

# Optimalisatie en validatie van Grocott kleuring met Bio-Optica kit

Romina Appelen - Anatomopathologie RZ Heilig Hart Tienen

## Introductie

### Grocott kleuring

= *Grocott's Methenamine Silver stain (GMS)*

Manuele kleuring die fungi opspoor in weefselcoupes waarbij zilverionen gaan neerslaan in de polysaccharidenwand van de aanwezige fungus. De polysacchariden in de celwand worden geoxideerd door perijodzuur en omgevormd tot aldehyde-groepen. De aldehydegroepen reduceren zilver ionen uit de methenamine-zilvernitraat-oplossing tot zwart metallisch zilver, dat nadien door goudchloride wordt omgezet naar een stabiel goud complex.

Door het stabiel goud complex krijgt men volgende aankleuring:

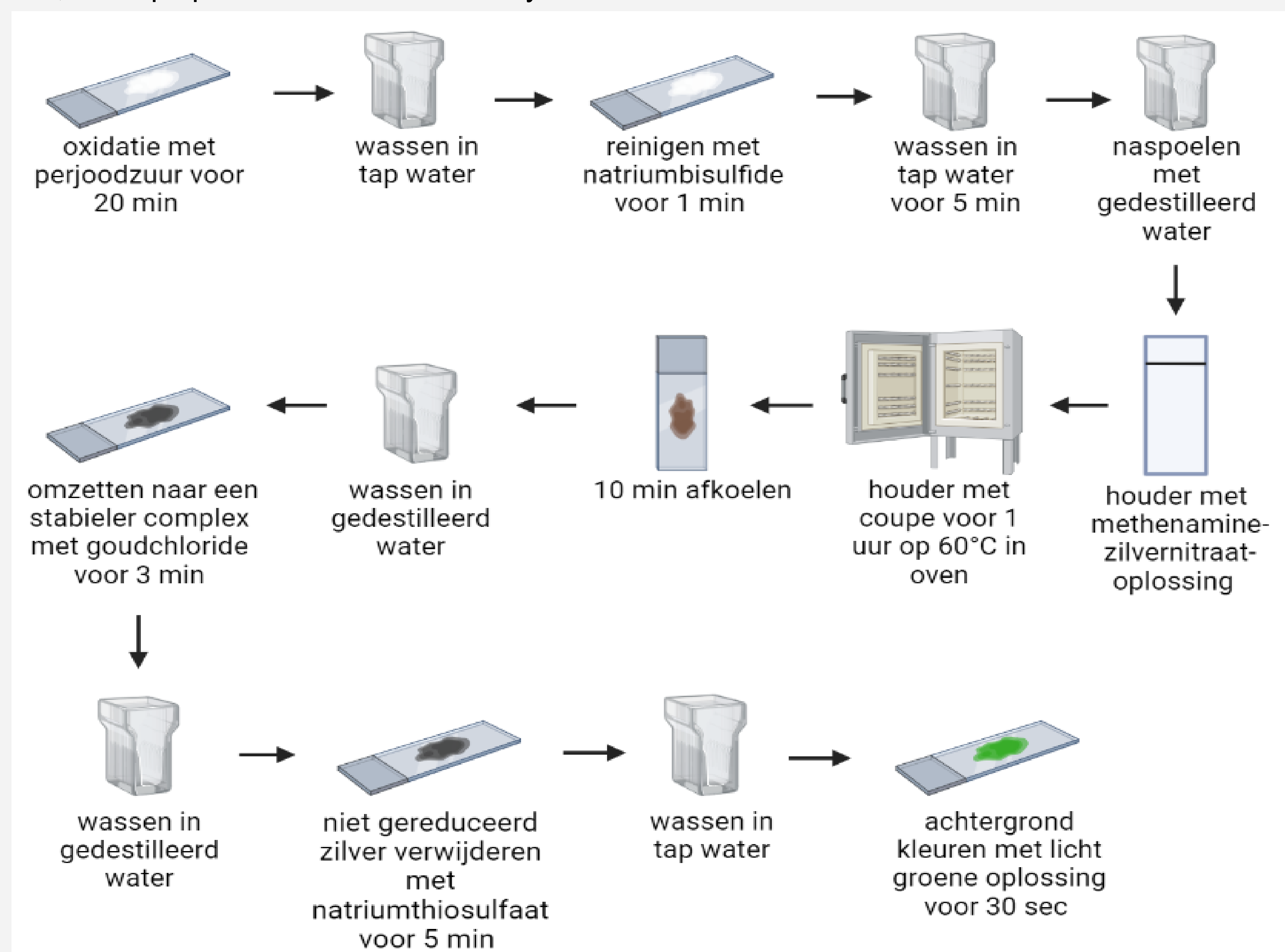
- Fungi kleurt zwart
- Mucine kleurt donker grijs
- Achtergrond kleurt groen

### Doel

Deze kleuring is een belangrijk aanvullend onderzoek om zeer kleine schimmelorganismen te detecteren. Door scherpe aflijning kunnen verschillende morfologische structuren van veelvoorkomende fungi benadrukt worden en kunnen ook niet-fungale pathogenen aankleuren. Onderscheid in morfologie van de aangekleurde elementen is belangrijk om verkeerde interpretatie te voorkomen. Verder zal daarom de optimalisatie en validatie van deze kleuring toegelicht worden.

## Materialen & Methode

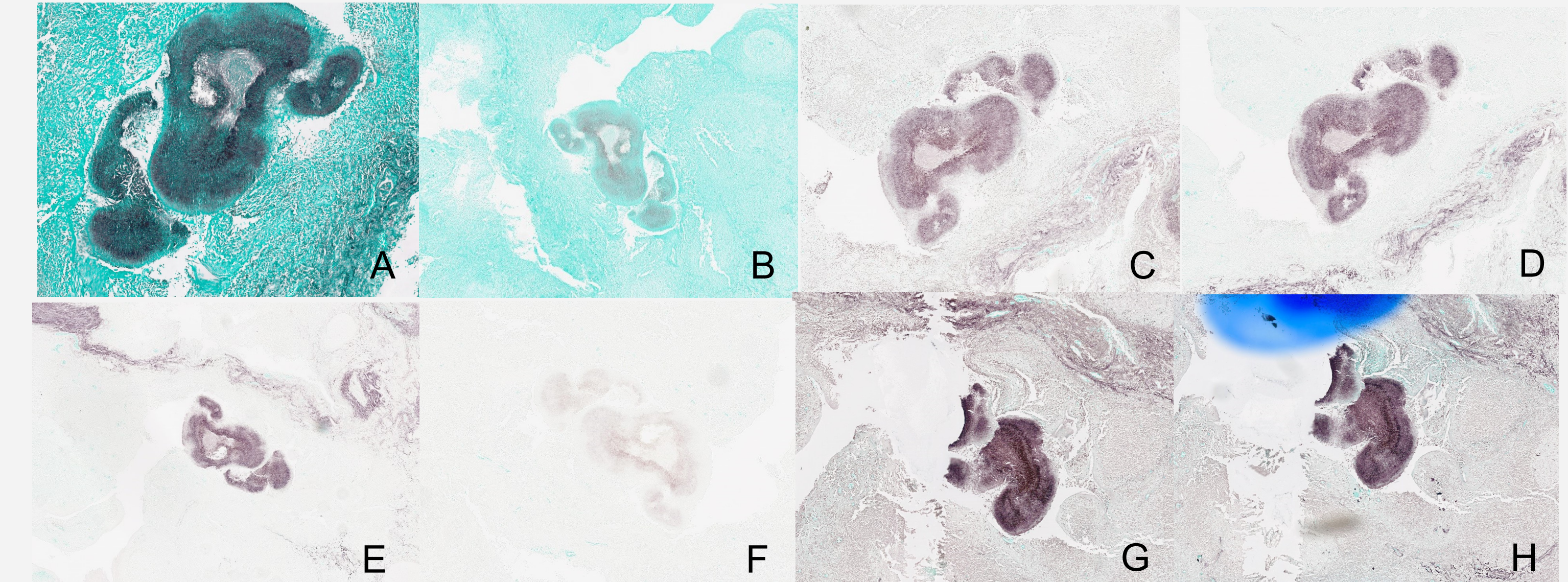
De gebruikte stalen werden beschikbaar gesteld uit het archief van het RZ Tienen. De optimalisatie stappen werden uitgevoerd op een tonsil weefsel. Voor de validatie werden zes verschillende weefsels gebruikt, voornamelijk afkomstig van slokdarm, wangslijmvlies en een sinus linker neusbijholte. De coupes werden gesneden met een microtoom op een dikte van 3 µm. Nadien werden de coupes aangebracht op een normaal draagglasje en verwarmd voor 40 min op 60°C, dit om de paraffine te laten smelten. Vervolgens werden de coupes gedeparaffineerd in het kleurtoestel, door middel van xyleen, een dalende alcoholreeks en gedestilleerd water. Na de dehydratie van het weefsel konden de coupes gekleurd worden, het verloop van de standaard methode is toegelicht in figuur 1. Na de kleuring werden de coupes gerehydrateerd met gedestilleerd water, een oplopende alcoholreeks en xyleen.



Figuur 1: Standaard protocol Grocott kleuring

## Resultaten

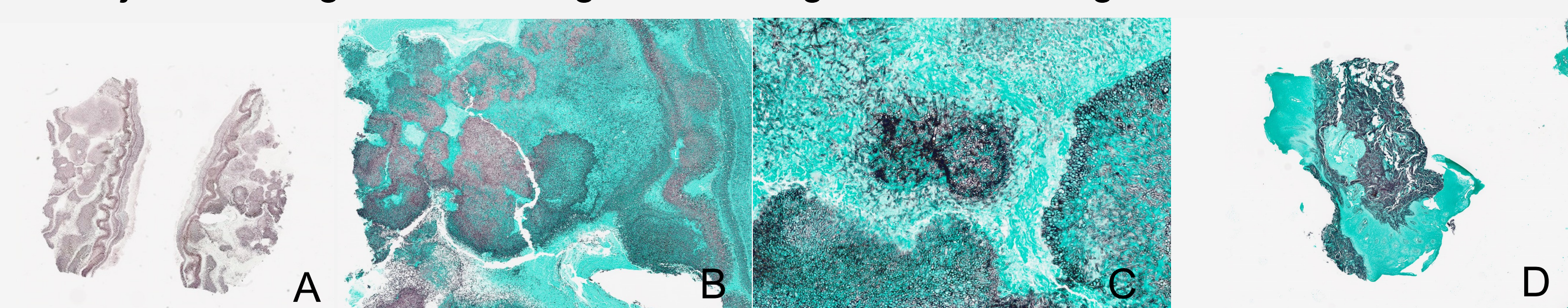
Er werden zeven verschillende optimalisatie stappen uitgevoerd, het resultaat van elke optimalisatie is zichtbaar in figuur 2A - 2H.



Figuur 2: Overzicht van de optimalisatie stappen 1 t.e.m. 7

A) Standaard methode, B) Optimalisatie 1, C) optimalisatie 2, D) Optimalisatie 3, E) Optimalisatie 4, F) Optimalisatie 5, G) optimalisatie 6, H) Optimalisatie 7

Aan de hand van juistheid en precisie wordt de validatie getoetst. Bij de eerste validatie, zichtbaar in figuur 3A, was er geen achtergrondkleuring zichtbaar, er werd een tweede validatie opgestart. De tweede validatie had door enkele aanpassingen duidelijk wel een groene achtergrondkleuring, zichtbaar in figuur 3B tot 3D.



Figuur 3: Overzicht validatie 1 en validatie 2.

A) Validatie 1: geen achtergrondkleuring aanwezig, B) Validatie 2: coupe precisie 1, C) Validatie 2: coupe precisie 2, D) Validatie 2: 1 v/d 5 coupes juistheid.

## Conclusie

- + Grocott kleuring is een belangrijke kleuring voor het opsporen en herkennen van fungi. De morfologische structuren zijn zeer goed afgeijnd waardoor een goed onderscheid tussen veelvoorkomende fungi mogelijk is.
- Zeer moeilijke kleur om te standaardiseren, omdat elk klein verschil in temperatuur of tijd een verschil in kleuring kan geven. Daarom moet elke stap zorgvuldig uitgevoerd worden.

Validatieplan is geslaagd, bij het protocol van optimalisatie 7

Achteraf werd er nog een kleine aanpassing toegevoegd waarbij de achtergrondkleuring beter tot zijn recht komt.

## Referenties

- 1) Bio-Optica Milano S.p.A. Grocott [Internet]. [Geraadpleegd op 27 mei 2022]. Beschikbaar op [https://www.bio-optica.it/ftp/Sito/technical\\_datasheet/043823\\_en.pdf](https://www.bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/043823_en.pdf)
- 2) Wright AM, Mody DR, Rose C, Anton, Schwartz MR. Aberrant staining with Grocott's methenamine silver: utility beyond fungal organisms. JASC. 13 oktober 2017; 6(6): 223-227.
- 3) Sigma-Aldrich. Silver stain (modified GMS) [Internet]. [Geraadpleegd op 27 mei 2022]. Beschikbaar op <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/163/815/ht100.pdf>
- 4) Prasad A. Grocott's Methenamine Silver Stain (GMS) [Internet]. [Geraadpleegd op 27 mei 2022]. Beschikbaar op <https://aladdincreations.com/grocotts-methenamine-silver-stain/>
- 5) Churukian C.J. Rapid Grocott's Methenamine-Silver Nitrate Method for Fungi and Pneumocystis carinii. AJCP. 1 september 1977; 68(3): 427-428.
- 6) Mahdani W, Soemarno T, Mertaniasih NM, Kawilarang P. Grocott-gomori methenamine silver stain; uncover fungal infections in granulomatous tissue biopsy specimens. JCMID. Januari 2015; 2(1): 15-18.