

La ricerca dei microcristalli nel liquido sinoviale

Detection and identification of crystals in synovial fluid

F. Oliviero¹, E. Pascual², L. Punzi¹

¹Cattedra e Unità Operativa Complessa di Reumatologia, Università degli Studi di Padova;

²Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

SUMMARY

Synovial fluid analysis for crystals represents one of the most important laboratory test for the evaluation of rheumatic diseases. The identification of monosodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate crystals allows the prompt diagnosis of gout and pyrophosphate crystal-related arthropaties. Crystals are identified based on their shape and birefringence through a polarized light microscope equipped with a first order red compensator. Due to its simple execution and high diagnostic value, this examine should be always performed to complete synovial fluid analysis.

Reumatismo, 2005; 57(3):208-211

Le artriti da microcristalli costituiscono la categoria di artropatie infiammatorie più frequente nella popolazione. È stato osservato che la gotta o artropatia da cristalli di urato monosodico (UMS), colpisce più dell'1% dei maschi adulti e risulterebbe in aumento nei Paesi occidentali (1). La pseudogotta o artropatia acuta da pirofosfato di calcio diidrato (PFCD) è la monoartrite più frequente negli anziani (2).

Inoltre, una varietà di condizioni, non tutte completamente conosciute, possono essere determinate dai microcristalli che si formano nell'ambiente articolare. Per cui, la loro ricerca nel liquido sinoviale (LS) rappresenta uno degli esami più significativi in ambito reumatologico. L'identificazione dei cristalli di UMS e di PFCD permette di diagnosticare rapidamente la gotta e l'artropatia da cristalli di pirofosfato risparmiando il ricorso ad indagini cliniche più complesse, accorciando i tempi d'attesa per il paziente e favorendo l'introduzione tempestiva della terapia.

L'importanza della ricerca dei cristalli è universalmente riconosciuta ed ogni anno vengono promoss-

se, sia a livello nazionale che internazionale, iniziative atte a favorire la pratica dell'analisi del LS (Corso Teorico Pratico sull'Analisi del Liquido Sinoviale, Abbazia di Praglia 2001-2005; Workshop on Synovial Fluid Analysis and Practical Skills, EULAR Congress 2002-2005).

La ricerca dei cristalli nel LS richiede un microscopio ottico a luce polarizzata e compensata e può essere effettuata con facilità dopo un periodo di training relativamente breve. I cristalli di UMS e di PFCD vengono identificati e distinti in base alla loro forma, aspetto, ma soprattutto alla loro birifrangenza.

Raccolta e conservazione del liquido sinoviale

Il liquido sinoviale per la ricerca dei microcristalli deve essere raccolto in una provetta priva di additivi ed esaminato nel più breve tempo possibile. Un ritardo nella lettura del LS può infatti essere causa della dissoluzione dei cristalli di UMS e soprattutto di PFCD, o al contrario, indurre la formazione di artefatti provenienti dalla lisi cellulare (3, 4). Quando non è possibile esaminarlo a fresco, il LS può essere conservato a 4°C per 72h oppure a -80°C per un periodo più lungo (fino a 2 mesi) (5).

L'analisi al microscopio a luce polarizzata

L'analisi dei cristalli richiede un microscopio ottico a luce polarizzata dotato di un polarizzatore e di

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Francesca Oliviero

Cattedra e UOC di Reumatologia

Università di Padova

Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova

francesca.oliviero@unipd.it

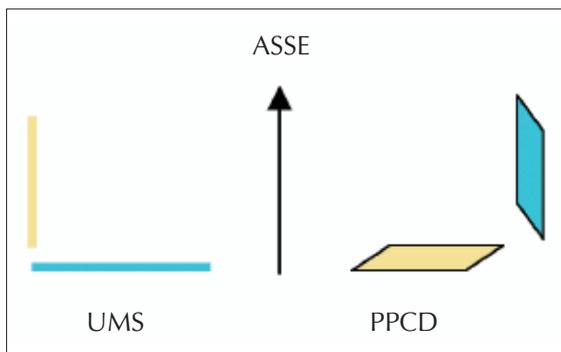


Figura 1 - Rappresentazione schematica del colore dei cristalli di UMS e PPCD alla luce polarizzata e compensata. Il cristallo esibisce colore giallo o blu a seconda dell'orientamento del suo asse maggiore rispetto all'asse del compensatore.

un compensatore rosso di I ordine (6). L'accurata pulizia del vetrino è di fondamentale importanza per eliminare particelle estrinseche birifrangenti che possono inficiare il risultato. Il vetrino viene osservato dapprima alla luce ordinaria che permette di distinguere la forma e la grandezza dei cristalli e poi alla luce polarizzata compensata che ne permette l'identificazione in base alla loro birifrangenza. I cristalli di PFCD e di UMS vengono riconosciuti a seconda della colorazione che sviluppano quando il loro asse maggiore è parallelo all'asse ordinario del compensatore. In figura 1 sono schematizzate le proprietà ottiche dei cristalli di UMS e di PFCD.

I cristalli di UMS

I cristalli di UMS hanno una caratteristica forma allungata, spesso aghiforme, con una lunghezza

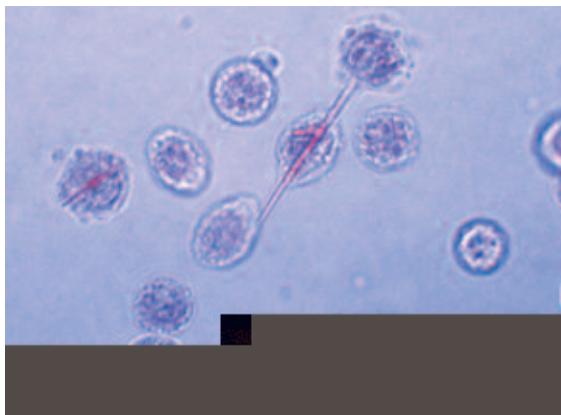


Figura 2 - Cristallo di UMS intracellulare. Luce polarizzata compensata, ingrandimento 40x. La freccia indica l'orientamento dell'asse del compensatore.

che può raggiungere e superare i 40 μm (Fig. 2). Spesso sono intrappolati in maglie di fibrina o frammenti di cartilagine. Alla luce polarizzata appaiono bianchi lucenti e sono facilmente rilevabili. Alla luce polarizzata compensata esibiscono una forte birifrangenza negativa con colori particolarmente vivaci. Nel LS si possono riscontrare degli ammassi tofacei di cristalli di UMS, talvolta in seno a villosità sinoviali o frammenti di tessuto articolare.

Significato clinico

La presenza di cristalli di UMS nel LS permette una diagnosi certa di gotta. Nel corso di un attacco acuto essi sono generalmente numerosi e spesso associati ad una conta cellulare elevata con prevalenza di leucociti polimorfonucleati. Occasionalmente possono essere ritrovati in LS non infiammatori, probabilmente perché aspirati durante la fase intercritica o, in ogni modo, quando l'attacco acuto della malattia è ormai cessato (7).

I cristalli di PFCD

La maggior parte dei cristalli di PFCD presenta una particolare forma "a parallelepipedo" (PFCD monoclini) ma si possono osservare anche forme cuboidi od ovoidali molto piccole (Fig. 3). Più rari sono invece gli aghiformi (PFCD triclino). La loro dimensione varia da 1 a 20 μm . Alla luce polarizzata e compensata esibiscono una debole birifrangenza positiva.

Significato clinico

Il ritrovamento di cristalli di PFCD in un LS infiammatorio è indicativo di una forma acuta di ar-

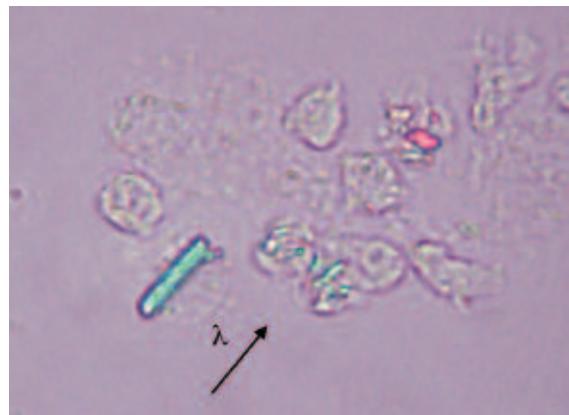


Figura 3 - Cristalli di PFCD intracellulari. Luce polarizzata compensata, ingrandimento 40x. La freccia indica l'orientamento dell'asse del compensatore.

tropatia di PFCD, la cosiddetta “*pseudogotta*”. Se la loro presenza è invece accompagnata da una bassa conta cellulare (in genere <500 cellule/mm³) ci sono due possibilità: una è che possa trattarsi della fase di remissione o “intercritica” di un attacco di pseudogotta, l'altra è che ci troviamo di fronte ad una forma cronica di artropatia da PFCD, generalmente meno intensamente flogistica ed oligoarticolare. Il significato del ritrovamento di tali cristalli nel LS dell'artrosi è ancora dibattuto (8) anche se probabilmente, soprattutto per gli anziani, si possono trovare cristalli di calcio, quali PFCD ed apatite, come risultato di una diminuita capacità di sfavorire il loro deposito da parte della cartilagine invecchiata o degenerata.

I cristalli di fosfato basico di calcio (BCP)

I cristalli di BCP, rappresentati da idrossiapatite, octacalcio fosfato e fosfato tricalcico si ritrovano nella maggior parte dei liquidi artrosici (9). Le loro piccole dimensioni e l'assenza di birifrangenza non ne permettono l'identificazione al microscopio ottico. Possono talvolta aggregare ed apparire debolmente birifrangenti. Anche in questo caso non sono facili da rilevare se non con una colorazione particolare quale il rosso alizarina (Fig. 4) (10).

Significato clinico

La presenza dei cristalli di apatite è associata ad una aumentata degenerazione cartilaginea e ad un più abbondante versamento articolare. Aggregati

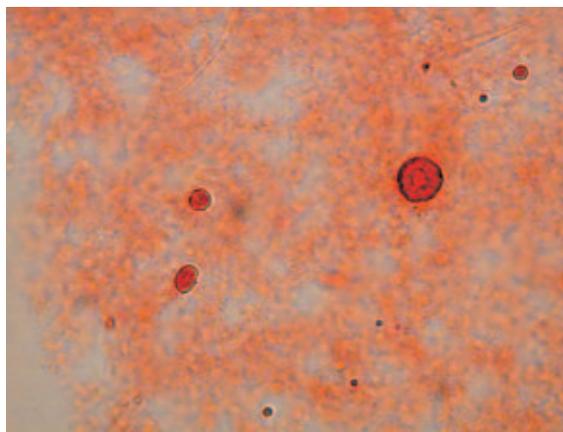


Figura 4 - Colorazione con rosso Alizarina di cristalli di BCP. Luce ordinaria, ingrandimento 40x.

di apatite sono frequentemente riscontrabili nei “*rice bodies*” presenti non solo nei LS di patologie non infiammatorie quali l'OA, ma anche in quello di alcune artriti (11). Non è ancora del tutto chiaro se questi cristalli contribuiscano al danno articolare o siano solo un epifenomeno (12).

Sensibilità dell'analisi del LS per la ricerca dei microcristalli

La sensibilità dell'esame microscopico per la ricerca dei cristalli di UMS e di PFCD è legata essenzialmente alla loro quantità e dimensione. Talvolta la bassa concentrazione e le piccole dimensioni dei cristalli portano a risultati falsi negativi e rendono questo test scarsamente riproducibile (13). Alcuni autori suggeriscono che la ripetizione dell'esame alla luce polarizzata il giorno successivo a quello della raccolta ne migliora la sensibilità analitica e diagnostica soprattutto nel caso di pazienti che presentano evidenze cliniche di artropatia da microcristalli ed esame del LS negativo alla luce polarizzata (14).

La colorazione con rosso Alizarina per la ricerca dei cristalli di BCP è un metodo sensibile ma non è specifico. Falsi positivi possono essere attribuiti a PFCD, ossalato di calcio e altri composti contenenti calcio (15).

Approccio pratico

La procedura più corretta per la ricerca dei cristalli nel LS prevede di esaminare dapprima il vetrino alla luce ordinaria per individuare la loro presenza e subito dopo utilizzare il polarizzatore ed il compensatore per la loro identificazione (16). Il rinvenimento dei cristalli di UMS è agevole salvo rare eccezioni dovute principalmente alle piccole dimensioni dei cristalli. La ricerca dei cristalli di PFCD richiede invece maggiore attenzione a causa della loro debole birifrangenza e della possibilità di confonderne la forma con quella di altri cristalli (ad es. i cortisonici), inclusioni citoplasmatiche o frammenti di fibrina. Alla luce polarizzata infatti appaiono bianchi ma molto meno lucenti rispetto a quelli di UMS. La loro birifrangenza è positiva, ma quando sono troppo piccoli non esibiscono colore o cambiamenti di colore. Inoltre, quando vengono fagocitati la birifrangenza può venire annullata dalle proprietà di rifrazione del citoplasma cellulare e il cristallo diventa così difficile da distinguere (17).

RIASSUNTO

La ricerca dei microcristalli nel liquido sinoviale rappresenta uno degli esami più significativi in ambito reumatologico. Il ritrovamento dei cristalli di urato monosodico e pirofosfato di calcio permette infatti la diagnosi istantanea di gotta e di pseudogotta. L'analisi richiede un microscopio ottico a luce polarizzata dotato di un compensatore rosso di I ordine che consente la distinzione dei cristalli in base alla loro birifrangenza. Vista la relativa semplicità e l'elevata utilità ai fini diagnostici, questo esame dovrebbe sempre essere eseguito a completamento dell'analisi del liquido sinoviale.

Parole chiave - Liquido sinoviale, cristalli, urato monosodico, pirofosfato di calcio, luce polarizzata.

Key words - *Synovial fluid, monosodium urate crystals, calcium pyrophosphate dihydrate crystals, polarized light microscopy.*

BIBLIOGRAFIA

1. Arromdee E, Michet CJ, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabri SE. Epidemiology of gout: is the incidence rising? *J Rheumatol* 2002; 29: 2403-6.
2. Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 427: S6-15.
3. Kerolus G, Clayburne G, Schumacher HR Jr. Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis? *Arthritis Rheum* 1989; 32: 271-8.
4. McGill NW, Swan A, Dieppe PA. Survival of calcium pyrophosphate crystals in stored synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 939-41.
5. Galvez J, Saiz 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; 61: 444-7.
6. Schumacher HR, Reginato AJ. Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification. Philadelphia: Lea et Febiger; 1991.
7. Pascual E, Batlle-Gualda E, Martinez A, Rosas J, Vela P. Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout. *Ann Intern Med* 1999; 131: 756-9.
8. Ryan LM, Cheung HS. The role of crystals in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1999; 25: 257-67.
9. Molloy ES, McCarthy GM. How crystals damage tissue. *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: 228.
10. Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 191-200.
11. Li-Yu J, Clayburne GM, Sieck MS, Walker SE, Athreya BH, DeHoratius RJ, et al. Calcium apatite crystals in synovial fluid rice bodies. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 387-90.
12. McCarthy GM. Crystals in arthritis: new age nonsense or novel therapeutic target? *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 723.
13. Rosenthal AK, Mandel N. Identification of crystals in synovial fluid and joint tissues. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3: 11-6.
14. Yuan S, Bien C, Wener MH, Simkin P, Rainey PM, Astion ML. Repeat examination of synovial fluid for crystals: is it useful? *Clin Chem* 2003; 49: 1562-3.
15. Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 191-200.
16. Pascual E, Jovani V. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19: 371-86.
17. Ivorra J, Rosas J, Pascual E. Most calcium pyrophosphate crystals appear as non-birefringent. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 582-4.