

Optimalisatie van de H&E-kleuringstechniek: Een Gecombineerde Benadering van Handmatige en Geautomatiseerde Methoden

Fadi MOUSSELLI, Sara LACEUR, Prof. dr. Wim WAELPUT, Prof. dr. Ramses FORSYTH

ABSTRACT

Ontsluit de sleutel tot levendigheid en precisie in weefselkleuring! Dit experiment richt zich op de revolutionaire optimalisatie van geavanceerde HE-kleuringstechnieken in het Anatomopathologie laboratorium. Ons doel? Het verminderen van overmatige blauw-paarse kleuring en het verbeteren van het contrast volgens strikte richtlijnen.

Betreed de boeiende wereld van levendig weefsel! Ons baanbrekende kleuringsproces neemt je mee door essentiële stappen, zoals fixatie, dehydratie, inbedding, snijden, en kleuring met hematoxyline en erythrosine. Maar dat is nog niet alles! We hebben controleweefsels toegepast en handmatige versus geautomatiseerde kleuringstechnieken vergeleken om de meest optimale resultaten te bereiken.

Onze ontdekkingen zullen je verbazen! Door eenvoudige aanpassingen in het protocol, zoals verkorte kleurtijden, hebben we de kleurintensiteit, de zichtbaarheid van kerndetails en chromatine en het kleurcontrast aanzienlijk verbeterd. Het resultaat? Levendigere uitkomsten en een optimaal kleurcontrast dat je zal betoveren en fascineren.

RESULTAAT

Bij handmatige kleuring worden in vergelijking met het 'Sakura'-kleurapparaat lichtere resultaten verkregen, waarbij de details van de cellen in tonsil (A) en huid (B) beter zichtbaar zijn met een verbeterd kleurcontrast, maar nog niet optimaal genoeg. Deze lichtere resultaten bij handmatige kleuring kunnen te wijten zijn aan het feit dat het apparaat mogelijk langer kleurt dan de werkelijke tijd, als gevolg van de 20% afwijking van het protocol in tabel 1.

Verdere optimalisatie: Hematoxyline- en bluing reagens zijn aangepast naar respectievelijk 4 min en 0,5 min. Resulteert in betere zichtbaarheid van kernen, duidelijkere chromatine en verbeterd contrast i.v.m. het vorige toegepaste manuele protocol. Als laatste optimalisatie stap is met 3 min erythrosine kleurtijd, samen met 4 min hematoxyline en 1 min bluing reagens, geeft optimale resultaten met een heel goede zichtbaarheid van kerndetails chromatine.

INLEIDING

Optimaliseer kleuringstechnieken voor nauwkeurige weefselinterpretatie in het Anatomopathologie laboratorium. Ons experiment richt zich op het verminderen van overmatige blauw-paarse kleuring in de geavanceerde HE-kleuring van paraffine coupes. We passen het kleuringsprotocol handmatig aan om duidelijk zichtbare kerncomponenten en specifieke kleurkenmerken van de extracellulaire matrix te bereiken. Ons doel is te voldoen aan de strenge normen van Sciensano voor kwaliteitsvolle kleuringstechnieken in Belgische laboratoria.

MATERIALEN & METHODEN

Ervaar het zorgvuldige proces achter het kleuren van weefselmonsters en ontdek de geheimen van weefselvisualisatie. Na fixatie met formaline ondergaan de weefsels een dehydratie- en zuiveringsproces om vetten en wasachtige stoffen te verwijderen. Vervolgens worden ze ingebed in paraffine en in dunne schijfjes gesneden voor microscopische analyse.

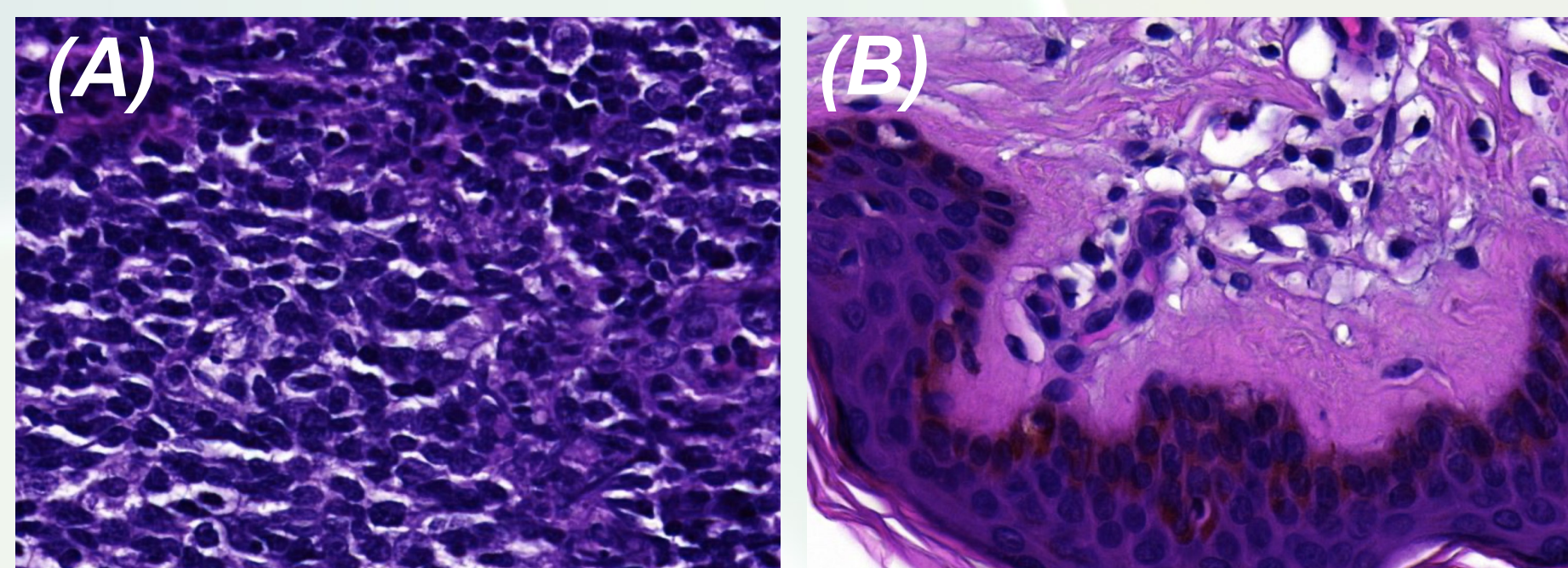
Het kleuringsproces maakt gebruik van hematoxyline, erythrosine, Nu-Clear en een bluing-reagens om de prachtige cel- en weefselstructuren te visualiseren. Door controleweefsels te gebruiken, wordt consistente kleuring en evaluatie van verschillende weefseltypen gewaarborgd.

Het protocol omvat zorgvuldige spoel- en onderdompelingsstappen, gevolgd door dehydratie en het monteren van het weefsel. Deze nauwgezette procedure resulteert in optimale kleurcontrasten en differentiatie van weefselstructuren.

| | |
|------------------------|---------------|
| Startstation | ** |
| Oven | 20 min (60°C) |
| Xyleen a | 3 min |
| Xyleen b | 3 min |
| Alcohol 100% | 1 min |
| Alcohol 90% | 1 min |
| Alcohol 70% | 1 min |
| Milli Q water | 1 min |
| Hematoxyline (Gill II) | 2 min |
| Stromend leidingwater | 2 min |
| Nu-Clear | 10 s |
| Stromend leidingwater | 1 min |
| Bluing reagens | 2 min |
| Stromend leidingwater | 2 min |
| Erythrosine | 2 min 30 s |
| Stromend leidingwater | 1 min |
| Alcohol 70% | 30 s |
| Alcohol 90% | 30 s |
| Alcohol 100% | 30 s |
| Alcohol 100% | 30 s |
| Xyleen | 40 s |
| Xyleen | 1 min 30 s |
| Eindstation | ** |

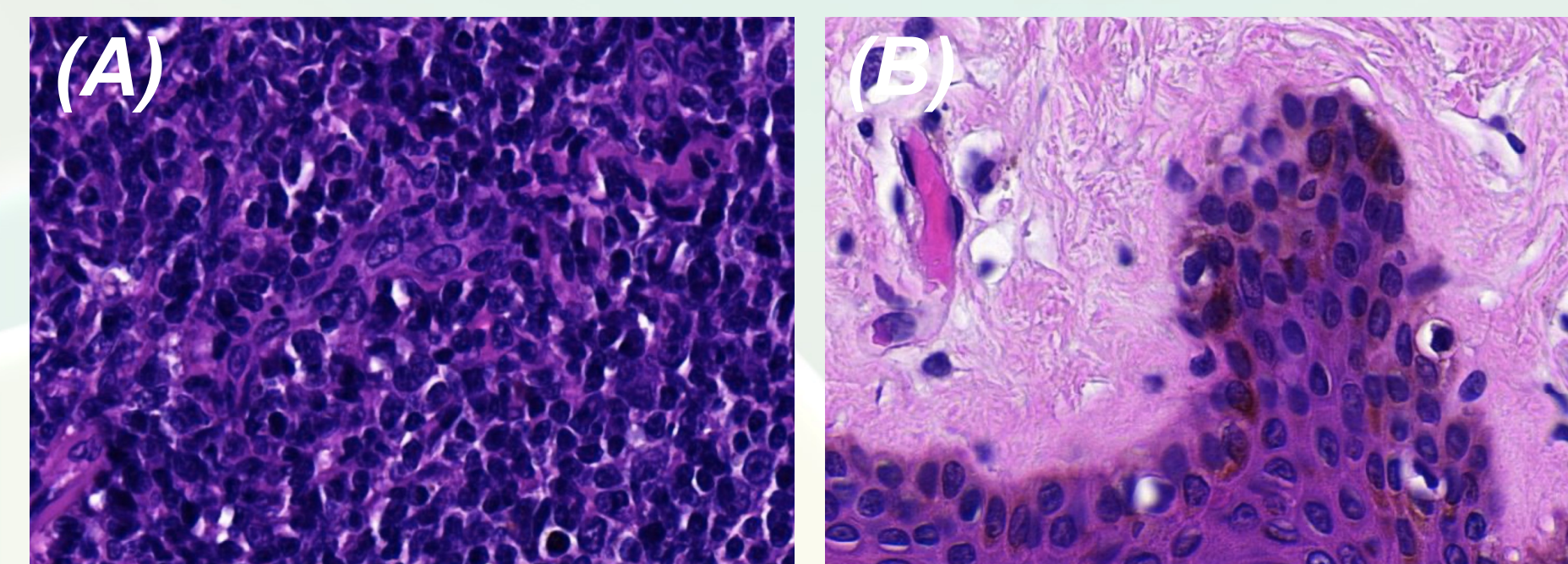
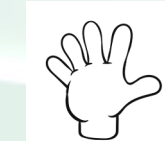
Tabel 1: Conventioneel protocol van Tissue-Tek Prisma 'Sakura', met gedetailleerde vermelding van de gebruikte oplossingen en bijbehorende tijdstippen, inclusief mogelijke afwijkingen met een marge van +/- 20% tijdens kleuren. Aangepaste tijdstippen voor enkele parameters worden verder toegepast.

GEAUTOMATISEERD PROTOCOL (SAKURA)



VS

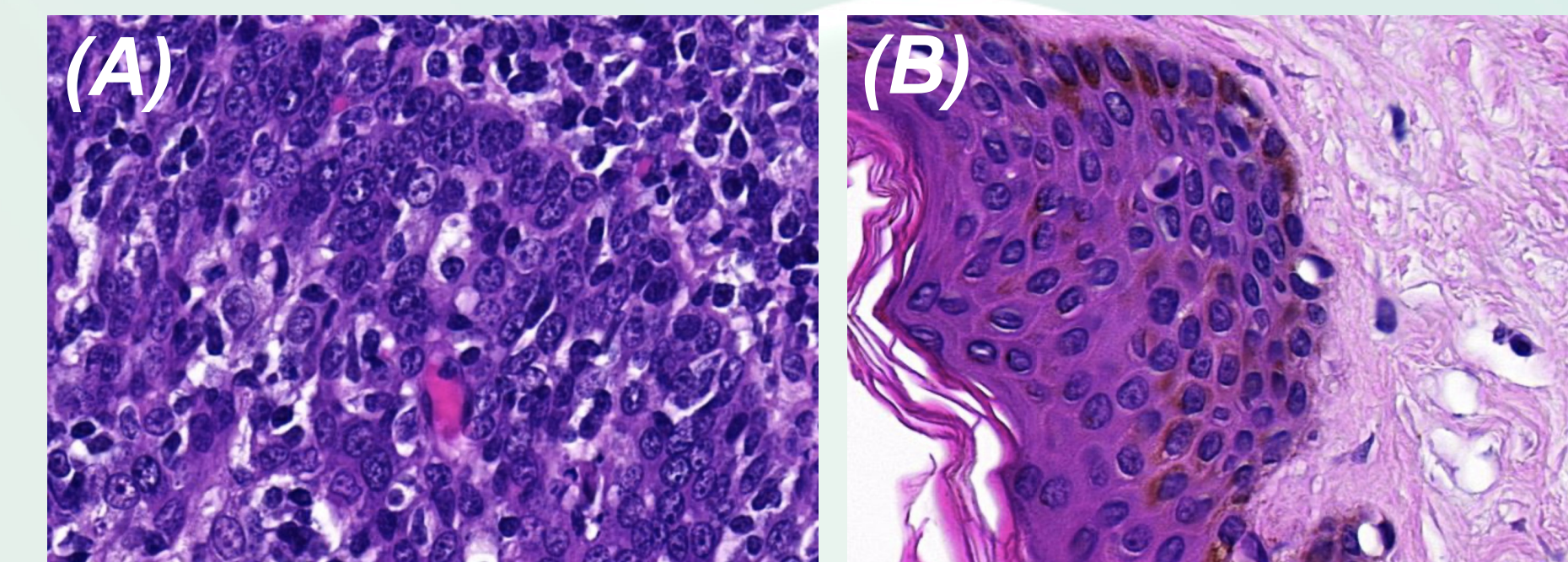
HANDMATIG UITGEVOERD PROTOCOL (SAKURA)



⇒

VERDERE HANDMATIGE AANPASSINGEN

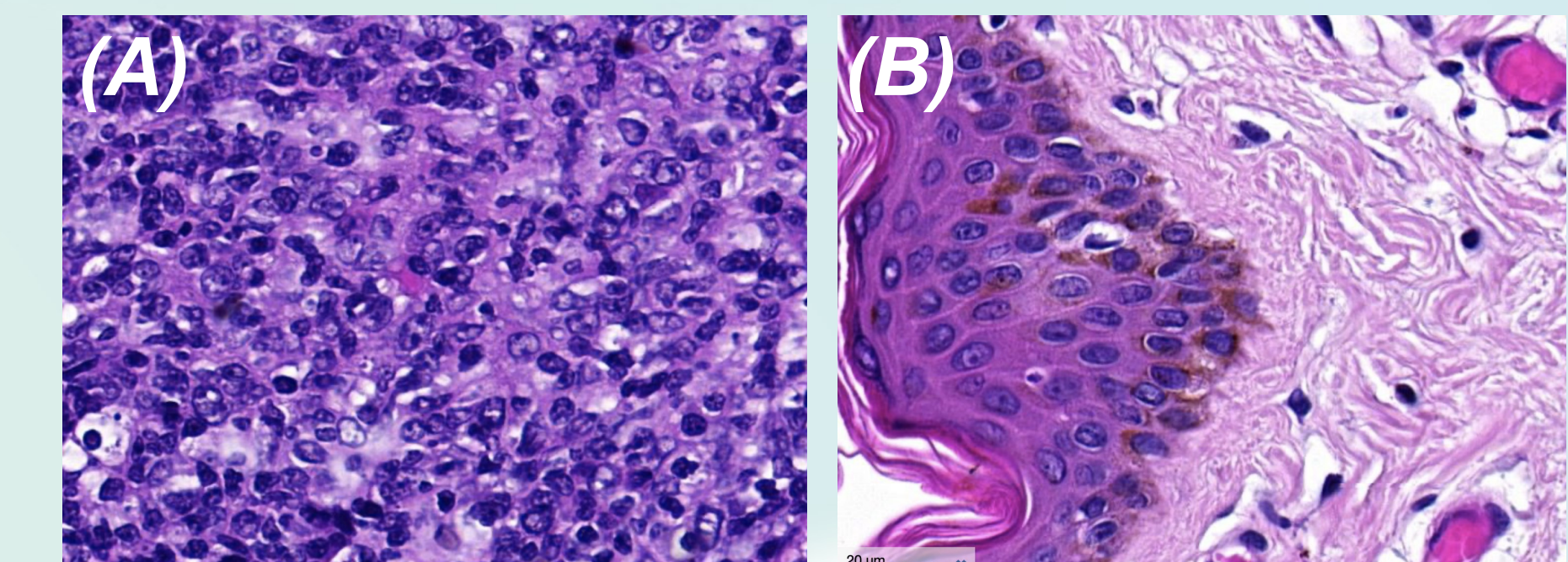
4 MIN HEMATOXYLINE
0,5 MIN BLUING REAGENS



⇒

VERDERE HANDMATIGE AANPASSINGEN

4 MIN HEMATOXYLINE
0,5 MIN BLUING REAGENS
3 MIN ERYTHROSINE



In de bovenstaande foto's worden achtereenvolgende experimenten geïllustreerd waarbij H&E-kleuring wordt toegepast op huid- en tonsilweefsel. Allereerst wordt een vergelijking gemaakt tussen handmatige en geautomatiseerde kleuringstechnieken. Vervolgens zijn verdere aanpassingen gedaan in de tijdstippen van het kleurproces.

CONCLUSIE

Optimalisatie van het kleurprotocol verbetert de zichtbaarheid en het kleurcontrast, wat resulteert in nauwkeurigere histologische beoordelingen van kerndetails en chromatine.

REFERENTIES:

N AY, C. Predictive Ability of Serum Uric Acid Levels in Assessing the Severity of Chronic Liver Disease. J Assoc Physicians India. 2023 Jan;71(1):1. <https://nl.wikipedia.org/wiki/Haematoxyline-eosine-kleuring>
Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. Methods Mol Biol. 2014;1180:31-43.
Dewaele K, Lagrou K, Frans J, Hayette MP, Vermeulen K. Hospital Laboratory Survey for Identification of Candida auris in Belgium. J Fungi (Basel). 2019 Sep 5;5(3):84.
Liu M, Zhao SQ, Yang L, Li X, Song X, Zheng Y, Fan J, Shi H. A direct immunohistochemistry (IHC) method improves the intraoperative diagnosis of breast papillary lesions including breast cancer. Discov Med. 2019 Jul;28(151):29-37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/>
Laboratorium Snp



SCAN ME!