamente condotta sul

campione utilizzato per lo studio citologico poiché le tecniche di colorazione per quest'ultimo potrebbero fornire risultati non attendibili, dovuti ad artefatti o alla solubilizzazione dei cristalli (1, 2, 3, 4).

Fino ad oggi è stata dedicata poca attenzione all'impiego, nella sinovianalisi, di preparati colorati. Recentemente Petrocelli et al hanno dimostrato l'utilità della colorazione di Gram per l'identificazione dei cristalli di UMS e di PPCD: tale tecnica consente di ottenere campioni che conservano ancora i cristalli patologici a più di due anni dalla prima osservazione (5).

Schumacher ha inoltre descritto l'utilizzo di una colorazione sopravvitalte impiegando vetrini precolorati che permettono contemporaneamente di valutare sia l'aspetto citologico sia la presenza o meno di cristalli patologici (1, 6).

Indirizzo per la corrispondenza:

Stefania Manganelli, Istituto di Reumatologia, Università di Siena

Lo scopo del nostro studio è stato di valutare se strisci di LS colorati con Diff-Quik® [Dade Behring-Switzerland] (DQ), un preparato su base alcolica che consente una rapida tecnica di colorazione, potessero essere utilizzati per identificare cristalli di UMS e PPCD (7) consentendo allo stesso tempo di visualizzare la cellularità.

## MATERIALI E METODI

Il nostro studio è stato condotto su 27 LS eparinizzati, raccolti durante un periodo di circa sei mesi e tutti indotti da una patologia infiammatoria di natura microcristallina, come confermato dall'osservazione microscopica. In particolare 21 LS erano ottenuti dall'artrocentesi delle ginocchia di altrettanti pazienti affetti da artropatia correlata a cristalli di PPCD mentre 6 erano aspirati dalle ginocchia di pazienti con ricorrenti attacchi di artrite gotosa.

Abbiamo successivamente studiato 16 liquidi infiammatori prelevati da pazienti con artrite a patogenesi non microcristallina (8 con artrite reumatoide, 1 con LES e 7 con spondiloartriti sieronegative includenti 1 spondilite anchilosante, 3 artropatie psoriasiche, 2 malattie infiammatorie intestinali correlate ad artropatia, 1 artrite reattiva).

L'analisi a fresco era effettuata entro un'ora dall'artrocentesi e i cristalli erano identificati da un reumatologo esperto in sinovianalisi (RDS) a conoscenza dei dati clinici di ciascun paziente.

Ogni campione di LS era strisciato su un vetrino precedentemente sgrassato, essiccato all'aria a temperatura ambiente, colorato con DQ secondo le indicazioni della ditta produttrice: immerso per cinque volte consecutive dapprima in una soluzione fissante contenente metanolo, successivamente in una soluzione colorante contenente Eosina G, poi in una seconda soluzione colorante (Tiazina Dye), infine sciacquato delicatamente con acqua distillata. L'intero processo di colorazione durava circa 15 secondi. I preparati erano poi chiarificati in xilolo e coperti con un vetrino coprioggetti montato con un montante non acquoso.

Ciascun preparato era analizzato in cieco e separatamente da due di noi (ES, SM) al microscopio in luce diretta e quindi in luce polarizzata compensata ad un ingrandimento di 400x. Quando necessario si procedeva all'esame ad un ingrandimento di 1000x in immersione. Ad ogni osservatore erano consentiti non più di 5 minuti da dedicare a ciascun vetrino. Un LS in cui erano chiara-

mente evidenziati cristalli intra e/o extracellulari era considerato positivo ed in tal caso all'osservatore era richiesto di identificarne il tipo utilizzando il microscopio a luce polarizzata compensata. A completamento del nostro studio abbiamo cercato di migliorare la tecnica d'identificazione dei cristalli di UMS e PPCD in quei campioni di LS che ne contenevano un esiguo numero, utilizzando preparazioni citocentrifugate e sottoposte a colorazione con DQ.

## RISULTATI

L'osservazione delle preparazioni colorate con DQ, se confrontate ai controlli a fresco, non rivelava alcuna differenza relativamente alle dimensioni dei cristalli, alla loro refrattività, alla loro birifrangenza. In particolare i cristalli di MSU non erano facilmente identificabili alla microscopia ottica ordinaria, come descritto altrove (9), mentre all'osservazione microscopica in luce polarizzata compensata apparivano aghiformi e fortemente birifrangenti negativi. D'altro canto campioni di PPCD erano più facilmente identificabili con il microscopio a luce ordinaria in pseudofase.

Dei 43 liquidi sinoviali, analizzati in maniera indipendente dai due esaminatori così da ottenere il complessivo numero di 86 osservazioni, erano correttamente classificati 51 veri positivi e 28 veri negativi (39 PPCD, 6 UMS, 28 provenienti da artropatie non correlate a cristalli). In totale erano riscontrati 4 casi falsi positivi e 3 casi falsi negativi; in tutti i falsi positivi erano erroneamente identificati cristalli extracellulari di PPCD, mentre nei 3

**Tabella I** - Risultati dell'identificazione di cristalli di UMS e PPCD su strisci di liquido sinoviale colorato con DQ

	PPCD	UMS	Totale
VP	39	12	51
VN	40	74	28
FP	4		4
FN	3		3
Sensibilità	92,9%	100%	94,4%
Specificità	90,9%	100%	87,5%
Accuratezza	91,9%	100%	91,9%
PVP	90,7%	100%	92,7%
VPN	93,0%	100%	90,3%

VP: veri positivi; VN: veri negativi; FP: falsi positivi; FN: falsi negativi; PVP: predittività positiva; VPN: predittività negativa.

casi falsi negativi non erano osservati i cristalli di PPCD intracellulari. I campioni di UMS sono stati invece tutti correttamente classificati. La sensibilità, specificità e accuratezza complessive per la conferma della presenza dei cristalli nei vetrini colorati con DQ erano rispettivamente a 87,5%, 94,4%, 91,9%. La predittività positiva risultava 92,7% mentre quella negativa 90,3%. In particolare la sensibilità, la specificità e accuratezza nell'identificazione dei PPCD erano rispettivamente 92,9%, 90,9% e 91,9% con una predittività positiva di 90,7% e una predittività negativa di 93,9%. Tutti i campioni di cristalli di UMS erano correttamente identificati fornendo il 100% di sensibilità, specificità, accuratezza, predittività positiva e predittività negativa (Tab. I).

Le preparazioni citocentrifugate di LS, contenenti pochi cristalli e sottoposte a colorazione con DQ hanno permesso di ottenere, con una metodica estremamente semplice, numerosi cristalli intra ed extracellulari ben preservati.

## CONCLUSIONI

I nostri dati mostrano gli accurati risultati ottenuti dall'analisi di vetrini colorati con DQ, espressi dall'eccellente concordanza con la valutazione a fresco. I LS contenenti cristalli di UMS (Fig. 1) erano tutti correttamente identificati, mentre i 7 errori compiuti riguardavano la presenza o l'assenza di cristalli di PPCD (Fig. 2). Va tuttavia precisato che i 4 preparati, definiti erroneamente PPCD positivi, erano classificati come positività extracellulare e in nessuno di essi erano presenti cristalli intracellulari.

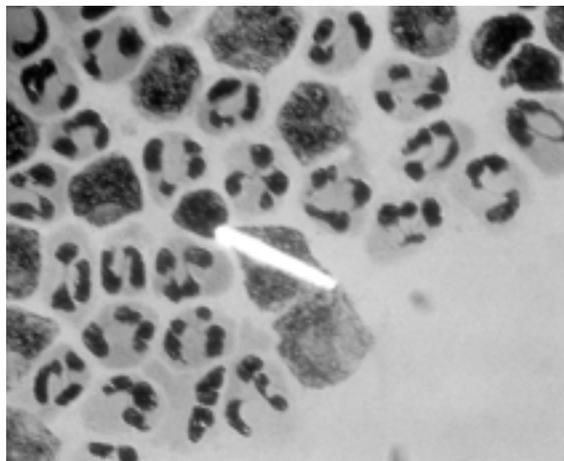


Figura 1 - Colorazione con Diff-Quik®: cristallo di UMS.

D'altro canto i liquidi indicati come falsi negativi erano caratterizzati, nelle preparazioni a fresco, da una bassa cellularità con pochi cristalli intra ed extracellulari, moderatamente birifrangenti. La più grande difficoltà incontrata nello studio in doppio cieco è stata la valutazione dei preparati provenienti da liquidi caratterizzati da una bassa conta leucocitaria e da un'alta viscosità, come esaminato dalle preparazioni a fresco. La colorazione con DQ ha mostrato infatti un'ulteriore riduzione della densità di cellule e cristalli attribuibile alla necessità di ottenere strisci sottili. I preparati citocentrifugati e colorati con tale metodica possono fornire un notevole aiuto nell'identificazione dei cristalli nei LS a scarsa cellularità. La stessa difficoltà è stata incontrata da Petrocelli et al in un simile studio effettuato con la colorazione di Gram (6): la sensibilità, la specificità, la predittività negativa e la predittività positiva mostrano valori simili ai nostri. Essi hanno concluso affermando la buona attendibilità dei risultati ottenuti con l'analisi degli strisci colorati di LS.

La diagnosi di artrite microcristallina viene formulata in base all'identificazione di alcuni cristalli UMS e PPCD (Fig. 2) con l'osservazione a fresco al microscopio in luce ordinaria e polarizzata compensata (10, 11). Tuttavia la scarsa riproducibilità di tale analisi, l'impiego di tecnici esperti, la necessità di effettuare tale indagine entro poche ore dall'artrocentesi ha focalizzato l'attenzione dei reumatologi sulla necessità di sistemi di controllo di qualità e di laboratori referenziati. Proprio la possibilità di poter conservare per un lungo periodo di tempo preparati colorati di LS, dovrebbe servire per promuovere e accrescere la qualità dei sistemi

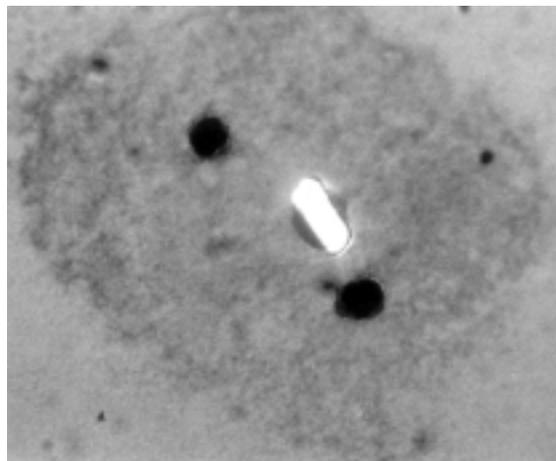


Figura 2 - Colorazione con Diff-Quik®: cristallo di PPCD.

di controllo fra i laboratori. È importante sottolineare come, con la tecnica di colorazione utilizzata nel nostro lavoro, i cristalli possano essere ancora facilmente identificati a dodici mesi dalla fine del nostro studio.

Riteniamo pertanto che i preparati colorati di LS, includendo tra le metodiche di colorazione anche il DQ, potrebbero essere utilizzati nella sinovianalisi come controllo di qualità includente sia l'esame citologico sia l'identificazione dei microcristalli.

#### RIASSUNTO

Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'efficacia di tale metodica di colorazione nell'identificare, su vetrini permanentemente montati, cristalli di UMS e di PPCD.

Abbiamo pertanto sottoposto ad artrocentesi delle ginocchia 27 pazienti di cui 21 affetti da artrite acuta da cristalli di CPPD e 6 con un attacco di gotta e ne abbiamo studiato a fresco il LS.

Abbiamo inoltre analizzato 16 LS infiammatori provenienti da pazienti affetti da gonartrite acuta di origine non microcristallina.

Per ogni LS è stato realizzato un vetrino colorato con DQ, successivamente esaminato in cieco sia al microscopio a luce diretta che in luce polarizzata compensata. Un LS in cui fosse chiaramente indicata la presenza di cristalli era giudicato positivo ed in tal caso all'osservatore era richiesto di identificarne il tipo.

Erano quindi valutate la sensibilità, la specificità, l'accuratezza, il valore predittivo positivo e negativo del metodo di colorazione con DQ.

**Parole chiave:** Liquido sinoviale, urato monosodico, pirofosfato di calcio diidrato.

**Key words:** *Synovial fluid, monosodium urate, calcium pyrophosphate dihydrate.*

#### BIBLIOGRAFIA

- Schumacher R Jr, Reginato AJ. Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification 1991 Lea & Febiger-Philadelphia, London.
- Freemont J, Denton J. Atlas of synovial fluid cytopathology 1991 Kluwer academic publishers-Dordrecht Boston, London.
- Pascual E. The diagnosis of gout and CPPD crystal arthropathy. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 306-8.
- Agudelo C. It's the synovial fluid, stupid: the importance of synovial fluid analysis. *J Clin Rheumatol* 1998; 4: 175-176.
- Petrocelli A, Wong AL, Swezy RL. Identification of pathologic synovial fluid crystals on Gram stain. *J Clin Rheumatol* 1998; 4: 103-105.
- Schumacher HR Jr, Sieck SS, Rothfuss S, Clayburne GM, Baumgarten DF, Mochan BS, et al. Reproducibility of synovial fluid analysis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 770-74.
- Schlesinger N, Baker DG, Schumacher HR Jr. How well have diagnostic tests and therapies for gout been evaluated. *Curr Op Rheumatol* 1999; 11: 441-45.
- Cheng PT, Pritzker KPH. The effect of calcium and magnesium ions on calcium pyrophosphate crystal formation in aqueous solution. *J Rheumatol* 1981; 8: 772-82.
- Pascual E, Tovar J, Ruiz MT. The ordinary light microscope: an appropriate tool for detection and identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 983-5.
- Dieppe P, Pascual E, Swann A. The identification of crystals in synovial fluids. The EULAR quality control Initiative Rheumatology in Europe.
- Hasselbacher P. Variation in synovial fluid analysis by hospital laboratories. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 637-42.