

# Mikroskopering av kristaller i synovialvätska

Arbetsbeskrivning för undersökningen Sy-Kide-O (2055)

Jenny Sabel

Examensarbete för (YH)-examen inom social- och hälsovård

Utbildningen för Bioanalytiker

Vasa 2019



## EXAMENSARBETE

Författare: Sabel Jenny  
Utbildning och ort: Bioanalytiker, Vasa  
Handledare: Ribacka Camilla, Salminen Jukka

Titel: Mikroskopering av kristaller i synovialvätska

---

Datum: 11.11.2019    Sidantal: 34    Bilagor: 5

---

### Abstrakt

Identifikationen av natriumuratkristaller och kalciumpyrofosfat i synovialvätska är diagnostiserande för gikt och CPPD. Det har diskuterats över huruvida analystekniken är den bästa för diagnostisering av kristallartrit, eftersom analyskänsligheten varierar beroende på analyserarens kunskap och erfarenhet samt på den skolningen som analyseraren har fått i ämnet.

Examensarbetet handlar om kristallerna i synovialvätska och identifiering av dessa på ett korrekt sätt. Examensarbetes syfte är att utveckla en arbetsbeskrivning för laboratoriet på Vasa centralsjukhus, för att fler av personalen ska kunna analysera kristallerna. I och med att kunnigheten och erfarenheten bland laboratoriepersonalen ökar förkortas svarstiden och patienten får snabbare vård.

Arbetet är gjort som en litteraturoversikt där främst vetenskapliga artiklar och studier har använts och utifrån den litteratur har en arbetsbeskrivning utvecklats. I arbetsbeskrivningen har tagits med ett steg som hittills inte använts på Vasa centralsjukhus, nämligen centrifugeringen av synovialvätskan innan analyseringen. Centrifugeringen ökar antalet kristaller i den mängd synovialvätska som analyseras.

---

Språk: Svenska    Nyckelord: kristall, synovialvätska, ledvätska, natriumurat, kalciumpyrofosfat, polarisationsmikroskop

---

## OPINNÄYTETYÖ

Tekijä: Sabel Jenny  
Koulutus ja paikkakunta: Bioanalyttikko, Vaasa  
Ohjaajat: Ribacka Camilla, Salminen Jukka

Nimike: Nivelnesteiden kiteiden mikroskopointi

---

Päivämäärä: 11.11.2019 Sivumäärä: 34

Liitteet: 5

---

### Tiivistelmä

Natriumuraattikiteiden ja kalsiumpyrofosfaattikiteiden tunnistaminen nivelnesteessä on diagnostinen löydös kihdille sekä pseudokihdille. Analyysitekniikan luotettavuudesta kideartriitin diagnosoimisessa on keskusteltu, sillä tutkimusherakkyys vaihtelee riippuen analysoijan osaamisesta, kokemuksesta sekä siitä koulutuksesta, jonka analysoija on aiheesta saanut.

Tämä opinnäytetyö käsittelee nivelnesteiden kiteitä sekä niiden oikeaa tunnistamista. Opinnäytetyön tavoite on kehittää työohje Vaasan keskussairaalan laboratorioon, jotta useampi laboratorion henkilökunnasta voisi analysoida kiteet. Laboratorion henkilökunnan lisääntyvän osaamisen sekä kokemuksen myötä vastausaika lyhentyy ja potilas saa hoitoa nopeammin.

Työ on tehty kirjallisuuskatsauksena, käyttäen pääasiassa tieteellisiä kirjoituksia sekä tutkimuksia. Kirjallisuuden perusteella työohje on kehitetty. Työohjeeseen on lisätty vaihe, jota tähän saakka ei ole käytetty Vaasan keskussairaalan laboratoriossa, nimittäin nivelnesteiden sentrifugointi ennen analysointia. Sentrifugointi lisää kiteiden määrää siinä nivelnesteessä, jota analysoidaan.

---

Kieli: Ruotsi Avainsanat: kide, nivelneste, polarisaatiomikroskooppi, natriumuraatti, kalsiumpyrofosfaatti

---

## BACHELOR'S THESIS

Author: Sabel Jenny  
Degree Programme: Bachelor of Health Care, Biomedical  
Laboratory Scientist, Vaasa  
Supervisors: Ribacka Camilla, Salminen Jukka

Title: Identification of crystals in synovial fluid using a microscope

---

Date: 11.11.2019 Number of pages: 34 Appendices: 5

---

### Abstract

The identification of monosodium urate crystals and calcium pyrophosphate crystals in synovial fluid is diagnostic for gout and calcium pyrophosphate deposition disease (CPPD). It has been discussed whether the technique for analysing the crystals is the best alternative, since the sensitivity varies depending on the analyser's amount of knowledge and experience but also on the practice the analyser has got in the matter.

This thesis is about the crystals in synovial fluid and how to identify these correctly. The aim of this thesis is to develop an instruction of how to analyse the crystals to be used at the laboratory at Vaasa central hospital. With this instruction the amount of personnel capable of analysing the crystals increase and thus the amount of time analysing the samples decreases, and the patient receives treatment faster.

This thesis is made as a literature review, using mostly scientific articles and studies. The instruction was made based on this literature. A section of the instruction, previously not included in crystal identification at Vaasa central hospital, was added. This section being the centrifugation of the sample before analysing. Centrifugation of the sample increases the amount of crystals in the synovial fluid analysed.

---

Language: Swedish Key words: crystals, monosodium urate, calcium pyrophosphate, synovial fluid, polarizing microscope

---

# Innehållsförteckning

1	Introduktion .....	1
2	Syfte och frågeställning.....	3
3	Metod och genomförande .....	3
4	Teoretisk bakgrund .....	5
4.1	Gikt och <i>Calcium pyrophosphate disease</i> (CPPD).....	5
4.2	Synovialvätska.....	7
4.3	Urinsyra.....	8
4.4	Kalciumpyrofosfat.....	9
4.5	Polarisationsmikroskop.....	9
4.6	Kristaller i synovialvätska.....	11
4.6.1	Natriumuratkristaller .....	11
4.6.2	Kalciumpyrofosfatkristaller .....	15
4.7	Undersökningen Sy-Kide-O (2055).....	18
5	Bedömning av undersökningen Sy-Kide-O .....	18
5.1	Provmaterial och förberedelser .....	18
5.2	Mikroskopering.....	22
5.3	Positiva fynd.....	23
5.4	Andra kristaller och fynd.....	24
5.5	Artefakter .....	27
6	Resultat och tolkning .....	29
7	Arbetsbeskrivning för mikroskopering av kristaller i synovialvätska.....	29
8	Kritisk granskning och diskussion .....	34
	Litteraturförteckning .....	35
	Figurförteckning .....	37
	Bilagor .....	39

## 1 Introduktion

Identifikation av natriumuratkrystaller och kalciumpyrofosfatkrystaller i synovialvätska taget ur inflammerade leder är diagnostiserande för gikt och CPPD (*calcium pyrophosphate deposition disease*, tidigare känt som pseudogikt). Krystallerna har olika dubbelbrytningskaraktär och de analyseras under polarisationsmikroskop. Flera studier har visat att identifieringen av krystallerna inte är konsekvent bland laboratoriepersonalen. Detta förklaras med att tekniken för analys kanske inte är tillräckligt bra eller laboratoriepersonalens felbedömning, som då kan bero på personalens bristande skolning för krystallanalys. (Lumbreras, et al., 2005).

Natriumuratkrystallerna i synovialvätska från giktpatienter med akut artrit, identifierades under ljusmikroskop först av Joseph Hollander, och senare 1961 under polarisationsmikroskop av Daniel McCarty. Kalciumpyrofosfatkrystallerna upptäcktes av Daniel McCarty, när han undersökte synovialvätska från patienter med misstänkt gikt. (Pasqual, et al., 2011).

Krystallanalys ur synovialvätska har sedan dess introduktion fått lite uppmärksamhet och proceduren har hållits relativt oförändrad. Det största problemet med krystallartritdiagnostisering är att analyseringen av synovialvätska ofta förbises. Detta eftersom dessa sjukdomar är välkända sedan antiken och man fortsättningsvis ofta diagnostiserar utgående från endast kliniska symtom. Inom reumatologin anses nu krystallidentifiering ur synovialvätska som väsentligt, både av American College of Rheumatology och av European Union of Medical Specialists (EUMS). (Pasqual, et al., 2011).

Ett ledpunktprov kan innehålla en hel del olika krystaller och detta leder ofta till olika sorters felbedömningar; falskt negativa, falskt positiva och fel klassificering av krystallerna. Detta tyder på att tekniken som används vid bedömning av synovialvätska har sina brister. Punktproven kan ha låg koncentration av krystaller vilket förklarar falskt negativa svar. Falskt positiva kan bero på att den som analyserar provet klassificerar artefakter som natriumuratkrystaller eller kalciumpyrofosfatkrystaller, detta är då en fråga om yrkesskicklighet mer än brister i tekniken. Ofta är det kalciumpyrofosfatkrystallerna som ställer till med problem, jämfört med natriumuratkrystaller (Boumans, et al., 2017). Tillförlitligheten går att åtgärda med ett bra mikroskop, skolning för dem som kommer analysera punktproven samt övning med hjälp av kvalitetskontroller. Än så länge är

polarisationsmikroskop det enda praktiska sättet att analysera kristaller i synovialvätska. (Pasqual, et al., 2011; Dieppe & Swan, 1999). Även på Vasa centralsjukhus är det polarisationsmikroskop som används vid analysering av kristaller i synovialvätska. Detta arbete kommer utmytna i en arbetsbeskrivning för undersökningen Sy-Kide-O (2055) för att sedan finnas till hands vid polarisationsmikroskopet i Vasa centralsjukhus laboratorium.

## 2 Syfte och frågeställning

Syftet med detta arbete är att göra en litteraturstudie angående kristaller i synovialvätska. Med resultatet från den litteratur som kommer användas görs en kort arbetsbeskrivning som kan användas bredvid mikroskopet i urinlaboratoriet där provet av synovialvätska ska analyseras, för att hjälpa bioanalytikerna vid bedömning av synovialvätskan.

Just nu är det få bioanalytiker och laboratorieskötare som vet hur provet av synovialvätska ska bedömas. Med bättre kunskap kunde fler bedöma synovialvätskan och svarstiden kunde förkortas, vilket leder till fortare vård för patienter hos vilka kristaller i synovialvätskan uppkommit.

Examensarbetet kommer att ta ställning till vad som klassas som ett positivt fynd. Det kommer att ta ställning till hur många kristaller som ska finnas i provet för att det ska klassas som positivt fynd. Vidare kommer arbetet även ta ställning till vilka kristalltyper som associeras till gikt och vilka som räknas till CPPD. Förutom detta ska arbetet svara på om det finns andra kristaller som liknar de som är diagnostiserande för gikt och CPPD och som inte ska räknas som positivt fynd.

## 3 Metod och genomförande

Detta arbete är gjort som en systematisk litteratursökning genom att läsa vetenskapliga artiklar och olika vetenskapliga studier inom området. Källor som använts är skrivna på svenska, finska och engelska. De flesta källor är från 2000-talet med undantag av några från sent 1980-tal och 1990-tal. Metoderna för analyseringen av synovialvätska är den samma i alla källor, d.v.s. med mikroskop. Databaser som jag har sökt källor från är PubMed, Google Scholar, Elsevier, PMC, BMJ. Jag har även använt mig av sökmotorerna Google och Bing.

Sökord som använts är: gikt, pseudogikt, urinsyra, gikt-kristaller, ledvätska, synovialvätska, natriumurat, kalciumpyrofosfat, gout, crystals, synovial fluid, monosodium urate, calcium pyrophosphate, CPPD, pseudogout, kihti, valekihti, pseudokihti, nivelneste, kihtikide, hyperurikemia, joint fluid samt olika kombinationer av dessa sökord.

Vissa sökord ensamma är inte tillräckligt specifika vilket ger ett stort antal träffar, och behövde specificeras, då med tilläggsord eller genom att byta ordning på sökorden. Sökordet ”synovial fluid” till exempel är ett brett sökord vilket även syns i träffarna i PubMed.



Träffarna med detta sökord är tiotusental. För att begränsa träffarna valdes att endast visa artiklar som kunde läsas gratis i sin helhet, d.v.s. ”free full text”. Träffarna blev nu tusental, vilket är en minskning men fortfarande för stort antal träffar. För att vidare begränsa och hitta artiklar som har att göra med kristaller i synovialvätska lades ordet ”crystals” till efter ”synovial fluid”. Detta ger ett hundratal artiklar som kan läsas i sin helhet. Som vidare begränsning valdes att endast visa artiklar med synovialvätska i människan, som då ger ett antal färre artiklar. Många av artiklarna behandlar andra analyseringsmetoder av kristaller i synovialvätska, så som datortomografi eller elektronmikroskop. Ett stort antal artiklar behandlade leukocyterna i synovialvätskan, trots sökordet ”crystals”. Många artiklar hade engelsk rubrik men själva innehållet var på ett annat språk.

Sökord som ”synovial fluid crystals” gav olika resultat beroende på vilken sökmotor som användes, vilket kunde utnyttjas för att hitta fler artiklar att användas i arbetet. Ordningen på orden kunde vändas så som ”crystals synovial fluid”, och användning av dessa sökord i olika sökmotorer gav olika resultat på sökningen.

## 4 Teoretisk bakgrund

Den teoretiska bakgrunden i detta arbete behandlar sjukdomarna gikt och CPPD samt orsakerna bakom dessa. Förutom detta förklaras kort synovialvätskan och dess egenskaper. Vidare behandlas urinsyrans och kalciumpyrofosfatets kemiska egenskaper samt hur dessa bildas. Här finns även beskrivet hur polarisationsmikroskopet fungerar. Slutligen under teoretisk bakgrund behandlas kristallerna i synovialvätska, uppdelat i natriumuratkristaller och kalciumpyrofosfat samt själva undersökningen som arbetet handlar om.

### 4.1 Gikt och *Calcium pyrophosphate disease* (CPPD)

Gikt beror på att urat, d.v.s. urinsyra, kristalliseras i leder och ibland även i andra vävnader. Kristallerna orsakar en smärtfylld inflammationsreaktion. Urat bildas ur puriner som en produkt av ämnesomsättningen. Urat som härstammar från purin elimineras ur kroppen via urinen. Vid för stor uratbildning i kroppen bildas gikt, och uratmängden kan mätas genom blodprov, P-Uraat. Endast förhöjda uratnivåer i kroppen räcker inte för giktdiagnos, eftersom många har förhöjda nivåer utan giktsymtom. En slutgiltig giktdiagnos får man genom att under mikroskop leta efter gikt-kristaller i ledvätskan, som aspirerats ur den sjuka leden. Människan kan få för mycket urat genom födan som en produkt av ämnesomsättningen, urat kan sluta utsöndras i urinen, eller så kan bildning av urat öka till följd av olika ämnesomsättningsstörningar. Män har naturligt större urathalt än kvinnor, vilket även ses i att fler män insjuknar i gikt. Förhöjd uratmängd leder inte alltid till gikt, men ju större mängd desto oftare leder det till gikt. (Mustajoki, 2018).

Gikt förekommer som tidvis sjuka ledinflammationer, oftast i stortåleden. De börjar plötsligt, oftast nattetid och smärtan ökar inom ett halvt dygn. I samband med gikt kan det förekomma måttlig feber. En nattlig giktattack beror ofta på intag av en måltid som innehåller mycket puriner, efter stort alkoholintag, eller efter fysisk ansträngning. I början av sjukdomen håller besvären i sig några dagar, men om sjukdomen upprepas blir besvären mer utdragna. Leden där gikten finns är röd och mycket öm. Förutom stortåleden brukar gikt visa sig ofta i knän och vristen. Vid obehandlad, långvarig gikt kan sjukdomen bli kronisk, då förblir lederna uppsvullda och sjuka även när ett giktanfall inte håller på. Det kan även bildas sjuka bölder under huden. (Mustajoki, 2018).

Faktorer som påverkar uratnivåerna och leder till gikt är många. Alkohol gör att uratnivåerna stiger, och 2–4 portioner alkohol dagligen fördubblar risken för gikt. Övervikt är en annan faktor, då särskilt magfetma, eftersom detta också ökar bildningen av urat. Födoämnen som

innehåller mycket puriner är en viktig faktor när det kommer till vad som orsakar gikt, sådana födoämnen är t.ex. lever, sardiner, strömming, broilerskinn, kaviar, kräftdjur, nöt-, gris-, fågel- och viltkött, ärter, bönor, svampar och sojaprodukter. Läkemedel så som diuretika minskar utsöndringen av urat i urinen och ökar därmed risken för att insjukna i gikt, speciellt hos äldre. Personer som dricker mycket sötade drycker, både med vanligt socker och med fruktos, insjuknar oftare i gikt. Även genetiken spelar en roll i insjuknandet i sjukdomen. (Mustajoki, 2018).

Gikt kan, i färre än 10% av fallen, leda till ett kroniskt tillstånd som utvecklas till tofus eller tofi; ett tillstånd där natriumuratkristaller ses som en utfällning i huden (se figur 1) (Dehlin, 2018). Natriumuratkristallerna bildar då fasta avlagringar i leder, brosk, senor, ben och mjuk vävnad (Newberry, et al., 2016).

Vid CPPD (tidigare pseudogikt) är leden som insjuknar oftast knä, handled, axel, armbåge eller vrist. Symtomen är de samma som vid gikt. (Rigsbee, et al., 2018). Kristallerna skiljer sig beroende på vilken sjukdom som det gäller, vid gikt uppkommer natriumuratkristaller i ledvätskan och vid CPPD uppkommer pyrofosfatkristaller (Julkunen, 2017). CPPD drabbar män och kvinnor lika ofta och riskfaktorer för insjuknande är främst åldern, men även osteoartros, ledskador och ledoperationer medför risk för insjuknande i CPPD. CPPD har även ett samband med metaboliska och endokrina sjukdomar, så som hemokromatos (en autosomt recessiv järnupplagringssjukdom som leder till för stor järnupplagring), primär hyperparatyreos (ökad utsöndring av parathormon från paratyreoideakörtlar som leder till hyperkalcemi, d.v.s. för stora värden kalcium) och hypomagnesemi (magnesiumbrist), men deras patogena mekanismer (sjukdomsalstrande mekanismer) är oklara. Patienter med dessa sjukdomar har förhöjd risk att utveckla CPPD. (Ivory & Velázquez, 2012). Att sjukdomen finns i familjen medför även risk för att själv insjukna i sjukdomen (Rigsbee, et al., 2018). Andra sjukdomstillstånd som tros ha ett samband med CPPD är hypotyreos (för liten produktion av tyroxin T4 och trijodtyronin T3), gikt och Wilsons sjukdom (autosomt recessiv sjukdom som ger för liten utsöndring av koppar i gallan). Patienter med CPPD utvecklar inte tofi. Patienter med CPPD har normala nivåer urat i plasma, förutom om patienten har sjukdomen i samband med gikt eller hyperurikemi. (Ivory & Velázquez, 2012).



**Figur 1: Tofi på öra. Ett kroniskt tillstånd där det skett en utfällning av natriumuratkristaller i huden. (Dehlin, 2018)**

## 4.2 Synovialvätska

Synoviala leder anses vara de huvudsakliga funktionella lederna i kroppen. Ledkapseln omges av fibrös bindväv, som sitter fast i benen som omger kapseln. Ledkapseln är fylld med synovialvätska som utsöndras ut det synoviala membranet (synovium) som omger insidan av ledkapseln. Hyalint brosk formar ledbrosket som täcker ändorna på benen. Synoviala leder indelas i sex olika klassifikationer enligt vilken typ av rörelse de tillåter. (Juneja & Hubbard, 2018). Synovialvätska (även kallat ledvätska eller synovia) är ett transudat av plasma. Det ger näring åt och smörjer ledbrosket. (Faryna & Goldenberg, 1990). Ordet synovial härstammar från grekiskans ord *syn* och *ovum*, som betyder "vitt ägg". Kristaller i synovialvätska uppkommer p.g.a. flera orsaker. Dessa kan enligt Judkins & Cornbleet (1997) vara:

- Kristallisering p.g.a. en förhöjd koncentration av ett ämne i plasma, som ger en hög koncentration i leden
- Kristallformation från en degenerativ process i samband med ben- eller broskkalcifiering
- Introducering av ämnen så som kortikosteroider direkt i leden.

### 4.3 Urinsyra

Urinsyra ( $C_5H_4N_4O_3$ ) är en heterocyklisk organisk förening med molekylmassan 168 Daltons. Flera enzymer är inblandade i omvandlingen av de två purinnukleinsyrorna, adenin och guanin, till urinsyra. Adenosinmonofosfat (AMP) omvandlas till inosin genom två mekanismer; antingen genom att först avlägsna en aminogrupp med hjälp av enzymet deaminas och bilda inosinmonofosfat (IMP), följt av defosforylering med nukleotidas för att bilda inosin, eller genom att först avlägsna en fosfatgrupp med hjälp av nukleotidas för att bilda adenosin, följt av deaminering för att bilda inosin. Guaninmonofosfat (GMP) omvandlas till guanosin med hjälp av nukleotidas. Nukleotiderna inosin och guanosin omvandlas vidare till purinbaserna hypoxantin och guanin med hjälp av enzymet purinnukleosidfosforylas (PNP). Hypoxantin oxideras och bildar xantin med hjälp av xantinoxidas. Guanin deamineras och bildar xantin med hjälp av guanindeaminas. Xantin oxideras än en gång och bildar den slutliga produkten urinsyra. (Jin, et al., 2012).

Adenin och guanin omvandlas till urinsyra

Adenosinmonofosfat (AMP) → deaminering → inosinmonofosfat (IMP) →  
defosforylering → inosin

**Eller**

Adenosinmonofosfat (AMP) → defosforylering → adenosin → deaminering →  
inosin

Inosin → defosforylering → hypoxantin

Hypoxantin → oxidering → xantin

Guaninmonofosfat (GMP) → deaminering → guanosin

Guanosin → defosforylering → guanin

Guanin → deaminering → xantin

Xantin → oxidering → Urinsyra

Fysiologiskt är urinsyra en svag syra med syrakonstanten 5,8. Urinsyra existerar mest som saltet av urinsyra; urat. När urinsyrakoncentrationen ökar i blodet bildas kristaller. Urinsyran

löser sig dåligt i vatten och hos människor är koncentrationen av urinsyra i blod nära vattenlösligheten på 377,4  $\mu\text{mol/l}$ . När urinsyranivån stiger högre än 377,4  $\mu\text{mol/l}$  bildas kristaller av natriumurat som orsakar gikt. (Jin, et al., 2012).

Urat filtreras fritt i glomerulus men reabsorberas så gott som fullständigt till blodcirkulationen genom proximala tubuli. Urat försvinner ur människokroppen främst genom njurarna och den största delen sker genom aktiv utsöndring genom tubulus. (Julkunen & Konttinen, 2010).

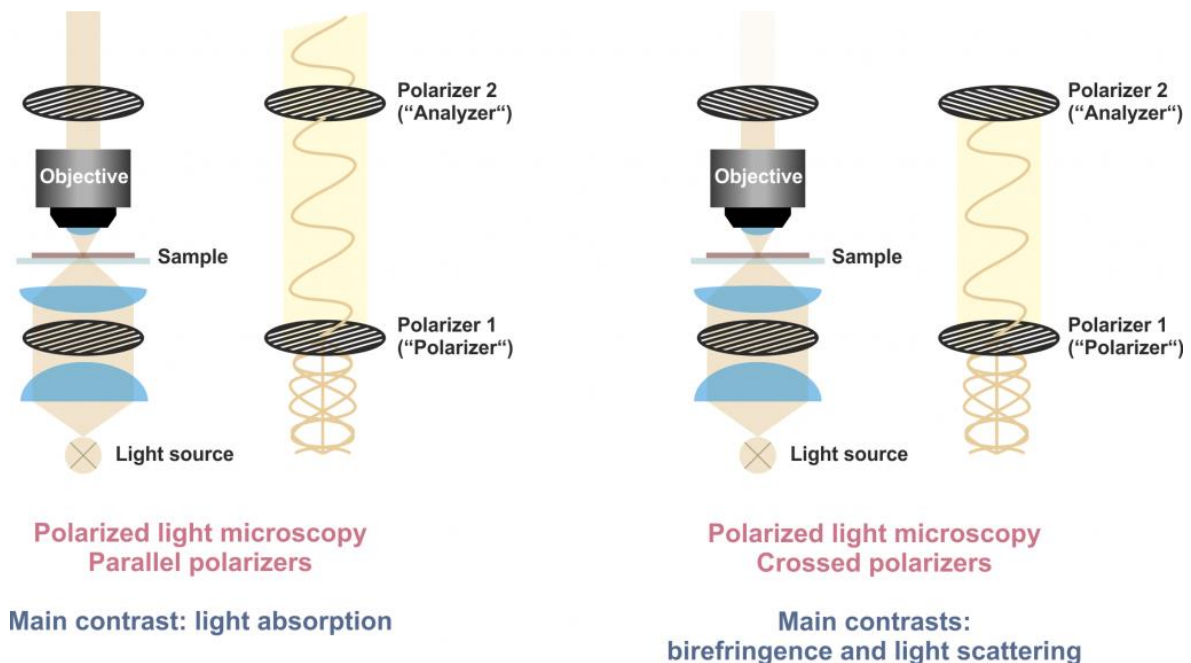
#### 4.4 Kalciumpyrofosfat

Kalciumpyrofosfat ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) uppkommer vid förhöjda halter av oorganisk pyrofosfat (PPi). Hydrolys av adenosintrifosfat (ATP) genererar energi och bildar oorganisk pyrofosfat (PPi), som samlas i broskets extracellulära matrix. Nedbrytningen av PPi katalyseras av oorganisk pyrofosfatas. Nybildning och nedbrytningen av PPi bör vara i balans för att upprätthålla homeostas av ämnet. Förhöjd produktion eller försämrad nedbrytning av PPi i brosk gör att överlopps PPi binder med kalcium och leder till utfällning av kalciumpyrofosfatkristaller i ledvävnad. (Iqbal, et al., 2019).

#### 4.5 Polarisationsmikroskop

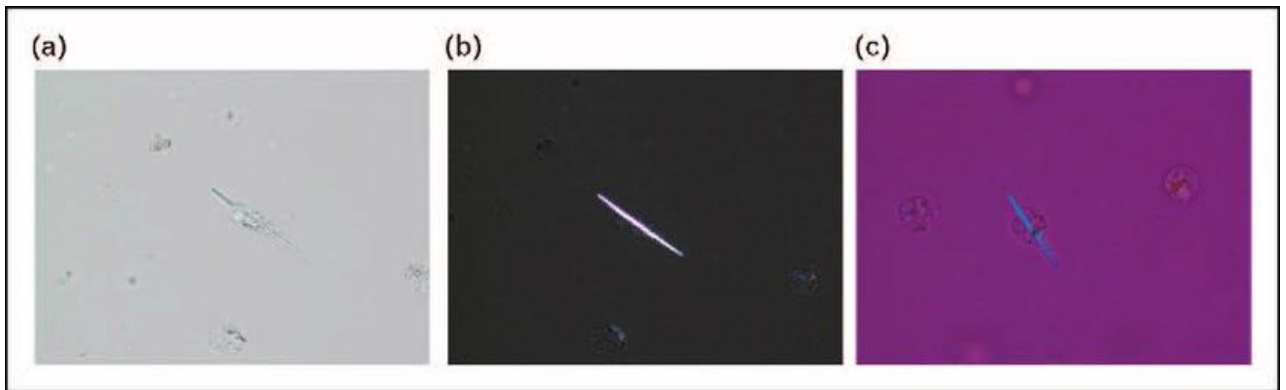
Polarisationsmikroskop används i kristallanalysering främst p.g.a. att dubbelbrytningen hos kristallerna kan ses i polariserat ljus (Dieppe & Swan, 1999). Polarisationsmikroskop är ett standard mikroskop med två polaroidfilter. Det ena filtret läggs ovanför preparatet under okularen och detta kallas analyseraren. Det andra filtret, som går att rotera, läggs under preparatet ovanför ljuskällan och kallas för polariseraren. Båda filtren tillåter ljus i endast en riktning att passera. Om det undre filtret roteras så att det ligger vinkelrätt med det övre filtret, kommer ljuset som kommer genom polariseraren blockeras av analyseraren och betraktaren ser ett mörkt fält. När ett preparat innehållande kristaller läggs ovanför polariseraren kommer kristallen att bryta ljusvågen, vilket tillåter ljuset att passera analyseraren och kristallen syns då som ett skinande objekt mot en mörk bakgrund (se figur 2). Ovanför polariseraren läggs en s.k. röd kompensatorplatta (engelska: *First-order red compensator*, finska: *punalevy*). (Judkins & Cornbleet, 1997). Den röda kompensatorplattan adderar en våglängd mellan den ordinära och den extraordinära ljusstrålen som passerar genom kompensatorplattan, när det dubbelbrytande objektet lysas upp av linjärt polariserat ljus. Den ordinära ljusstrålen följer de vanliga brytningslagarna (den formel som används

för att beräkna vinklarna vid ljusbrytning då ljus färdas mellan två medier med olika brytningsindex), medan den extraordinära ljusstrålen ligger i ett plan som är parallellt med kristallens huvudaxel. Ljusvågen är vinkelrät mot analyseraren och absorberas alltså av analyseraren, medan de andra ljusvågorna inte absorberas fullständigt och slipper genom analyseraren, vilket resulterar i den magentaröda bakgrunden. (Davidson, 2015). Färgen på kristallen och dess direktion avgörs av den röda kompensatorplattans tillverkare och fastslår kristallens dubbelbrytning. En kristall med negativ dubbelbrytning, så som natriumurat är i linje så att den långsamma axeln på kompensatorplattan är parallell med kristallens långa axel. Efter att ljuset passerat genom kristallen är det svagare än när det nådde kristallen, vilket ses som att kristallen är gul mot den magenta bakgrunden. Om kompensatorplattan svängs  $90^\circ$  blir ljuset motsatt, d.v.s. blått. (Judkins & Cornbleet, 1997).



**Figur 2:** Bilden till vänster beskriver hur polariseraren konverterar vitt ljus till linjärt polariserat ljus. Analyseraren och polariseraren ligger parallellt. Bilden till höger beskriver hur ljuset ändras när analyseraren ligger i  $90^\circ$  vinkel mot polariseraren, då kommer endast ljuset som ändrat polarisationsriktning när den träffat objektet igenom. Amorfa delar av objektet är mörka medan kontrasten av kristaller och små partiklar förstärks, vilket kan ändra polariseringsljuset tack vare dubbelbrytning eller ljusspridning. (Schmid, 2016)

Polarisationsmikroskop användes första gången för identifiering av kristaller i synovialvätska i början av 1960-talet och blev snabbt det rekommenderade mikroskopet för kristallanalys (Gordon, et al., 1989).



Figur 3: (a, b) Kristall under vanligt ljus och enkelt polariserat ljus, (c) en blå kristall parallell med kompensatorplattan, samt en gul intracellulär kristall till höger (Dieppe & Swan, 1999)

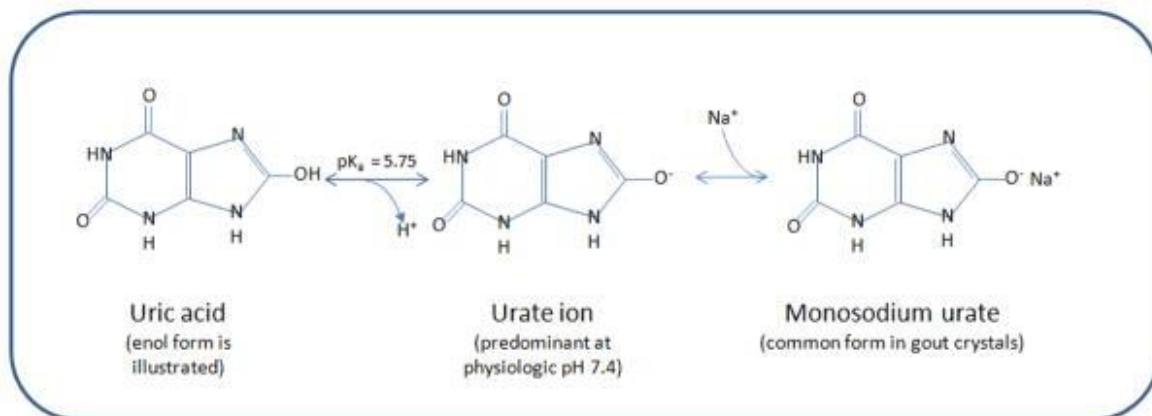
## 4.6 Kristaller i synovialvätska

I detta kapitel behandlas kristaller som kan finnas i ett synovialvätskeprov. Natriumuratkristallerna och kalciumpyrofosfatkristallerna är de enda kristallerna som klassas som positivt fynd i undersökningen Sy-Kide-O.

### 4.6.1 Natriumuratkristaller

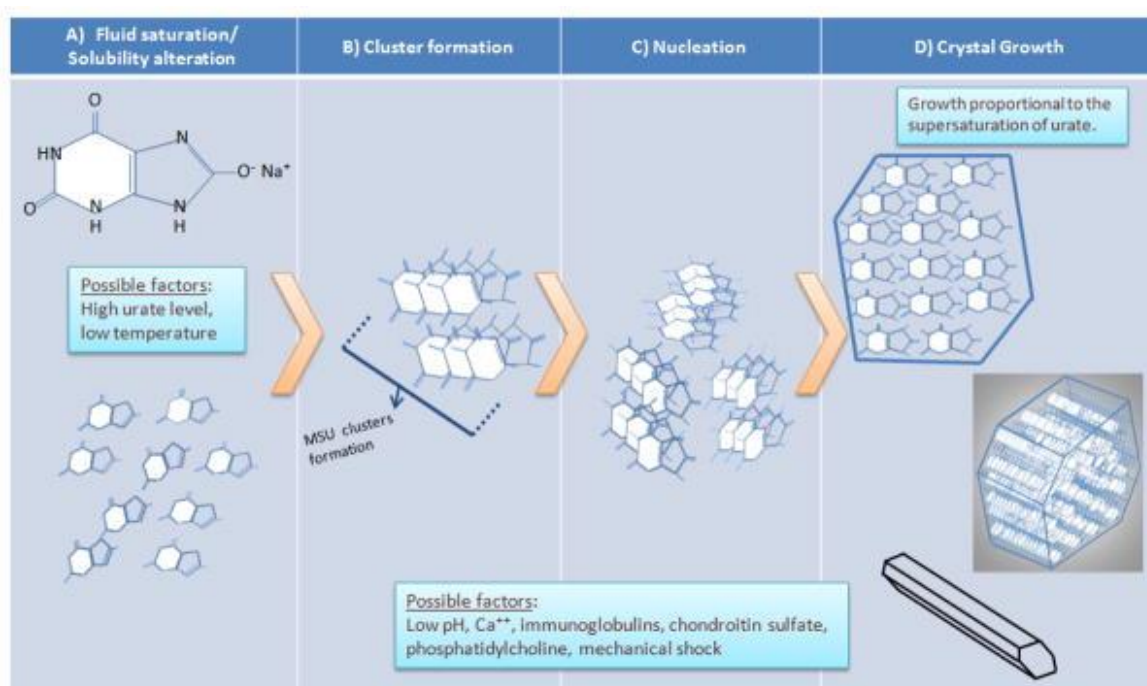
Det är inte väl känt var den kritiska gränsen mellan hyperurikemi och den inflammatoriska reaktionen, d.v.s. bildandet av natriumuratkristaller i synovialvätska går. Hyperurikemi är väsentligt i bildandet av kristaller, men endast en bråkdel av patienter med hyperurikemi utvecklar gikt. (Martillo, et al., 2015).





**Figur 4: Bildning av natriumuratkristaller ur urinsyra. Urat är predominant när det fysiologiska pH-värdet är 7,4 och temperaturen  $37^\circ\text{C}$ . Urat slås ihop med natrium som bildar den mindre lösliga saltformen natriumurat. (Martillo, et al., 2015)**

Bildningen av natriumuratkristaller i synovialvätska beror på så väl uratkoncentrationen som på andra faktorer, t.ex. temperaturen. Plasmat är saturerat med urat när uratnivån når löslighetsnivån på  $405 \mu\text{mol/l}$ . I fall koncentrationen stiger över denna nivå anses lösningen översaturerad. När lösningen är översaturerad börjar natriumuratkristallformationen med en fortsatt förändring i lösligheten av urat och kristallformationen sprider sig fortsättningsvis beroende på lokala tillstånd. Processen för ny mikrokristallutfällning, nukleation, är det långsammaste skedet i natriumuratkristallbildningen. Som princip hopar sig molekylerna i lösningen under nukleation och bildar således kristallkärnan (figur 5). När kristallkärnan blir tillräckligt stor och dess primitiva struktur är tillräckligt stabil sker kristallens storleksökning snabbast vid dess longitudinella ändor. Det är detta anlag till storleksökning vid ändorna som ger natriumuratkristallerna dess karaktäristiska nålformade utseende. (Martillo, et al., 2015).

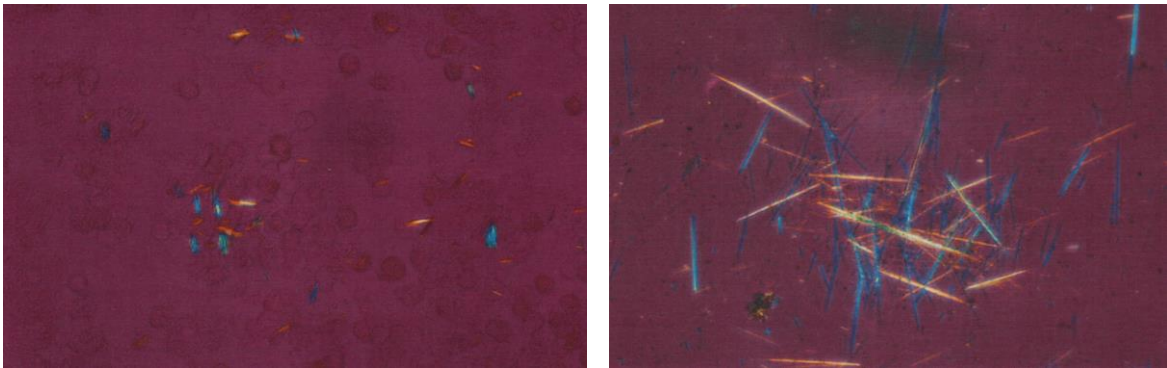


**Figur 5:** Hypotetisk modell av kirstallisering och nukleationsprocessen i en kristall. Natriumuratmolekyler är lösliga så länge saturationen inte överskrids eller temperaturen minskar. Molekylerna börjar då hopa sig och bildar kristallkärnan och slutligen kristallen. (Martillo, et al., 2015)

In vitro studier har visat att en temperaturminskning på endast 2°C från 37°C till 35°C är tillräckligt för att minska löslighetspunkten hos urat från 405 µmol/l till 357 µmol/l. Det här tros vara varför metatarsophalangealleden (stortåleden) är den vanligaste punkten för gikt, eftersom området har mindre värmeproduktion och utsätts oftare för temperaturskillnader. (Martillo, et al., 2015).

Även en sur miljö har visat sig att underlätta natriumuratkristallformation. I en in vitro studie sänktes pH och det visade sig att nukleationen av natriumuratkristaller främjades av pH-sänkningen, oklart hur exakt. pH hade även effekt på kristalliseringen genom att öka kalciumjonkoncentrationen, som sänkte lösligheten hos natriumurat och stödde nukleation. Studiens författare föreslog därför att ökade nivåer av fria Ca<sup>2+</sup> joner i samband med lågt pH, kan förklara förhållandet mellan sura miljöer och natriumurat nukleation. Acidosis förekommer vid fysisk ansträngning och alkoholanvändning, varav båda kan ge upphov till gikt. Systemisk acidosis minskar även utsöndringen av urat genom urin, vilket leder till hyperurikemi som kan ge upphov till gikt. Även den metaboliska aktiviteten hos neutrofiler under fagocytos av existerande kristaller, kan utsöndra mjölksyra som sänker synovialvätskans pH, som stöder kristallformation. (Martillo, et al., 2015).

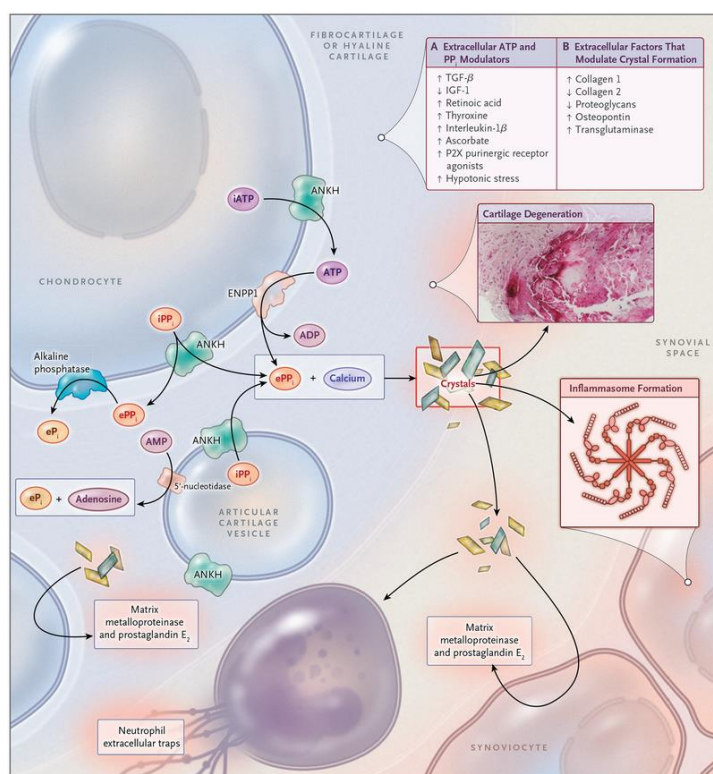
Natriumuratkristallerna har en triklinisk struktur (den har tre axlar som är olika långa som skär varandra i olika vinklar). Makroskopiskt ses strukturen som en välkänd nålformad kristall av natriumurat. (Martillo, et al., 2015). Gikt-kristallerna av natriumurat har negativ dubbelbrytning (ett optiskt fenomen som gör att saker ses dubbelt genom kristallen) (Rigsbee, et al., 2018). Natriumuratkristallerna ses som gula när de ligger parallellt med den optiska axeln och blåa när de ligger vinkelrätt (Rosenthal & Lawrence, 2016). Natriumuratkristallerna är 8-10 $\mu$ m långa (Judkins & Cornbleet, 1997).



**Figur 6: Till vänster måttligt av natriumuratkristaller och till höger rikligt av natriumuratkristaller. (Kouri, 2001)**

## 4.6.2 Kalciumpyrofosfatkristaller

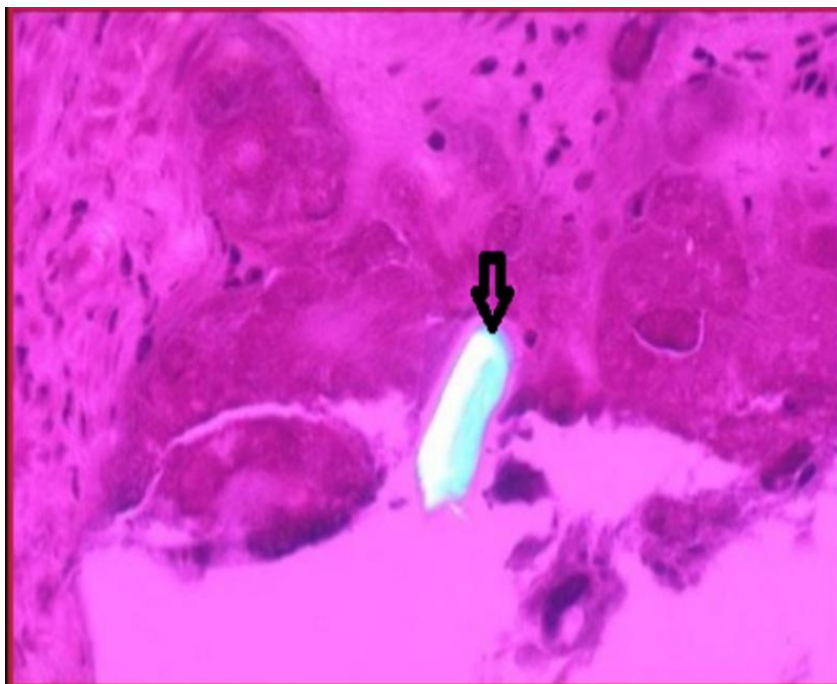
Kalciumpyrofosfatkristaller bildas i det pericellulära matrixet, d.v.s. den tunna hinna som omger kondrocyterna i brosket. Kondrocyterna bildar stora mängder av extracellulärt oorganiskt pyrofosfat som används i bildandet av kalciumpyrofosfatkristaller, och pericellulära vesiklar (broskvesiklar) som fungerar som ställen för kristallformation. Pyrofosfat (PPi) genereras från extracellulärt ATP och bildar komplex med kalcium för att bilda kalciumpyrofosfatkristaller. Oorganiskt pyrofosfats betydelse i utveckling av CPPD kan jämföras med betydelsen av urat i utvecklingen av gikt. Mängden oorganiskt pyrofosfat regleras av ett membranprotein kallat ANKH (ett protein som kodas av ANKH genen på den femte kromosomen). Extracellulärt ATP metaboliseras till oorganiskt pyrofosfat av enzymer som har nukleosid trifosfat pyrofosfohydrolasaktivitet, så som ektonukleotid pyrofosfatas 1. Alkalisk fosfatas och andra pyrofosfataser bryter ner oorganisk pyrofosfatas. Figur 7 visar den här processen. Tillväxtfaktorer, cytokiner och vissa farmakologiska faktorer reglerar nivåerna av pyrofosfatas i brosk. (Rosenthal & Lawrence, 2016).



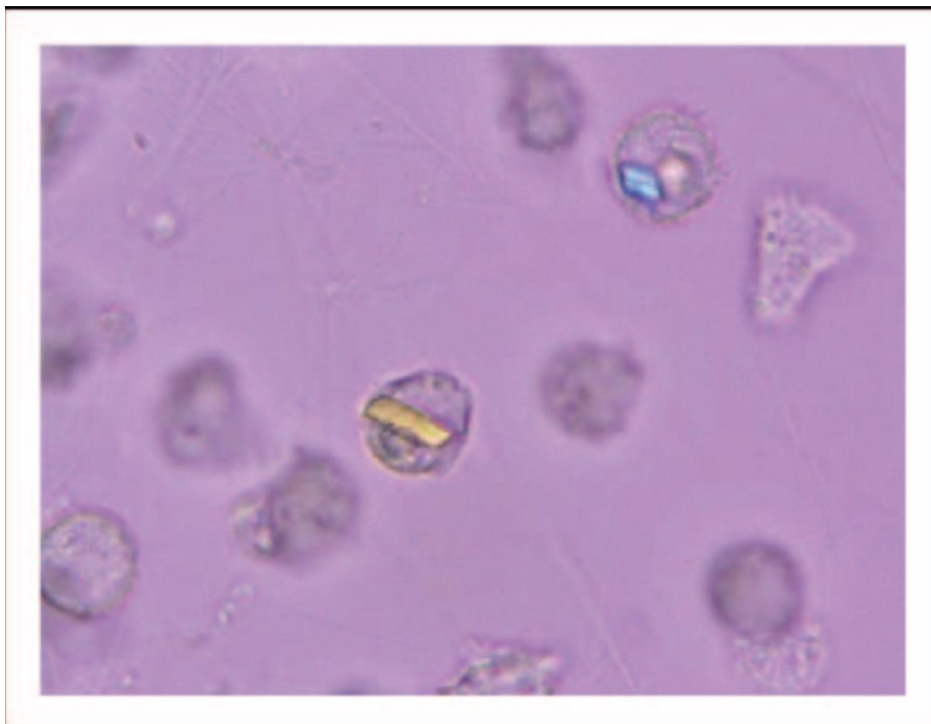
Figur 7: Patofysiologiska egenskaper hos CPPD. (Rosenthal & Lawrence, 2016)

CPPD-kristallerna av kalciumpyrofosfat har en svag dubbelbrytning sett i polarisationsmikroskop, till skillnad från gikt-kristallerna av natriumurat. Kristallerna är formade som romber, d.v.s. en parallelogram med oliklånga sidor och vinklar som inte är

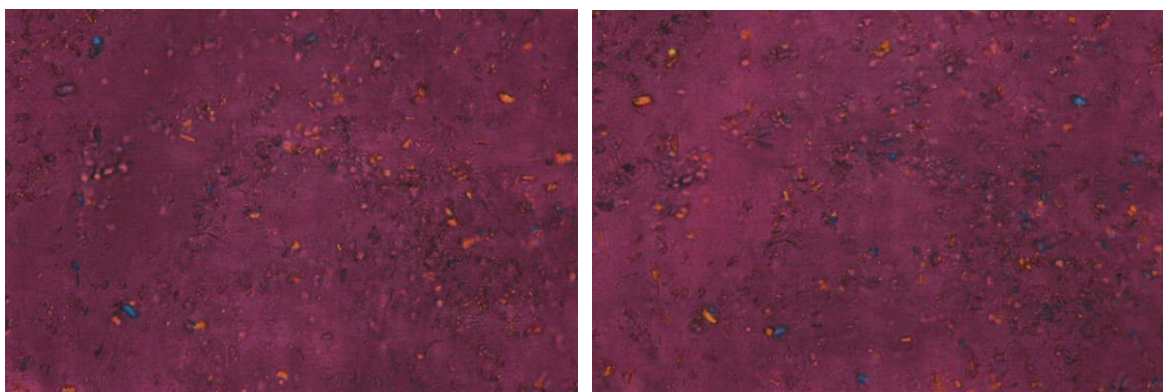
räta. (Rigsbee, et al., 2018). De kan även ses som rektanglar och stavar med triklina strukturer (Ryu, et al., 2014). Under polarisationsmikroskop, som ofta använder rött filter, ses kristallerna som blåa när de ligger parallellt med den optiska axeln och gula när de ligger vinkelrätt, d.v.s. motsatta färger till natriumuratkristallerna. Identifikationen av kristallerna kan vara svår eftersom kristallerna är små och ofta har mycket svag dubbelbrytning. Kristallerna har lika stor diagnostisk betydelse om de är intracellulära eller extracellulära. (Rosenthal & Lawrence, 2016). Kalciumpyrofosfatkristaller kan även ses i vanligt ljusmikroskop, eftersom deras dubbelbrytning är så pass svag eller så har de ingen dubbelbrytning alls (endast 20% av kalciumpyrofosfatkristaller visar dubbelbrytning). Eftersom kristallerna ofta ligger intracellulärt är det viktigt att noggrant se igenom cellerna i preparatet, vilket således är enklare i vanligt ljusmikroskop. (Lumbreras, et al., 2005). CPPD-kristallerna är under 10 µm långa (Judkins & Cornbleet, 1997).



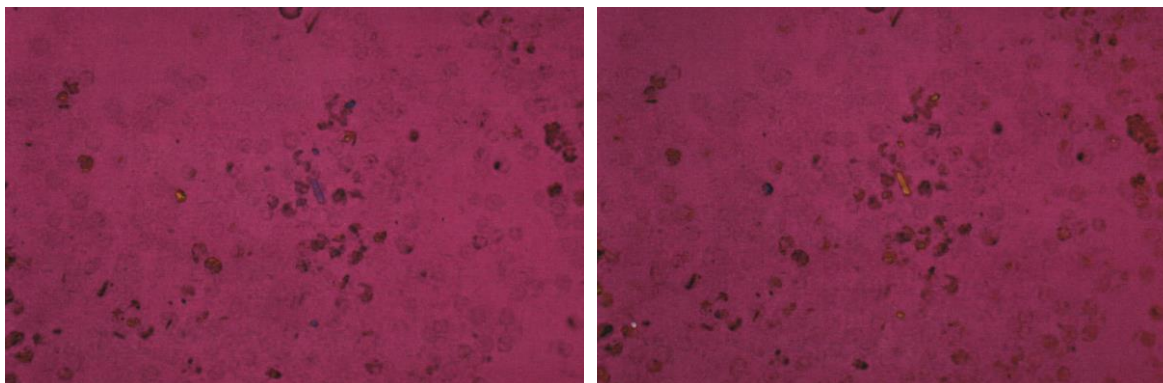
**Figur 8: Kalciumpyrofosfatkristall med svag dubbelbrytning sett under polariserat ljus (Iqbal, et al., 2019)**



**Figur 9: CPPD-kristaller under kompenserat polariserat ljus, 1000x förstoring. (Dieppe & Swan, 1999)**



**Figur 10: Rikligt av kalciumpyrofosfatkristaller. Samma synfält med olika vinkel på kompensatorplattan. (Kouri, 2001)**



**Figur 11: Få kalciumpyrofosfatkristaller. Samma synfält med olika vinkel på kompensatorplattan (Kouri, 2001)**

## 4.7 Undersökningen Sy-Kide-O (2055)

Undersökningen utförs ur synovialvätska aspirerat ur ledkapseln. Den utförs i urinlaboratoriet på Vasa centralsjukhus med indikationen att diagnostisera gikt och pseudogikt. Referensvärdet är negativt. Positiva fynd svaras med utlåtande vilken sorts kristall som hittats i provet. (Salminen, 2004). Undersökningens namn och undersökningsnummer är det samma i hela Finland (Kuntaliitto, 2018). Kommunförbundet fungerar som intressebevakare, utvecklingspartner och erbjuder informationstjänster för Finlands kommuner och städer, som är medlemmar i Kommunförbundet. (Kuntaliitto, u.å.).

## 5 Bedömning av undersökningen Sy-Kide-O

Under detta kapitel behandlas hurudant provmaterial som behövs samt hur detta ska förberedas för analysering. Här beskrivs även studien från Nederländerna år 2017 om hur kristallmängden i det prov som ska analyseras ökar efter centrifugering. Centrifugeringen kommer tilläggas som ett steg i arbetsbeskrivningen. Mikroskoperingen av provet behandlas samt andra kristaller och artefakter som även kan finnas i synovialvätska.

### 5.1 Provmaterial och förberedelser

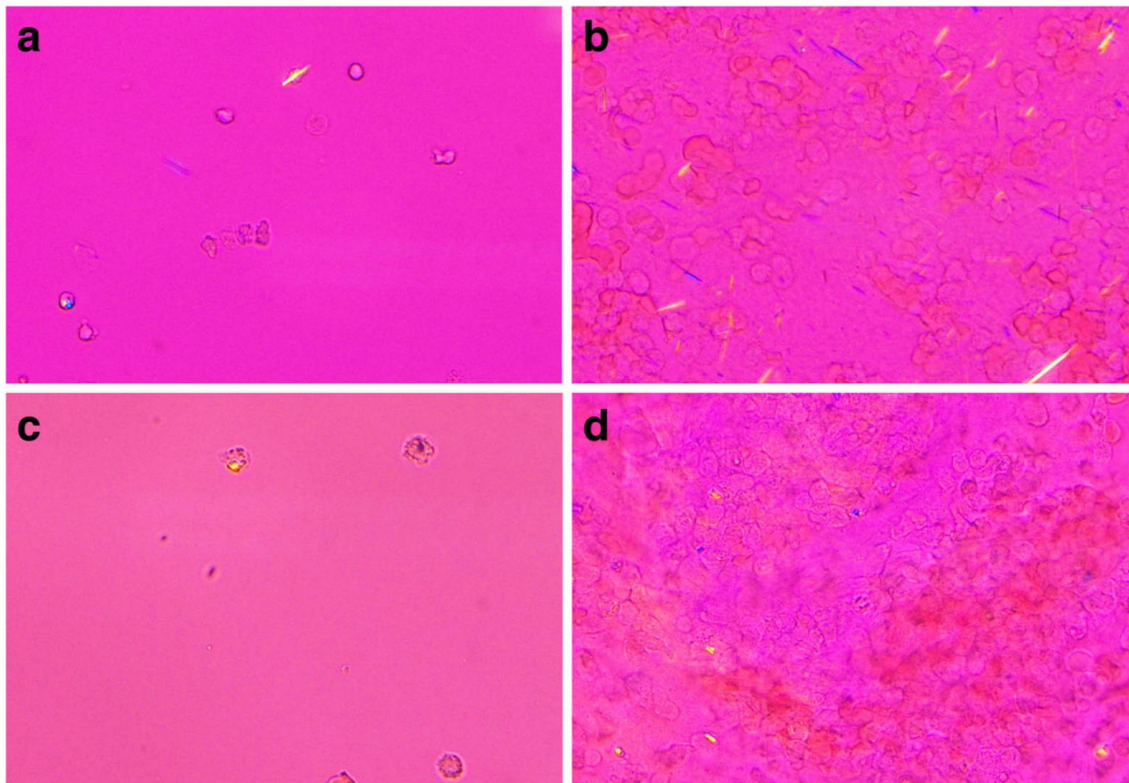
Provet tas i ett 4 ml gelfritt heparinrör. Provmängden synovialvätska ska vara minimum 1 ml. En läkare aspirerar provet sterilt ur en led och för över provmaterialet i heparinröret. Provet förs till laboratoriets provmottagning och bedöms inom en vecka från att provet anlät till laboratoriet. (Salminen, 2004). EDTA-rör lämpar sig inte som transportrör för provmaterialet eftersom EDTA löser upp pyrofosfatkristaller och differentiering av CPPD misslyckas (Dehlin, 2018).

Synovialvätskan ska analyseras färsk. Färsk synovialvätska blir snabbt dålig och borde därför analyseras samma dag som provet tagits. Eftersom kristallerna ofta finns intracellulärt i celler i synovialvätskan (t.ex. i leukocyter) är det viktigt att cellerna bibehålls. Både kalciumpyrofosfatkristallerna och natriumuratkristallerna håller sig i kylskåps- eller frystemperatur, enligt Pasqual et al. (2011) ett dygn, men ju fortare proven analyseras desto mindre cellförfall som stör analyseringen. (Pasqual, et al., 2011).

Boumans et al. gjorde år 2017 i Nederländerna en studie om hur centrifugering av synovialvätska innan kristallanalys påverkade analyseringen. Två erfarna analysutförare

gick igenom synovialvätska från patienter med artritiska leder både före centrifugering och efter centrifugering av proven. Analysutförarna visste inte om patienternas diagnoser. Centrifugering gjordes med en konventionell laboratoriecentrifug. Proven som inte centrifugerades blandades om och en droppe pipetterades på ett objektglas. De andra proven centrifugerades 10 minuter 700 rpm. Cellsedimenten från de centrifugerade provrören pipetterades sedan på objektglas. Analysen skedde under polarisationsmikroskop. Först användes en x100 förstoring för orientation och positionering samt för att se om kristaller fanns eller inte, bestämning av morfologin på kristallerna som fanns, samt om de hade dubbelbrytning eller inte. Om det upptäcktes intra- eller extracellulära kristaller bekräftades dessa under x400 förstoring. 25 synfält (5x5) undersöktes för att utesluta andra kristaller. Om inga kristaller upptäcktes under x100 förstoring användes x400 förstoring och 25 synfält gick strukturellt igenom för att upptäcka kristaller. De som utförde analysen hävdade att båda sorters kristaller hittades lättare efter proven hade centrifugerats innan analys. Detta p.g.a. den ökade mängden kristaller per synfält. Enligt denna studie ökade natriumuratkristall positiva prov med 0,0-6,9% efter att proven centrifugerats innan. Kalciumpyrofosfatkristaller hittades däremot i 20,0-26,7% fler prov än innan centrifugering. Studien kom till slutsatsen att även om centrifugering inte är rutin vid synovialvätskeanalys, visar data från studien att vid identifiering av kalciumpyrofosfatkristaller kan centrifugering innan vara till nytta. Studien nämner även att centrifugering kunde göras för patientprov som upprepade gånger är negativ på kristaller men misstanken om kristallartrit fortfarande består. Centrifugering kunde även göras då provet är hypocellulärt, när mikroskoperingen sparas till en annan dag, eller när personen som utför analysen inte är tillräckligt erfaren för att utföra analysen utan centrifugering. (Boumans, et al., 2017).





**Figur 12: Jämförelse på kristallmängden före (a, c) och efter (b, d) centrifugering. Bild a och c visar kristallmängden före centrifugeringen och b och d visar att mängden kristaller i ett synfält ökat efter att provet centrifugerats. (Boumans, et al., 2017)**

År 2002 gjorde Gálvez et.al. en studie med målet att ta reda på hur ett dröjsmål i analysering av synovialvätska påverkar identifieringen av kristaller. Nittioen (91) prov varav 31st med natriumuratkristaller, 30st med kalciumpyrofosfatkristaller och 30st utan kristaller bevarades i EDTA, heparin, och utan antikoagulant i 4°C före analysering. Analysering gjordes efter 24h och efter 72h i kylskåpstemperatur. Analysen skedde med vanligt ljusmikroskop och med polarisationsmikroskop. En annan uppsättning av samma prover bevarades två månader i -80°C utan koagulationshämmare. Även andra studier har gjorts kring den optimala förvaringen och förvaringstiden av synovialvätska. (Gálvez, et al., 2002).

Resultatet från Gálvez et.al. studie visade att natriumuratkristallerna bibehölls i de flesta prov som bevarats i kylskåpstemperatur och blev analyserade åter 24h och 72h senare. Intracellulära kristaller sågs 24h senare i alla 31 prov som bevarats i EDTA, 29/31 (94%) av de som bevarats i heparin och 30/31 (97%) av de som bevarats utan antikoagulant. Resultaten var de samma 72h senare; 31/31 (100%), 29/31 (94%) och 30/31 (97%). (Gálvez, et al., 2002).

Av de prov som bevarats i  $-80^{\circ}\text{C}$  kunde man se intracellulära kristaller i 25/31 prov (81%), extracellulära kristaller i 26/31 (84%) och intracellulärt eller extracellulärt i 29/31 (94%) prov. (Gálvez, et al., 2002).

Kalciumpyrofosfatkristaller sågs 24h senare i alla prov oberoende av koagulationshämmare. Med undantag av ett fall (29/30 eller 97%) sågs kristallerna även 72h senare. De prov som bevarades i  $-80^{\circ}\text{C}$  hittades intracellulära kristaller i 25/30 prov (83%), extracellulära kristaller i 27/30 (90%) och intracellulära eller extracellulära i 27/30 (90%) prov. Antalet extracellulära kristaller hölls lika genom studien, medan antalet intracellulära kristaller minskade lite efter två månader. (Gálvez, et al., 2002).

Kontrollproven visade inga kristaller när de åter analyserades 24h, 72h och två månader senare. Enstaka gånger kunde andra mikrokristaller hittas i de första eller någon av de följande analyserna. Sådana kristaller kunde vara ovala kristaller med dubbelbrytning i form av malteserkors (t.ex. talk), små pleomorfiska kristaller med stark dubbelbrytning (t.ex. metylprednisolonacetat) eller andra mikrokristaller som kunde vara damm. Det gjordes inga undersökningar på när artefakterna uppstod eller hur länge de bibehölls. (Gálvez, et al., 2002).

Studien visade att när natriumurat- och kalciumpyrofosfatkristaller ursprungligen hittats i ett prov kunde dessa ses ännu ett dygn till och med tre dygn senare, så länge de bevarats i kylskåpstemperatur. Inte heller djupfrysta prov påverkades alltför mycket, vilket visar att man kan spara prov i  $-80^{\circ}\text{C}$  för undervisningsändamål eller som kvalitetskontroll. (Gálvez, et al., 2002).

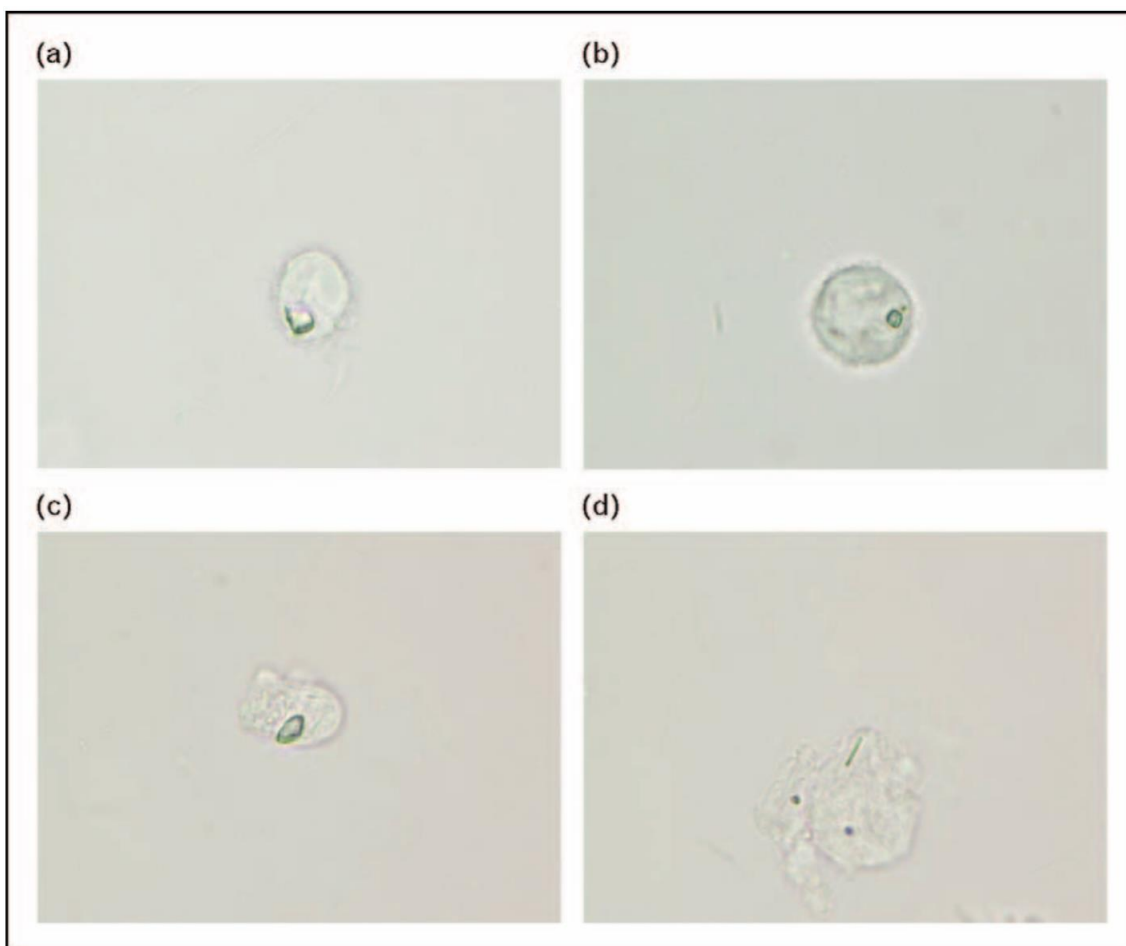
I en äldre studie gjord av Kerolus, Clayburne och Schumacher år 1989 var målet det samma som Gálvez, et al. studie. Kerolus et.al. kom dock 13 år tidigare fram till att kalciumpyrofosfatkristallerna löstes upp med tiden, oberoende om de förvarades i rumstemperatur eller kylskåpstemperatur. Kerolus et.al. använde heparin som koagulationshämmare. I tre av fem prov var det följande dag svårt att se kristallerna som dagen innan hade hittats mycket enkelt. Alla kristaller hade sedan lösts upp 3-8 veckor senare. Då kontrollerades även om det kunde finnas kvar några kristaller genom att centrifugera proven och analysera det cellsediment som blev i botten av provröret, men utan framgång. Kerolus et.al. kom fram till att natriumuratkristallerna löstes upp långsammare än kalciumpyrofosfatkristaller. Kristaller i de prov som bevarats i rumstemperatur löstes upp klart mycket fortare än de som bevarades i kylskåpstemperatur. Vissa natriumuratkristaller hade svagare dubbelbrytningen med tiden och vissa som bevarats

i rumstemperatur blev kortare. Författarna till denna äldre studie rekommenderar dock att proven analyseras så fort som möjligt efter aspirering, eftersom de även upptäckte artefaktbildning i proven utöver leukocyternas sönderfall, kalciumpyrofosfatkristallernas sönderfall och natriumuratkristallernas minskade antal, förändrade form och dubbelbrytning. (Kerolus, et al., 1989).

## 5.2 Mikroskopering

Provet ska gärna analyseras så fort som möjligt efter kollektion. Det lönar sig att kontrollera både objektglas och täckglas, så det inte finns skråmor eller handsktalk på dem, eftersom dessa kan orsaka artefakter. Objektglaset kan tvättas med sprit innan analysering. Köhlerinställning av mikroskopet ska göras innan analysering, efter mikroskopets tillverkares instruktioner. En droppe av synovialvätskan pipetteras på objektglaset och täckglaset läggs ovanpå så droppen sprids ut. Provet fokuseras under x10 objektivet. Preparatet kontrolleras för kristaller först under x10 objektivet, utan polariseraren och den röda kompensatorplattan. Skinande objekt kan tyda på kristaller i provet. Ett gult eller blått objekt mot en magentafärgad bakgrund är svårare att urskilja jämfört med vita objekt mot en svart bakgrund. Hela preparatet går igenom med x10 objektivet och sedan byts det till x40 objektivet och polarisatorn och den röda kompensatorplattan läggs på. Preparatet går noggrant igenom igen. Vid behov kunde en annan person ombes om att också gå igenom preparatet, detta ökar tillförlitligheten i svaret samt yrkesskickligheten hos fler personer. (Judkins & Cornbleet, 1997).

Mikroskopering under 400x förstoring är tillräckligt, men speciellt under träningsperiod är observation under 1000x förstoring i vanligt ljusmikroskop mycket hjälpsamt för att lära urskilja kristallerna. Kalciumpyrofosfatkristallerna är ofta mycket små och kan vara intracellulära som små fyrkanter eller nålar, eller som inklusioner med en linjär gräns eller vinkel (se figur 13). Natriumuratkristaller ses mycket enklare tack vare deras sken i enkelt polariserat ljus även i 200x förstoring (även om enklare att ses i 400x förstoring). Både i vanligt ljusmikroskop och polarisationsmikroskop är höjden på kondensorn viktig för optimal kontrast och detalj. Ett intensivt ljus så som halogenlampa tillåter bättre observation under polarisationsmikroskop. (Pasqual, et al., 2011).



**Figur 13:** Små kalciumpyrofosfatkristaller intracellulärt i 1000x förstoring, ljusmikroskop. (Pasqual, et al., 2011)

Vid stark misstanke om kristallartrit har det visat sig vara lönt att åter mikroskopera ett preparat ett dygn efter den första mikroskoperingen, eftersom den analytiska och diagnostiska känsligheten ökar. (Yuan, et al., 2003).

### 5.3 Positiva fynd

Till positiva fynd när man vill diagnostisera gikt eller CPPD räknas endast natriumuratkristallerna och kalciumpyrofosfatkristallerna, därför är rätt klassificering av dessa mycket viktig (Dieppe & Swan, 1999). Antalet kristaller i ett prov är diagnostiskt irrelevant, men antalet falskt negativa svar ökar ju färre kristaller som finns i provet (von Essen, et al., 1998). I ett prov kan finnas få kristaller, vilket gör det väsentligt att man går igenom hela preparatet under täckglaset (Judkins & Cornbleet, 1997). Också Rosenthal & Lawrence skriver i sin artikel från 2018 att en noggrann analys av preparatet är viktigt för att minska antalet falskt negativa svar.

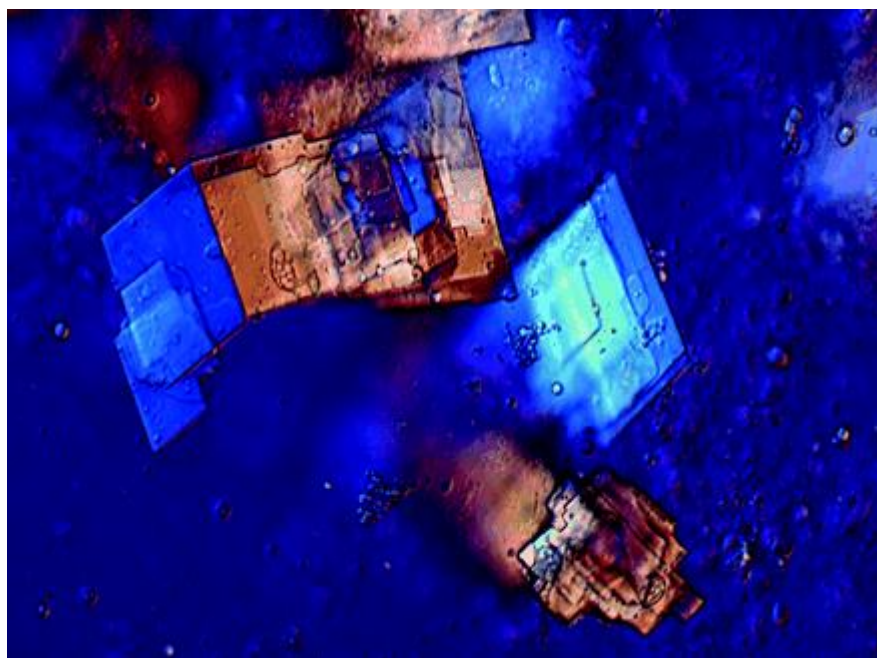
År 1989 gjorde Gordon, Dieppe och Swan en studie för att bestämma tillförlitligheten i analysering av kristaller i synovialvätska med hjälp av ljusmikroskop. Målsättningen var att få reda på skillnaden i analyseringstillförlitligheten hos sex analysutförare med olik erfarenhet samt få reda på hur stor mängd kristaller som behövdes i ett prov för att kunna upptäcka dem med standardteknik. Undersökningen visade att chansen för alla analysutförare att göra en korrekt analys av kristallerna ökade ju fler kristaller  $\mu\text{g/ml}$  synovialvätska. Största andelen falskt negativa och falskt positiva svar gjordes vid låg koncentration av kristaller samt kristallernas olika storlek. Detta tydde på att ett prov krävde 10  $\mu\text{g}$  kristaller/ml synovialvätska eller mer för ett tillförlitligt svar. Gordon et.al data visar även att natriumuratkristaller medförde mindre felaktiga svar jämfört med kalciumpyrofosfatkristaller. (Gordon, et al., 1989).

#### **5.4 Andra kristaller och fynd**

Förutom kristallerna som är diagnostiserande för gikt och det som tidigare hette pseudogikt kan synovialvätskan innehålla andra kristaller och partiklar som inte räknas som positivt fynd i undersökningen Sy-Kide-O. Kalciumfosfatkristaller och andra apatiter, kolesterol och andra lipider är sådana partiklar. EDTA kan även bilda kristaller, vilket är ytterligare en orsak till att provmaterialet inte ska samlas i ett EDTA-rör, utöver att EDTA löser upp kalciumpyrofosfat. Annat material som har dubbelbrytning kan finnas i synovialvätska, steroidkristaller är ett exempel. Dessa har stark dubbelbrytning och är stavformade, men är ofta större än natriumurat- och kalciumpyrofosfatkristaller. (Dieppe & Swan, 1999; Judkins & Cornbleet, 1997).

Material	Form	Dubbelbrytning
Kalciumoxalat	Bipyramidal (“kuvertform”)	Stark
Brosk, kollagen	Oregelbunden, stavlik	Stark
Kolesterol	Platt, skivor med hack i hörnet, ibland nålformad, över 100 µm stor	Stark

Tabell 1: Andra kristaller i synovialvätska (Judkins & Cornbleet, 1997)



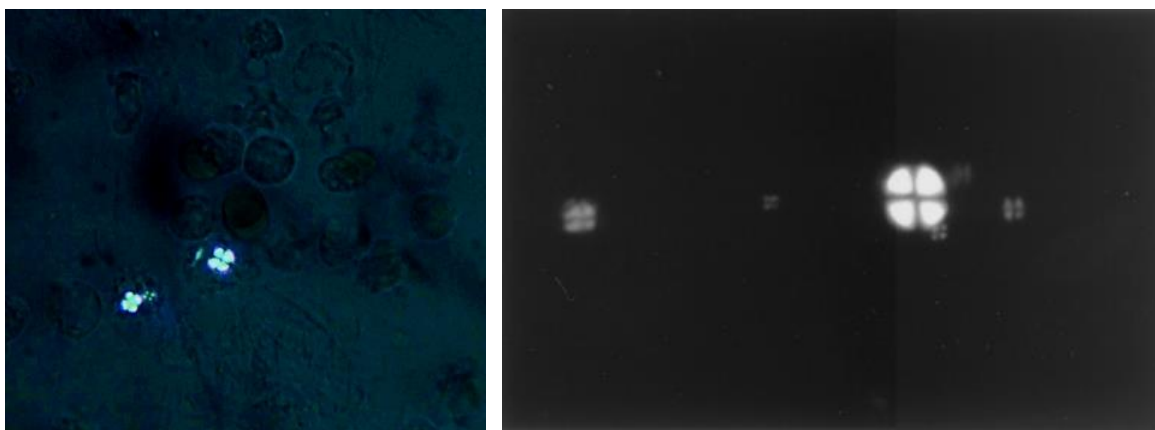
Figur 14: Typiska kolesterolkristaller. (Balint, et al., 2003)

Fibrin kan ofta finnas i synovialvätska och ses som hårlika strån som inte är patogena. I skadade leder kan finnas delar av brosk av både mindre (1-20 µm) och större (>100 µm) storlek, med dubbelbrytning eller utan. De större broskfragmenten har dubbelbrytning medan de mindre inte har. (Dieppe & Swan, 1999).

Lipidkristaller kan ses som 1-30 µm stora med äggform. De har dubbelbrytning och ett klart ”malteserkors” (se figur 15 ). (Dieppe & Swan, 1999). Lipidkristaller i synovialvätska har sällan ett samband med ett onormalt lipidvärde i serum eller synovialvätska (Dylewski, et

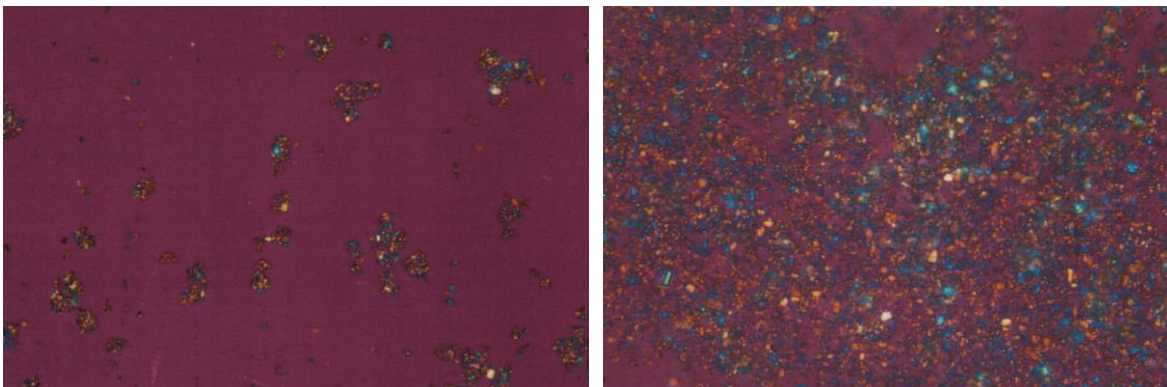
al., 2005). Lipidkristallerna tros också vara en bieffekt av artrit, med sitt ursprung i synovialt fett som utsöndrats i leden (Hackeng, et al., 2000).

Kalciumoxalatkrystaller kan se olika ut, beroende på om de är kalciumoxalat monohydrat eller kalciumoxalat dihydrat. Kalciumoxalat monohydrat kan se ut som oregelbundna kvadrater eller stavar som lätt kan misstas för kalciumpyrofosfatkrystaller. Det finns även kalciumoxalat dihydrat med ett klassiskt ”kuvertutseende” (kvadrater med ett kors) och de är den vanligare typen. Båda sorterna av kalciumoxalat har varierande dubbelbrytning och kan finnas intra- eller extracellulärt. (Lorenz, et al., 2013).



**Figur 15: Lipidsfärer med malteskors. (Bilden till vänster Dylewski, et al., 2005, bilden till höger Hackeng, et al., 2000)**

I akuta tillstånd av CPPD är antalet leukocyter i synovialvätskan mycket hög. Typiskt är att antalet är mellan 5000 och 25 000 celler/ $\mu$ l. Ett mindre antal ses hos patienter med kronisk polyartrit och mycket stora antal (upp till 100 000 leukocyter/ $\mu$ l) hittas hos patienter med pseudoseptiska presentationer (feber, leukocytos och hypertoni p.g.a. andra orsaker än bakteriell sepsis). Hos patienter med fler än 2000 leukocyter/ $\mu$ l i synovialvätskan borde tillstånden behandlas som septiska, tills annat bevisas. (Ivory & Velázquez, 2012).



Figur 16: Lederspankristaller (läkemedel) av varierande mängd. (Kouri, 2001)

## 5.5 Artefakter

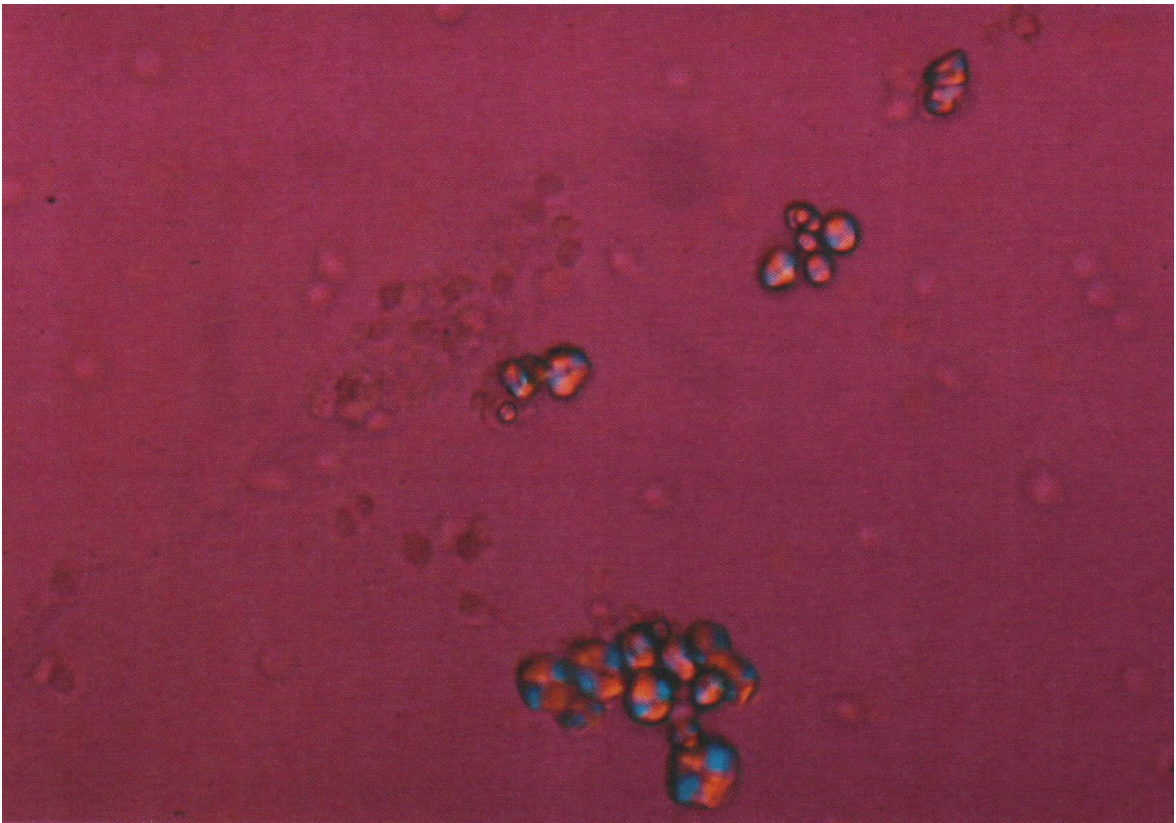
I synovialvätska kan det lätt uppkomma artefakter utifrån, till exempel talk från skyddshandskar, damm i luften, svampsporer och linsdukfibrer, som alla har dubbelbrytning. Prov som förvaras för länge kan bli torra och kan då bilda partiklar med dubbelbrytning som liknar natriumurat- och kalciumpyrofosfatkristaller. (Dieppe & Swan, 1999). Talk från handskar har storleken 10–100  $\mu\text{m}$  med positiv dubbelbrytning och ett svagt ”malteserkors” (figur 17) (Hackeng, et al., 2000).

I figurerna 17 – 19 visas olika artefakter, d.v.s. föremål som kommit utifrån, som kan finnas i synovialvätskan.

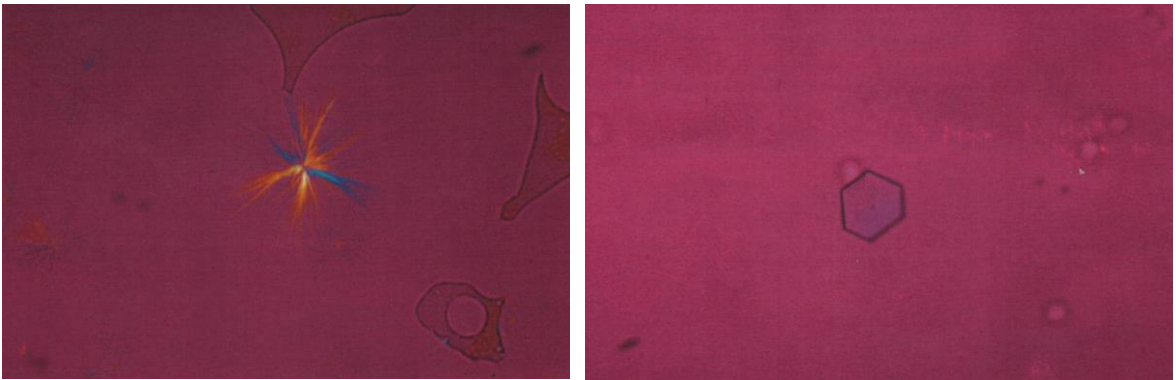
Material	Form	Dubbelbrytning
Sönderfall, skräp	Små, oregelbunden form, tandade, rundade, icke parallella kanter	Varierar
EDTA (torr, dikalium)	Små, formlösa	Svag
Fetter (kolesterolestrar)	Droppformade	Stark (malteserkors)
Litiumheparin	Liknar kalciumpyrofosfat	Svagt positiv

Tabell 2: Andra artefakter i synovialvätska (Judkins & Cornbleet, 1997)

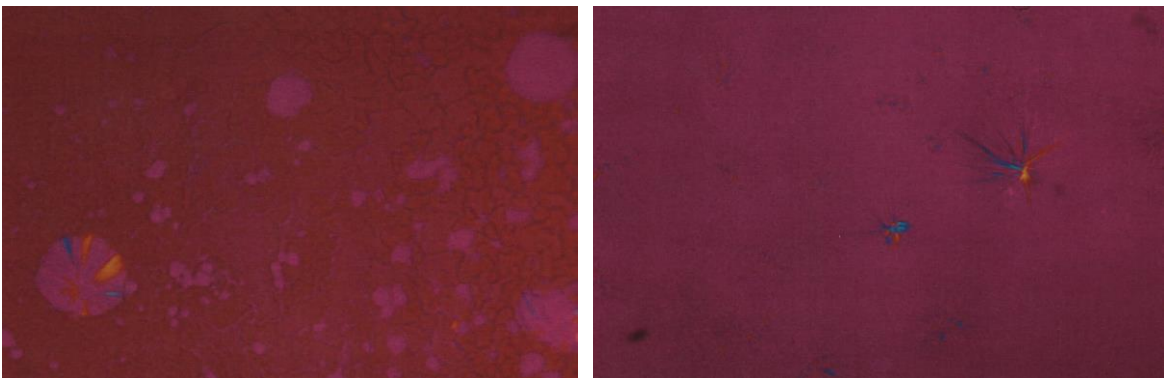




Figur 17: Handsktalk med malteserkors. (Kouri, 2001)



Figur 18: Artefakter. (Kouri, 2001)



Figur 19: Artefakter. (Kouri, 2001)

## 6 Resultat och tolkning

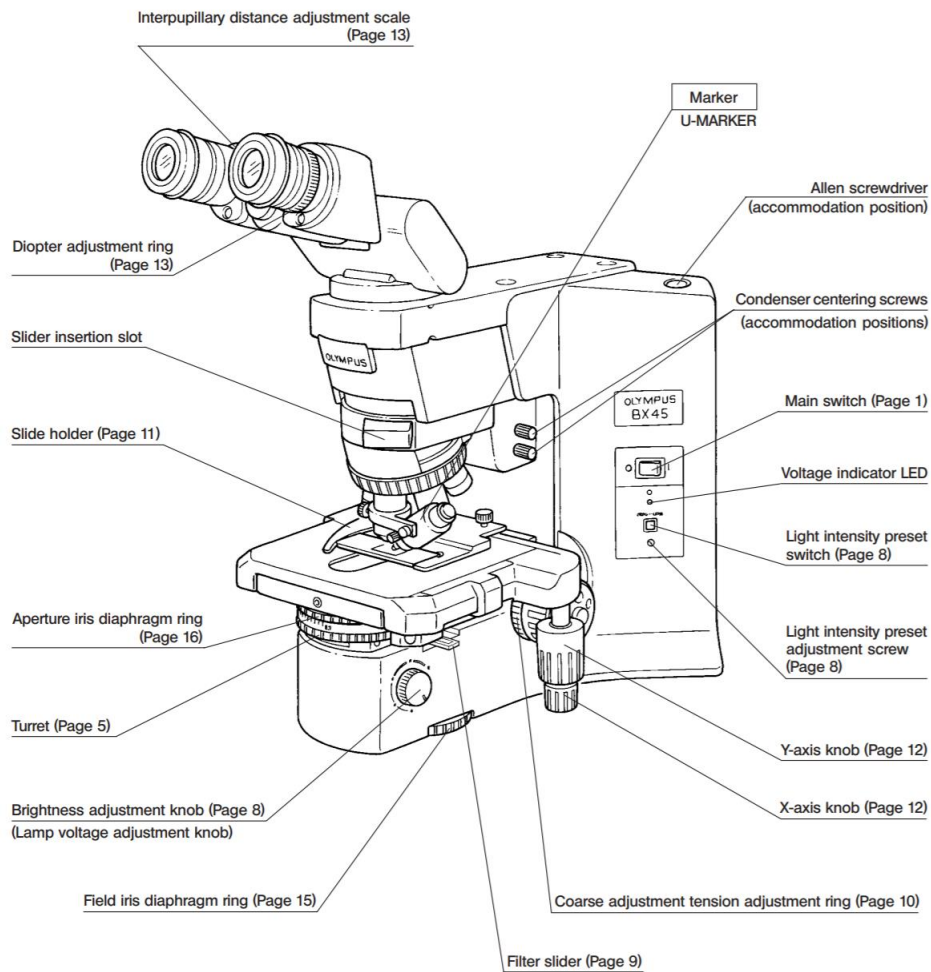
Resultatet av denna litteraturoversikt visar att det länge varit ett problem med huruvida tekniken för analys av synovialvätska är den bästa möjliga, då främst med fäste på laboratoriepersonalens kunskap att identifiera kristallerna (Lumbreras, et al., 2005; Dieppe & Swan, 1999; Judkins & Cornbleet, 1997; Gordon, et al., 1989). Med den litteratur som använts i detta examensarbetet har en arbetsbeskrivning utarbetats.

Eftersom skolning inom kristallanalysering inte utbjuds i så stor utsträckning har centrifugering av provet inkluderats som ett steg i arbetsbeskrivningen. Detta med hänvisning till Boumans et.al. studie från 2017 där mängden kristaller som lättare identifierades ökade efter centrifugering. Natriumuratkristallernas mängd per synfält ökade med upp till 6,9% och kalciumpyrofosfatkristallernas mängd per synfält ökade med upp till 26,7%. Även om 6,9% inte är en stor ökning är 26,7% en relativt stor ökning, speciellt eftersom denna ökning gällde de kristaller som är svårare att identifiera p.g.a. lite storlek och svaga dubbelbrytning. Flera källor (så som Gordon, et al., 1989) som använts i detta arbete styrker detta påstående, där även nämnts att natriumuratkristallerna är lättare att identifiera. I Boumans et.al. studie från 2017 centrifugerades proven 10 minuter i 700 rpm och det är det som använts i arbetsbeskrivningen.

Litteraturen som använts för teorin i detta arbete gav upphov till en arbetsbeskrivning på 11 steg eller punkter, som förhoppningsvis kommer hjälpa laboratoriepersonalen på Vasa centralsjukhus vid analysering av kristallerna.

## 7 Arbetsbeskrivning för mikroskopering av kristaller i synovialvätska

Arbetsbeskrivningen är framställd för laboratoriet på Vasa centralsjukhus och är skriven kort i punktform för att enkelt kunna följas. Mikroskopet som används i urinlaboratoriet på Vasa centralsjukhus är ett Olympus BX45 (Figur 20). Arbetsbeskrivningen finns på finska och svenska som bilaga i slutet av detta arbete. Förutom arbetsbeskrivning finns även bilder på kristaller och artefakter som kan användas som hjälpmedel vid kristallanalysering. Före analysering av provet ska provet vara noterat som ankommen till laboratoriet i datasystemet (Effica används på Vasa centralsjukhus laboratorium).



**Figur 20: Olympus BX45 mikroskop. (Olympus Corporation, 2005)**

### Arbetsbeskrivning på svenska:

- Steg 1: Centrifugera provet 10 minuter i 700 rpm.
- Steg 2: Kontrollera att objektglas och täckglas är hela och rena.
- Steg 3: Pipettera 13  $\mu$ l cellsediment från botten av provröret på objektglaset och lägg täckglaset över droppen.
- Steg 4: Fokusera synfältet, använd 10x objektiv och t.ex. ett bra kontrollglas.
- Steg 5: Ställ irisbländaren på 0,5 (figur 21)
- Steg 6: Lägg den röda kompensatorplattan (figur 22) på plats (under okularen, figur 23).
- Steg 7: Lägg polariseraren (figur 24) över bländaren (figur 25).

- Steg 8: Gå igenom provet med x100 förstoring (10x objektiv). Gå igenom hela preparatet noggrant.
- Steg 9: Byt till x400 förstoring (40x objektiv, märkt Sy-Kide, se figur 26). Gå igenom hela preparatet noggrant.
- Steg 10: Om du inte hittar kristaller, svara i Effic negativt.
- Steg 11: Om du hittar kristaller och kristallerna är gula i samma riktning som polariseraren och kompensatorplattan (mot kl. 17), är de natriumuratkristaller.
- Om kristallerna är blåa i samma riktning är de kalciumpyrofosfatkristaller.

Kom ihåg att kristallerna kan vara intracellulära!

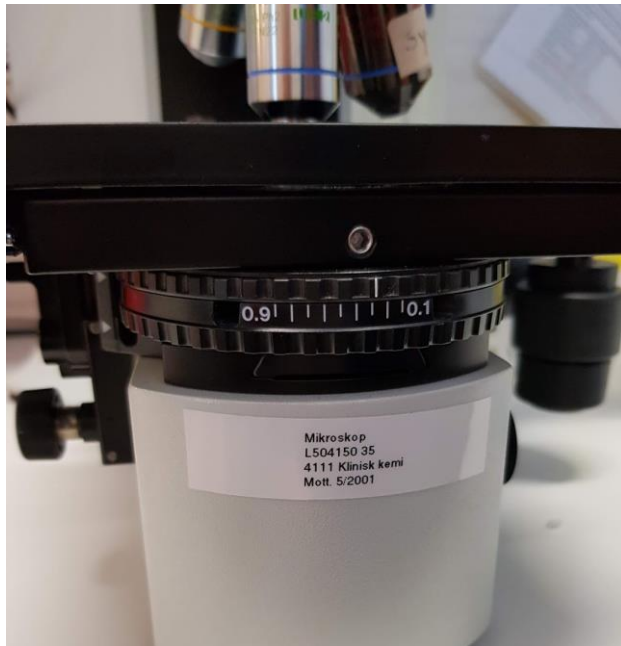
#### **Arbetsbeskrivning på finska:**

- Vaihe 1: Sentrifugoi näyte 10 minuuttia 700 rpm.
- Vaihe 2: Tarkista, että objektilasi sekä peitinlasi ovat ehjät ja puhtaat.
- Vaihe 3: Pipetoi 13 $\mu$ l solusedimenttiä näyteputken pohjasta objektilasille ja peitä peitinlasilla.
- Vaihe 4: Tarkenna näkökenttä, käyttäen 10x objektiivia ja esim. hyvää kontrollilasia.
- Vaihe 5: Säädä iirishimentimen arvoksi 0,5 (Kuva 21)
- Vaihe 6: Työnnä punalevy (kuva 22) paikoilleen (okulaarin alla, kuva 23).
- Vaihe 7: Aseta polarisaattorilevy (kuva 24) kenttähimmentimen yläpuolelle (kuva 25).
- Vaihe 8: Mikroskopoi näyte ensin x100 suurennuksella (10x objektiivi). Mikroskopoi tarkasti koko näyte.
- Vaihe 9: Mikroskopoi näyte x400 suurennuksella (40x objektiivi, merkattu Sy-Kide, katso kuva 26). Mikroskopoi tarkasti koko näyte.
- Vaihe 10: Jos näytteestä ei löydy kiteitä, vastaa Effican negatiivinen.

Vaihe 11: Jos löydät näytteestä kiteitä, ja kiteet ovat keltaiset ja samansuuntaisesti kuin punalevy (klo. 17 kohti), kiteet ovat natriumuraattia.

Jos kiteet ovat sinisiä punalevyn varrensuuntaisina, kiteet ovat kalsiumpyrofosfaattia.

Muista, että kiteet voivat olla solunsisäisiä!



**Figur 21: Irisbländare (Egen bild)**



**Figur 22: Röd kompensatorplatta (Egen bild)**



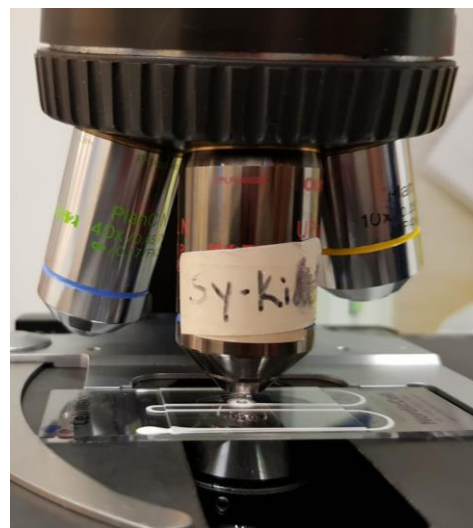
Figur 23: Plats för kompensatorplattan (Egen bild)



Figur 24: Polariseraren (Egen bild)



Figur 25: Plats för polariseraren (Egen bild)



Figur 26: 40x objektivet märkt Sy-Kide (Egen bild)

## 8 Kritisk granskning och diskussion

Målet med detta arbete var att göra en arbetsbeskrivning av kristallanalyseringen, på ett sätt som alla i laboratoriets personal kunde förstå och följa. Under detta arbetes gång har jag själv lärt mig mycket om kristallerna och hur dessa ska analyseras, samt om deras egenskaper när de förvaras i olika temperaturer för senare analys. Att veta hur kristallerna kan ändras är enligt mig en viktig kunskap när det kommer till kristallanalysering, eftersom du då kan förvänta dig att det finns skillnader i preparatet, kristallernas antal och utseende samt möjlighet till artefaktbildning.

I arbetet har frågeställningarna besvarats. Frågeställningarna var:

- Vad är positivt fynd?
- Hur många kristaller ska finnas i provet för att det ska klassas som positivt?
- Vilka kristaller räknas till gikt?
- Vilka kristaller räknas till CPPD?

På frågan angående hur många kristaller som räknas som positivt fynd kunde jag inte hitta ett specifikt antal, men det framkom att antalet inte är av diagnostisk betydelse. Detta är såklart logiskt, med tanke på att kristallerna inte finns i friska ledkapslars synovialvätska.

I samband med detta arbete kunde det ha gjorts en observation av hur kristallanalyseringen går till i laboratoriet. Denna observation kunde ha använts i uppställningen av arbetsbeskrivningen och möjligen kunde man ha gjort en s.k. "leaning" av arbetspunkten på samma gång, för att förbättra flödet på arbetspunkten.

I och med denna arbetsbeskrivning kunde man om något år göra en undersökning angående hur väl laboratoriepersonalen på Vasa centralsjukhus kan göra kristallanalys. Vid behov kunde man då ändra delar av eller hela arbetsbeskrivningen. Det här eftersom detta arbetes syfte var att öka personalens kunnighet och på så sätt förbättra den vård som patienter får i och med laboratoriepersonalens kunnighet att identifiera kristaller.

Jag hoppas att laboratoriepersonalen får tillgång till skolning i kristallanalysering, samt att personalen själva upprätthåller sina kunskaper med hjälp av externa kvalitetskontroller.

## Litteraturförteckning

- Balint, P. V., Kane, D. & Sturrock, R. D., 2003. Case Number 26: Massive cholesterol crystal deposition: unusual location in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(6), p. 512.
- Boumans, D. et al., 2017. The added value of synovial fluid centrifugation for monosodium urate and calcium pyrophosphate crystal detection. *Clinical Rheumatology*, Juli, 36(7), pp. 1599-1605.
- Davidson, M. W., 2015. *Polarized Light Microscopy: The First Order (Full Wave) Retardation Plate*. [Online]  
<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/polarized/firstorderplate.html>  
[Använd 4 Oktober 2019].
- Dehlin, M., 2018. *Internetmedicin.se: Gikt*. [Online]  
<https://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=5475>  
[Använd 23 april 2019].
- Dieppe, P. & Swan, A., 1999. Identification of crystals in synovial fluid. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(5), pp. 261-263.
- Dylewski, J., Awan, Z. & Roy, I., 2005. Acute monoarticular arthritis caused by Maltese cross-like crystals. *Canadian Medical Association Journal (CMAJ)*, 172(6), pp. 741-742.
- Faryna, A. & Goldenberg, K., 1990. Chapter 166 Joint Fluid. i: *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3 red. Boston: Butterworths.
- Gálvez, J. et al., 2002. Delayed examination of synovial fluid by ordinary and polarised light microscopy to detect and identify crystals. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Maj, 61(5), pp. 444-447.
- Gordon, C., Swan, A. & Dieppe, P., 1989. Detection of crystals in synovial fluids by light microscopy: sensitivity and reliability.. *Annals of the Rheumatic Diseases*, September, 48(9), pp. 737-742.
- Hackeng, C. M., de Bruijn, L. A., Douw, C. M. & van Dieijen-Visser, M. P., 2000. Presence of Birefringent, Maltese-Cross-appearing Spherules in Synovial Fluid in a Case of Acute Monoarthritis. *Clinical Chemistry*, 46(11).
- Huotari, V., 2007. *Kihtikiteitä*. [Online]  
[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ldk00162](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ldk00162)  
[Använd 23 april 2019].
- Iqbal, S. M., Qadir, S., Aslam, H. M. & Qadir, M. A., 2019. Updated Treatment for Calcium Pyrophosphate Deposition Disease: An Insight. *Cureus*, 7 januari, 11(1), p. e3840.
- Ivory, D. & Velázquez, C. R., 2012. The Forgotten Crystal Arthritis: Calcium Pyrophosphate Deposition. *Mo Med*, 109(1), pp. 64-68.
- Jin, M. et al., 2012. Uric Acid, Hyperuricemia and Vascular Diseases. *Front Biosci*, 1 Januari, Volume 17, pp. 656-669.



- Judkins, S. W. & Cornbleet, P. J., 1997. Synovial Fluid Crystal Analysis. *Laboratory Medicine*, 1 December, 28(12), pp. 774-779.
- Julkunen, H., 2016. *Kihtikiteitä*. [Online]  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/suositus?id=ima02402>  
[Använd 23 april 2019].
- Julkunen, H., 2017. Kihti ja valekihti. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 113(10), pp. 953-6.
- Julkunen, H. & Konttinen, Y. T., 2010. Kihdin muuttuva kuva. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 126(12), pp. 1477-85.
- Juneja, P. & Hubbard, J. B., 2018. Anatomy, Joints. i: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Kerolus, G., Clayburne, G. & Schumacher, H. R. J., 1989. Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis?. *Arthritis and Rheumatism*, 32(3), pp. 271-278.
- Kouri, T., 2001. *Nivelnesteiden kiteet*.
- Kuntaliitto, 2018. *Laboratoriotutkimusnimikkeistö*. [Online]  
<https://www.kuntaliitto.fi/file/16095/download?token=pzLAN6zV>  
[Använd 11 November 2019].
- Kuntaliitto, u.å. *Finlands Kommunförbund*. [Online]  
<https://www.kommunforbundet.fi/kommunforbundet>  
[Använd 11 November 2019].
- Lorenz, E. C., Michet, C. J., Milliner, D. S. & Lieske, J. C., 2013. Update on Oxalate Crystal Disease. *Current Rheumatology Reports*, 15(7), p. 340.
- Lumbreras, B. et al., 2005. Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Volume 64, pp. 612-615.
- Martillo, M. A., Nazzari, L. & Crittenden, D. B., 2015. The Crystallization of Monosodium Urate. *Current Rheumatology Reports*, 1 februari, 16(2), p. 400.
- Mustajoki, P., 2018. *Kihti*. [Online]  
[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00032](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00032)  
[Använd 12 mars 2019].
- Newberry, S. J. et al., 2016. *Diagnosis of Gout (Comparative Effectiveness Reviews, No. 158)*. [Online]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK350137/>  
[Använd 23 april 2019].
- Olympus Corporation, 2005. Tokyo.
- Pasqual, E., Andrés, M. & Sivera, F., 2011. Synovial fluid analysis for crystals. *Current opinion in rheumatology*, Mars, 23(2), pp. 161-169.

Rigsbee, C. A., Sizemore, T. C. & Lohr, K. M., 2018. Severe calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease of the metacarpophalangeal joints. *BMJ Case Rep.*, 28 september.p. bcr2018226132.

Rosenthal, A. K. & Lawrence, M. R., 2016. Calcium Pyrophosphate Deposition Disease. *N Engl J Med*, 18 November, 374(26), pp. 2575-2584.

Ryu, K. et al., 2014. The prevalence of and factors related to calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition in the knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14 maj, 22(7), pp. 975-979.

Salminen, J., 2004. *Vaasan Keskussairaala, laboratorio-ohjekirja: Sy-Kiteet*. [Online] <http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ohjekirja/2055.htm> [Använd 5 mars 2019].

Schmid, T., 2016. *Polarized Light Microscopy*. [Online] <http://schmid.mygoodpage.org/wordpress/light-microscopy/> [Använd 31 Oktober 2019].

von Essen, R., Hölttä, A. M. H. & Pikkarainen, R., 1998. Quality control of synovial fluid crystal identification. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 57(2), pp. 107-109.

Yuan, S. et al., 2003. Repeat Examination of Synovial Fluid for Crystals: Is It Useful?. *Clinical Chemistry*, 49(9).

## Figurförteckning

Figur 1: Tofi på öra. Ett kroniskt tillstånd där det skett en utfällning av natriumuratkristaller i huden. (Dehlin, 2018) .....	7
Figur 2: Bilden till vänster beskriver hur polariseraren konverterar vitt ljus till linjärt polariserat ljus. Analyseraren och polariseraren ligger parallellt. Bilden till höger beskriver hur ljuset ändras när analyseraren ligger i 90° vinkel mot polariseraren, då kommer endast ljuset som ändrat polarisationsriktning när den träffat objektet igenom. Amorfa delar av objektet är mörka medan kontrasten av kristaller och små partiklar förstärks, vilket kan ändra polariseringsljuset tack vare dubbelbrytning eller ljusspridning. (Schmid, 2016).....	10
Figur 3: (a, b) Kristall under vanligt ljus och enkelt polariserat ljus, (c) en blå kristall parallell med kompensatorplattan, samt en gul intracellulär kristall till höger (Dieppe & Swan, 1999) .....	11
Figur 4: Bildning av natriumuratkristaller ur urinsyra. Urat är predominant när det fysiologiska pH-värdet är 7,4 och temperaturen 37°C. Urat slås ihop med natrium som bildar den mindre lösliga saltformen natriumurat. (Martillo, et al., 2015) .....	12

Figur 5: Hypotetisk modell av kirstallisering och nukleationsprocessen i en kristall. Natriumuratmolekyler är lösliga så länge saturationen inte överskrids eller temperaturen minskar. Molekylerna börjar då hopa sig och bildar kristallkärnan och slutligen kristallen. (Martillo, et al., 2015).....	13
Figur 6: Till vänster måttligt av natriumuratkristaller och till höger rikligt av natriumuratkristaller. (Kouri, 2001) .....	14
Figur 7: Patofysiologiska egenskaper hos CPPD. (Rosenthal & Lawrence, 2016).....	15
Figur 8: Kalciumpyrofosfatkristall med svag dubbelbrytning sett under polariserat ljus (Iqbal, et al., 2019).....	16
Figur 9: CPPD-kristaller under kompenserat polariserat ljus, 1000x förstoring. (Dieppe & Swan, 1999).....	17
Figur 10: Rikligt av kalciumpyrofosfatkristaller. Samma synfält med olika vinkel på kompensatorplattan. (Kouri, 2001) .....	17
Figur 11: Få kalciumpyrofosfatkritaller. Samma synfält med olika vinkel på kompensatorplattan (Kouri, 2001) .....	17
Figur 12: Jämförelse på kristallmängden före (a, c) och efter (b, d) centrifugering. Bild a och c visar kristallmängden före centrifugeringen och b och d visar att mängden kristaller i ett synfält ökat efter att provet centrifugerats. (Boumans, et al., 2017).....	20
Figur 13: Små kalciumpyrofosfatkristaller intracellulärt i 1000x förstoring, ljusmikroskop. (Pasqual, et al., 2011).....	23
Figur 14: Typiska kolesterolkristaller. (Balint, et al., 2003) .....	25
Figur 15: Lipidsfärer med malteserkors. (Bilderna till vänster Dylewski, et al., 2005, bilden till höger Hackeng, et al., 2000).....	26
Figur 16: Lederspankristaller (läkemedel) av varierande mängd. (Kouri, 2001).....	27
Figur 17: Handsktalk med malteserkors. (Kouri, 2001).....	28
Figur 18: Artefakter. (Kouri, 2001).....	28
Figur 19: Artefakter. (Kouri, 2001).....	28
Figur 20: Olympus BX45 mikroskop. (Olympus Corporation, 2005).....	30
Figur 21: Irisbländare (Egen bild).....	32
Figur 22: Röd kompensatorplatta (Egen bild).....	32
Figur 23: Plats för kompensatorplattan (Egen bild) .....	33
Figur 24: Polariseraren (Egen bild).....	33
Figur 25: Plats för polariseraren (Egen bild).....	33
Figur 26: 40x objektivet märkt Sy-Kide (Egen bild) .....	33

## **Bilagor**

**Bilaga 1: Svensk arbetsbeskrivning**

**Bilaga 2: Finsk arbetsbeskrivning**

**Bilaga 3 - 5: Bilder**

**Arbetsbeskrivning för undersökningen Sy-Kide-O:**

- Steg 1: Centrifugera provet 10 minuter i 700 rpm.
- Steg 2: Kontrollera att objektglas och täckglas är hela och rena.
- Steg 3: Pipettera 13 $\mu$ l cellsediment från botten av provröret på objektglaset och lägg täckglaset över droppen.
- Steg 4: Fokusera synfältet, använd 10x objektiv och t.ex. ett bra kontrollglas.
- Steg 5: Ställ irisbländaren på 0,5 (bild 1)
- Steg 6: Lägg den röda kompensatorplattan (bild 2) på plats (under okularen, bild 3).
- Steg 7: Lägg polariseraren (bild 4) över bländaren (bild 5).
- Steg 8: Gå igenom provet med x100 förstoring (10x objektiv). Gå igenom hela preparatet noggrant.
- Steg 9: Byt till x400 förstoring (40x objektiv, märkt Sy-Kide, se bild 6). Gå igenom hela preparatet noggrant.
- Steg 10: Om du inte hittar kristaller, svara i Effic negativt.
- Steg 11: Om du hittar kristaller och kristallerna är gula i samma riktning som polariseraren och kompensatorplattan (mot kl. 17), är de natriumuratkristaller.
- Om kristallerna är blåa i samma riktning är de kalciumpyrofosfatkristaller.

Kom ihåg att kristallerna kan vara intracellulära!

**Työohje Sy-Kide-O:**

- Vaihe 1: Sentrifugoi näyte 10 minuuttia 700 rpm.
- Vaihe 2: Tarkista, että objektilasi sekä peitinlasi ovat ehjät ja puhtaat.
- Vaihe 3: Pipetoi 13 $\mu$ l solusedimenttiä näyteputken pohjasta objektilasille ja peitä peitinlasilla.
- Vaihe 4: Tarkenna näkökenttä, käyttäen 10x objektiivia ja esim. hyvää kontrollilasia.
- Vaihe 5: Säädä iirishimentimen arvoksi 0,5 (kuva 1)
- Vaihe 6: Työnnä punalevy (kuva 2) paikoilleen (okulaarin alla, kuva 3).
- Vaihe 7: Aseta polarisaattorilevy (kuva 4) kenttähimmentimen yläpuolelle (kuva 5).
- Vaihe 8: Mikroskopoi näyte ensin x100 suurennuksella (10x objektiivi). Mikroskopoi tarkasti koko näyte.
- Vaihe 9: Mikroskopoi näyte x400 suurennuksella (40x objektiivi, merkattu Sy-Kide, katso kuva 6). Mikroskopoi tarkasti koko näyte.
- Vaihe 10: Jos näytteestä ei löydy kiteitä, vastaa Efficaan negatiivinen.
- Vaihe 11: Jos näytteestä löytyy kiteitä, ja kiteet ovat keltaiset ja samansuuntaisesti kuin punalevy (klo. 17 kohti), kiteet ovat natriumuraattia.
- Jos kiteet ovat sinisiä punalevyn varrensuuntaisina, kiteet ovat kalsiumpyrofosfaattia.

Muista, että kiteet voivat olla solunsisäisiä!

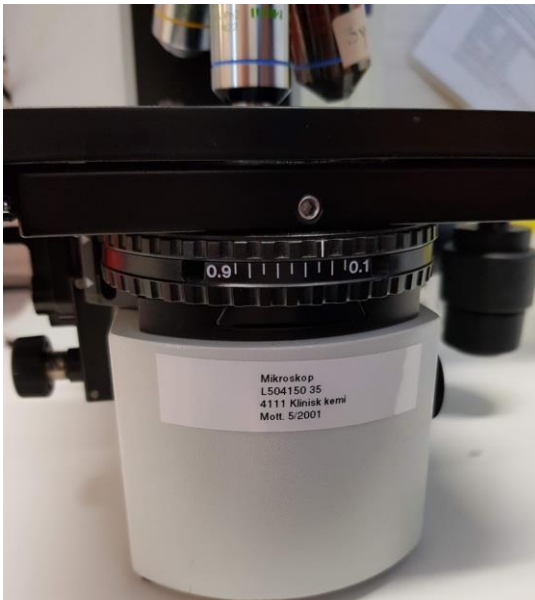


Bild 1: Irisbländare



Bild 2: Röd kompensatorplatta

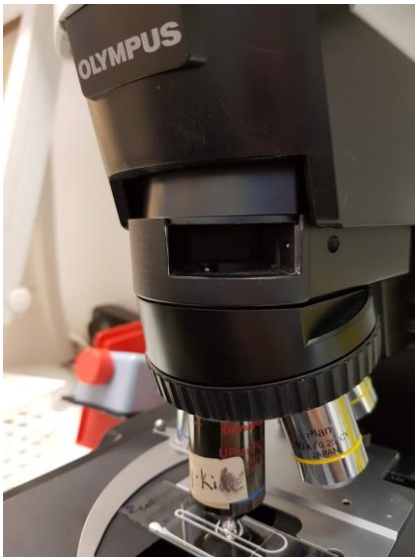


Bild 3: Plats för kompensatorplattan



Bild 4: Polariserare

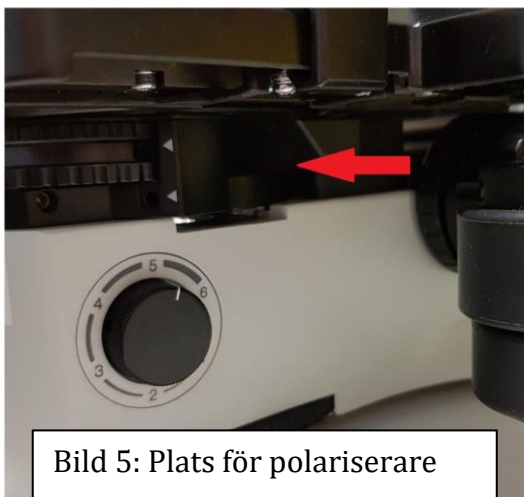


Bild 5: Plats för polariserare

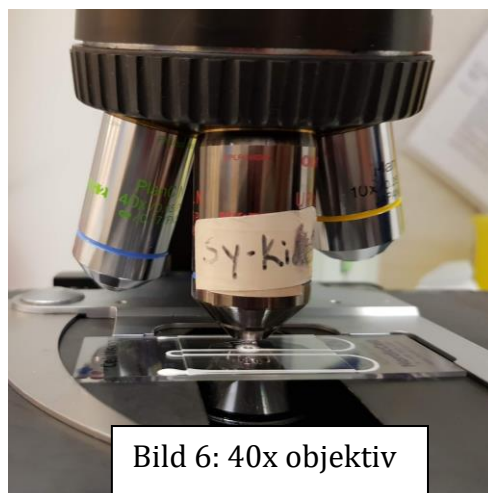
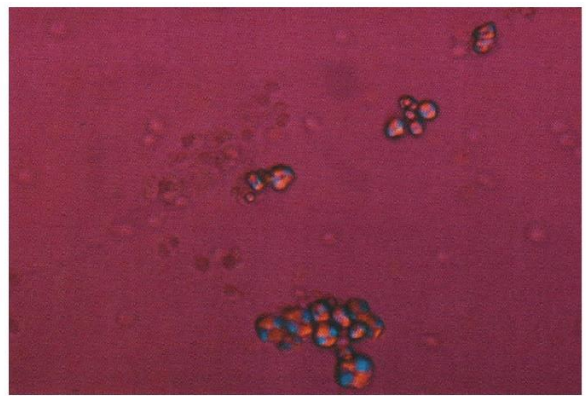
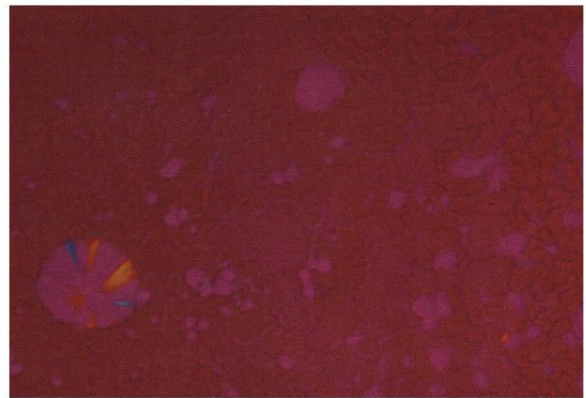
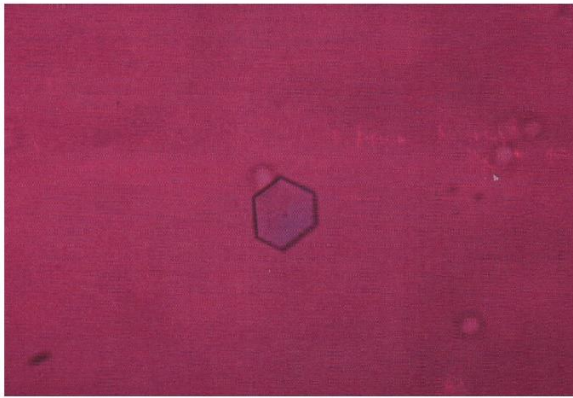


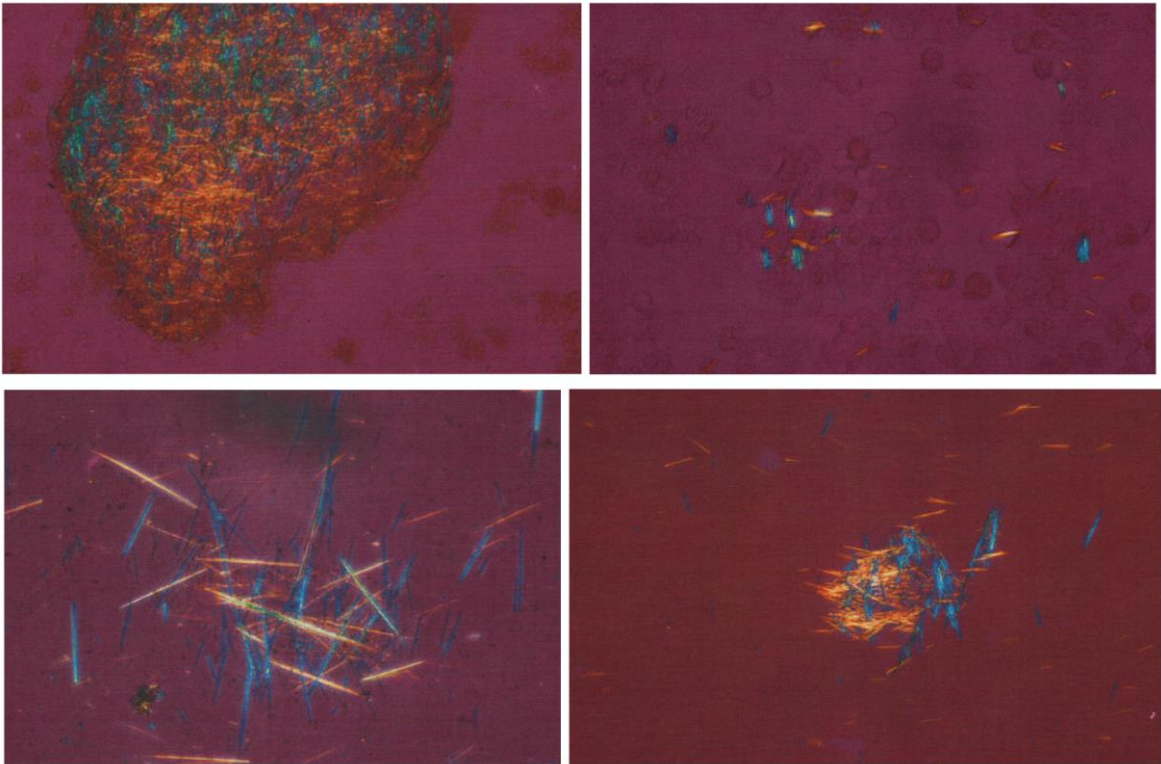
Bild 6: 40x objektiv

Artefakter





**Natriumuratkristaller**



**Kalciumpyrofosfatkristaller**

