



ORIGINAL

¿Es útil la reevaluación de cristales en el líquido sinovial?

Ester Mena Pérez, Mar Muñoz Pérez* y Carmen Hernando de Larramendi Martínez

Laboratorio de Bioquímica, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid, España

Recibido el 9 de marzo de 2011; aceptado el 5 de abril de 2011

Disponible en Internet el 2 de julio de 2011

PALABRAS CLAVE

Líquido sinovial;
Microcristales

Resumen

Introducción: El recuento celular, el análisis de cristales y el estudio microbiológico del líquido sinovial (LS), son piezas claves en el diagnóstico y manejo del derrame articular pues conducen a decisiones clínicas y terapéuticas. El análisis de cristales suele realizarse en campo claro y con luz polarizada compensada (LPC). Depende de la experiencia del examinador y del número de cristales presentes. Para aumentar el rendimiento, se puede analizar el sedimento tras centrifugación. Hay autores que sugieren que la maduración *in vitro* de los cristales facilita su identificación tras 24 horas de la extracción. Otros sugieren que dicha demora deteriora la muestra. Nuestro objetivo es valorar si el re-examen del LS a las 24 horas puede aumentar el rendimiento diagnóstico para cristales.

Material y métodos: Se analizaron durante 4 meses las muestras de LS remitidas para su análisis con LP y microscopía de campo claro; se realizó reevaluación a las 24 horas en todos los casos posibles.

Resultados: Recibimos 174 LS, de los cuales 138 (79,3%) fueron negativos para el primer análisis y 36 positivos. En 84 casos (60,8%) se pudo realizar una evaluación a las 24 horas. En 10 casos (11,9%) se observaron cristales que no habían sido vistos en el primer análisis. Siempre se trató de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado. El incremento de muestras positivas tras el segundo examen fue de un 27,8% (IC 95%: 13,1-42,4).

Conclusión: El reanálisis de cristales en LS a las 24 horas debe considerarse en los casos de sospecha de artropatía microcristalina con primer examen negativo.

© 2011 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Synovial fluid;
Microcrystal

Reassessment of crystals in synovial fluid: Is it helpful?

Abstract

Background: White blood cell counts, analysis of crystals in synovial fluid (SF) and microbiological studies are key measurements in the diagnosis and management of joint effusion. The results may lead to clinical and therapeutic decisions. The diagnosis of crystals in SF, usually performed by examination with compensated polarised light microscopy (PL), is not easy. It depends on the experience of the examiner and amount of crystals in the sample, which is

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmunoz.hsvo@salud.madrid.org (M. Muñoz Pérez).

sometimes very small. In order to increase the performance, analysis may be performed on the sediment after centrifugation. Some authors suggest that due to *in vitro* maturation of crystals, they can be more easily identified 24 hours after extraction. Others suggest that the sample deteriorates. We question whether re-examination of SF can increase the diagnostic yield of this test.

Methods: Over a 4 month period we analysed crystals in SF received in the laboratory using a PL and ordinary light microscopy. Where this was possible, the SF was examined again after 24 hours.

Results: We received 174 SF; 138 (79.3%) were negative for the first analysis. In 84 cases (60.8%) a re-evaluation could be made after 24 hours by trained staff. In 10 cases (11.9%) crystals that had not been seen previously became apparent. In all cases they were calcium pyrophosphate dihydrate crystals. The number of positive fluids increased by 27.8% (95% CI: 13.1-42.4) after a second assay.

Conclusions: The re-analysis of crystals in SF at 24 hours should be considered in cases of high suspicion of microcrystalline arthropathy when the first test is negative.

© 2011 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El estudio del líquido sinovial (LS) es una pieza clave en el diagnóstico de las artritis microcristalinas¹⁻⁴, que debe llevarse a cabo por personal especialmente formado para ello^{2,5-7}. Su examen, con microscopio de luz ordinaria (MO) y con luz polarizada compensada (LPC), permite el diagnóstico y seguimiento de enfermedades como la gota, producida por depósito de cristales de urato monosódico (UM), o la condrocalcinosis, originada por depósito de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado (PFC)^{3,4}. La detección de cristales de UM es más sencilla. Aparecen en forma de agujas y, con LPC, siempre presentan intensa birrefringencia con elongación negativa. Por el contrario, los cristales de PFC son más difíciles de identificar^{2,3,8}. Se presentan en forma de paralelepípedos y bastones, que pueden o no ser birrefringentes. Si lo son, mostrarán elongación positiva. Otros tipos de cristales son, o menos frecuentes como los de oxalato cálcico, o más frecuentes, aunque difíciles de identificar, como los cristales básicos de calcio⁹.

No observar cristales en un LS no descarta la existencia de enfermedad por microcristales. En la literatura se encuentran datos contradictorios sobre la llamada maduración *in vitro* de cristales del LS. Algunos estudios¹⁰ afirman que tras 24 horas de la toma de muestra, conservada a 4 °C, se observan más cantidad de cristales (tanto de UM como de PFC) que en la primera revisión del líquido. Se reproduciría *in vitro* un proceso similar al de la maduración *in vivo* de los cristales¹¹. Otros autores sugieren que el almacenamiento del LS en estas condiciones conduce a la degeneración paulatina de los cristales⁴. McGill et al¹², tras un estudio prolongado durante 8 semanas, constatan una disminución no significativa en la cantidad de cristales observados. Gálvez et al¹³, realizaron un estudio en el que se revisaron los LS a las 24 y 72 horas, y a los dos meses. Este grupo no encontró diferencias en las primeras revisiones, mientras que a los dos meses, observaron un aumento del número de cristales extracelulares de UM, y una disminución de cristales intracelulares de PFC.

El objetivo de este trabajo es comprobar si el examen 24 horas después de la recepción de la muestra, permite aumentar el porcentaje de muestras positivas para cristales

en líquidos sinoviales, que previamente fueron considerados como negativos.

Material y métodos

El estudio se realizó sobre las muestras de LS recibidas para análisis entre el 19 de julio y el 15 de noviembre de 2010. Se recogió la edad y sexo de cada paciente. Los LS fueron examinados de modo habitual, realizando, además de otras determinaciones, recuento en cámara de Fuchs-Rosenthal, estimación del porcentaje de polimorfonucleares mediante tinción rápida con violeta de metilo, y examen de cristales tanto a MO como con LPC indistintamente por dos examinadores expertos. Las muestras se almacenaron, una vez analizadas y centrifugadas, a 2-8 °C durante 24 horas, momento en que volvió a realizarse un nuevo examen para cristales del sedimento de las muestras que habían sido negativas, siempre que fue posible. Todos los procedimientos realizados para este estudio cumplieron las normas éticas del centro.

Análisis estadístico

La edad y el recuento de leucocitos se describen como media e intervalo de confianza del 95% (IC 95%). El análisis de las diferencias se realizó mediante la *t* de Student. El sexo, los polimorfonucleares y la presencia de cristales en el LS fueron descritos con su porcentaje y el IC 95% del porcentaje. Su análisis estadístico se efectuó con la prueba de la χ^2 . La significación estadística fue establecida en $p < 0,05$. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 (Chicago, USA).

Resultados

En el período de tiempo del estudio se recibieron 174 líquidos sinoviales para examen, correspondientes a una población formada por 70 hombres (40,2%; IC 95%: 32,9-47,5) y 104 mujeres (59,8%; IC 95%: 52,5-67,1) con edad media de 60,1 años (IC 95%: 57,5-62,8). De ellos, 36 fueron positivos en el primer examen (tabla 1). Los positivos

Tabla 1 Resumen de resultados del primer análisis (N = 174)

	Positivos N = 36 (20,7%) IC 95%: 14,7-26,7	Negativos N = 138 (79,3%) IC 95%: 73,3-85,3	Significación
Edad media (años) (IC 95%)	66,9 (62,8-71)	58,4 (55-61,5)	p = 0,01
Mujeres % (IC 95%)	52,8 (36,5-69,1)	61,2 (53-69,2)	ns
Leucocitos ($10^9/L$) (IC 95%)	13,1 (5,5-20,7)	4,6 (2,5-6,7)	p = 0,003
PMN (%) (IC 95%)	60,5 (44,2-76,7)	44,3 (36,4-52,3)	ns (p = 0,06)
Cristales UM (%) (IC 95%)	33,3 (17,9-48,7)	—	—
Cristales PFC (%) (IC 95%)	66,7 (51,3-82,1)	—	—

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; PFC: pirofosfato cálcico; PMN: polimorfonucleares; UM: urato monosódico.

correspondieron a 27 pacientes. Siete pacientes fueron analizados 16 veces, bien por remitirse varias muestras en un mismo episodio, o por tratarse de varios episodios diferentes. La concordancia entre los dos examinadores que estudiaron indistintamente las muestras, fue del 100%, tanto para cristales de UM (n = 6) como de PFC (n = 10).

En 54 casos, de los 138 LS negativos en el primer examen, no pudo realizarse el segundo examen, por muestra insuficiente o por falta de examinadores experimentados. En 84 casos se reevaluó el LS (tabla 2) observando 10 casos positivos. Estos 10 nuevos casos encontrados en el segundo examen, supondrían un 26,4% de positivos de entre todos los líquidos analizados (36 + 10), e implican un incremento del 27,8% en el número de LS positivos para cristales. Todos los cristales observados fueron de PFC, aunque en 8 casos en pequeño número, es decir, sólo visibles en algunos campos.

El incremento de muestras positivas tras el segundo examen fue del 27,8% (IC 95%: 13,1-42,4) es decir, el número de positivos aumentó de 36 a 46.

Discusión

Nuestros hallazgos muestran que un segundo examen del LS a las 24 h de recibir la muestra, incrementa el rendimiento diagnóstico casi un 30% (10 positivos más, frente a 36 iniciales). La frecuencia de PFC aumenta con la edad⁸ y se cree que la presencia de cristales básicos de calcio existe hasta en el 60% de los LS⁹. Por esta razón, es lógico que la mayor parte de los cristales observados lo sean de PFC. Sin embargo, su frecuencia suele ser subestimada, posiblemente por su dificultad para ser detectados ya que solo un

20% de éstos son birrefringentes^{1-4,7,14}. En nuestro caso, la población con cristales en el primer examen tenía una edad significativamente mayor (tabla 1). Curiosamente, la edad media de los positivos en el segundo examen presenta una clara tendencia a ser menor en los positivos. No sabemos cuál puede ser la explicación de este hallazgo.

El recuento celular fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con cristales, lo cual refuerza la asociación entre artropatía microcristalina e inflamación articular^{1,4}. En el segundo examen, sin embargo, no existe diferencia significativa en el recuento celular en ambos grupos, posiblemente debido al tamaño de la muestra, aunque se observa una tendencia clara a presentar recuentos superiores en el grupo de positivos con predominio de PMN.

Podríamos pensar que la utilidad del examen para cristales en LS tiene valor sólo en el caso de articulaciones inflamadas. De hecho, para algunos cristales, como los básicos de calcio, existen opiniones contradictorias^{2,9}. En general se subraya la importancia de este análisis en toda artropatía no diagnosticada^{3,4}, aunque se detecten en muy escasa cantidad y en líquidos no inflamatorios (menos de 3×10^9 leucocitos/L)¹. Su presencia en estos últimos puede indicar la existencia de inflamación subclínica⁷ que, unida a otros hallazgos radiológicos o clínicos, puede constituir una clave diagnóstica y modificar la actitud terapéutica².

El correcto análisis de cristales requiere un examen primero en campo claro, y luego con luz polarizada compensada^{1,3,4}. La microscopía de contraste de fases también puede ser útil³. El tamaño, entre 1-20 μm para PFC y entre 2-30 μm para UM⁹, puede justificar que en

Tabla 2 Resumen de resultados del segundo análisis (a las 24 horas) de cristales en líquido sinovial N = 84

	Positivos N = 10 (11,9%) IC 95%: 5-18,8	Negativos N = 74 (88,1%) IC 95%: 81,2-95	Significación
Edad media (años) (IC 95%)	45,2 (31,4-59)	58,1 (53,5-62,6)	ns p = 0,05
Mujeres % (IC 95%)	50 (19-81)	64,9 (54-75,7)	ns
Leucocitos ($10^9/L$) (IC 95%)	7,1 (0,7-13,4)	3,5 (1,4-5,5)	ns
PMN (%) (IC 95%)	62,8 (32,6-92,9)	37,1 (26,4-47,7)	ns (p = 0,05)
Cristales UM (%) (IC 95%)	0	—	—
Cristales PFC (%) (IC 95%)	100	—	—

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; PFC: pirofosfato cálcico; PMN: polimorfonucleares; UM: urato monosódico.

ocasiones, no sean vistos durante el primer examen². Sin embargo, algunos autores creen que al igual que ocurre *in vivo* con los cristales, puede producirse una maduración *in vitro* de los mismos^{11,15}.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Yuan et al en su estudio¹¹, que pasan de 23 positivos iniciales a 30 tras el segundo examen a las 24 horas (30,4%). Es interesante que, en nuestro caso, todos los cristales detectados fueron de PFC, mientras que Yuan et al, detectan más de 50% de UM. Esta diferencia en la distribución del tipo de cristales observados puede tener relación con la mayor dificultad para observar los de PFC.

Es tentador afirmar que se produce maduración *in vitro* de los cristales, pero existen otras razones que pueden justificar el aumento significativo del porcentaje de positivos en el análisis repetido a las 24 horas, ya que el procedimiento supone un tiempo doble de observación de la muestra y, en la mayoría de los casos, este segundo análisis se realiza sobre el sedimento^{1,3}. Cualquiera de estos dos factores puede aumentar el rendimiento del estudio ya que al tratarse de cristales pequeños y frecuentemente no birrefringentes, pueden no haber sido vistos en el primer examen. De hecho, en 8 de los 10 positivos, el número de cristales observados a las 24 horas fue escaso.

Los resultados obtenidos nos hacen reflexionar sobre la importancia de prolongar el tiempo dedicado al examen de cristales. Incluso con personal entrenado, es posible que en un primer análisis no se detecten todas las muestras positivas, especialmente si los cristales son de PFC.

Las limitaciones de nuestro estudio son varias. En primer lugar el pequeño tamaño global de la muestra no permite generalizar sus observaciones. Por otro lado, aunque nuestra concordancia es elevada, es cierto que uno de los examinadores formó al otro, por lo que los errores en identificación podrían haberse transmitido entre ellos. Pese a todo, la validez de la formación viene avalada por la validación clínica de los resultados informados en más de 10 años. En nuestro caso, el número de líquidos sinoviales remitidos al laboratorio para examen es muy superior al descrito por algunos autores (1-3, 9/mes)¹⁴.

Como conclusión, creemos que es conveniente realizar la reevaluación a las 24 horas de la extracción del líquido, tal y como se ha procedido en este estudio, si en una primera observación presentan un resultado negativo. También es adecuado realizar este análisis de cristales sobre el

sedimento de la muestra^{1,3}, con especial atención en los casos de alta sospecha de artropatía microcristalina.

Bibliografía

1. Comisión de magnitudes relacionadas con la urgencia médica (SEQC). Recomendaciones para el estudio del líquido sinovial. *Química Clínica*. 2004;26:434-8.
2. Dieppe P, Swan A. Identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:261-3.
3. Pascual E, Jovani V. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2005;19:371-86.
4. Sholter D, Shmerling R, Romain D. Synovial Fluid analysis and the diagnosis of septic arthritis. UpToDate review literature 18.2 mayo 2010 [acces 16/12/10]. [updated 20/9/2007]. Available in: <http://uptodate.com>.
5. Mc Gill N, York H. Reproducibility of synovial fluid examination for crystals. *Aus NZ J Med*. 1991;21:710-3.
6. Lumbreras E, Pascual F, Frasset J, González-Salinas J, Rodríguez E, Hernández-Aguado I. Analysis of crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:612-5.
7. Chen L, Schumacher R. Current trends in crystal identification. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18:171-3.
8. Rosenthal A. Calcium crystal deposition and osteoarthritis. *Rheum Clin Dis N Am*. 2006;32:401-12.
9. Yavorsky A, Hernández-Santana A, McCarthy G, McMahon G. Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis - analytical approaches and challenges. *Analyst*. 2008;133:302-18.
10. Oliviero F, Pascual E, Punzi L. Detection and identification of crystals in synovial fluid. *Reumatismo*. 2005;57:208-11.
11. 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.
12. McGill NW, Swan A, Dieppe PA. Survival of calcium pyrophosphate crystals in stored synovial fluid. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1991;50:939-41.
13. 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;61:444-7.
14. 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;61:493-8.
15. Gordon C, Swan A, Dieppe P. Detection of crystals in synovial fluids by light microscopy: sensitivity and reliability. *Ann Rheum Dis*. 1989;48:737-42.