

Optimalisatie en validatie van de hematoxyline-eosinekleuring

Eline Dewilde, Gerda Diricx — Labo Anatomopathologie

Inleiding

De hematoxyline-eosine kleuring is de meest gebruikte kleuring voor het bekijken van details in cel -en weefselstructuren in de histologie. Het is een eenvoudige kleuring met maar 2 kleurstoffen, maar toch varieert de intensiteit van de kleuring van laboratorium tot laboratorium; vaak zelf van laborant tot laborant.

Hematoxyline is basisch en kleurt bijgevolg de verschillende componenten van de kern paars, inclusief het heterochromatine en de nucleoli. Eosine is de meest gebruikte tegenkleuring en is een zure kleurstof die de verschillende soorten cytoplasmatische componenten waaronder collageen vezels, elastische vezels, spiervezels en rode bloedcellen met verschillende tinten roze kleurt.

Veranderingen in het uitzicht van chromatine, maar ook de vorm en grootte van de nucleus zijn belangrijke diagnostische kenmerken. Deze kleuring laat de anatoom-patholoog dus toe om een kwalitatieve analyse uit te voeren en een primaire diagnose te stellen. Een secundaire analyse zal echter steeds noodzakelijk zijn om de exacte pathologie te achterhalen. [1]

De huidige hematoxyline-eosine kleuring van het laboratorium met hematoxyline volgens de Gill-formatie en zelf aangemaakte eosine Y veroorzaken een achtergrondkleuring. Het doel van dit project is om na te gaan of de Tissue-Tek® H&E Staining Kit van Sakura een oplossing kan bieden voor deze achtergrondkleuring en dit proces te optimaliseren indien nodig.

Materiaal en methoden

Staalverwerking

- Controleweefsel: tonsillen
- Inbedden: Tissue-Tek VIP® (Sakura)
- Uitbedden: embedding center
- Kleurstoffen: Tissue-Tek® H&E Staining Kit (Sakura)
- Kleuring: Tissue-Tek Prisma® Plus Automated Slide Stainer (Sakura)
- Afplakken glaasjes: Tissue-Tek Film® Automated Coverslipper (Sakura)
- 4 runs met elk een verschillend protocol
- Validatie: anatoom-patholoog onderdeel van de Kwaliteitsdienst



Componenten Tissue-Tek® H&E Staining Kit (Sakura)

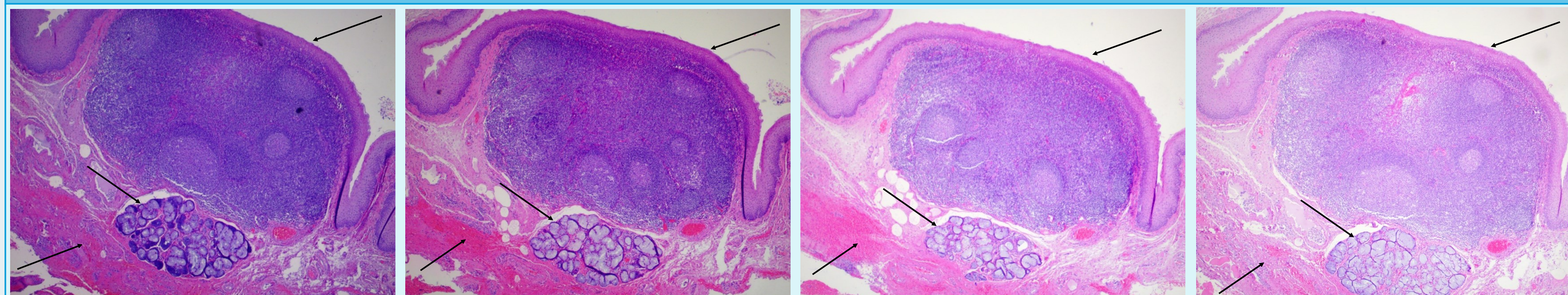


De Tissue-Tek Prisma® Plus Automated Slide Stainer (Sakura); geconnecteerd aan de Tissue-Tek Prisma® Plus Automated Slide Stainer (Sakura)

Protocol aangeraden hematoxyline-eosinekleuring Sakura

Stap	Reagens	Tijd	Duiding
1	Drogen	10 min	Drogen
2	Xyleen	3 min	Klaring I
3	Xyleen	3 min	
4	Ethanol 99,8%	3 min	Rehydratie
5	Ethanol 99,8%	3 min	
6	Ethanol 70%	2 min	
7	Wassen 1	2 min	Wasstap
8	Hematoxyline	5 min	Kernkleuring
9	Wassen 2	3 min	Bluing
10	Ethanol 70%	30 sec	Wasstap voor eosine
11	Eosine	3 min	Cytoplasmakleuring
12	Ethanol 70%	30 sec	Dehydratie
13	Ethanol 99,8%	2 min	
14	Ethanol 99,8%	2 min	
15	Xyleen	2 min	Klaring II
16	Xyleen	3 min	

Resultaten

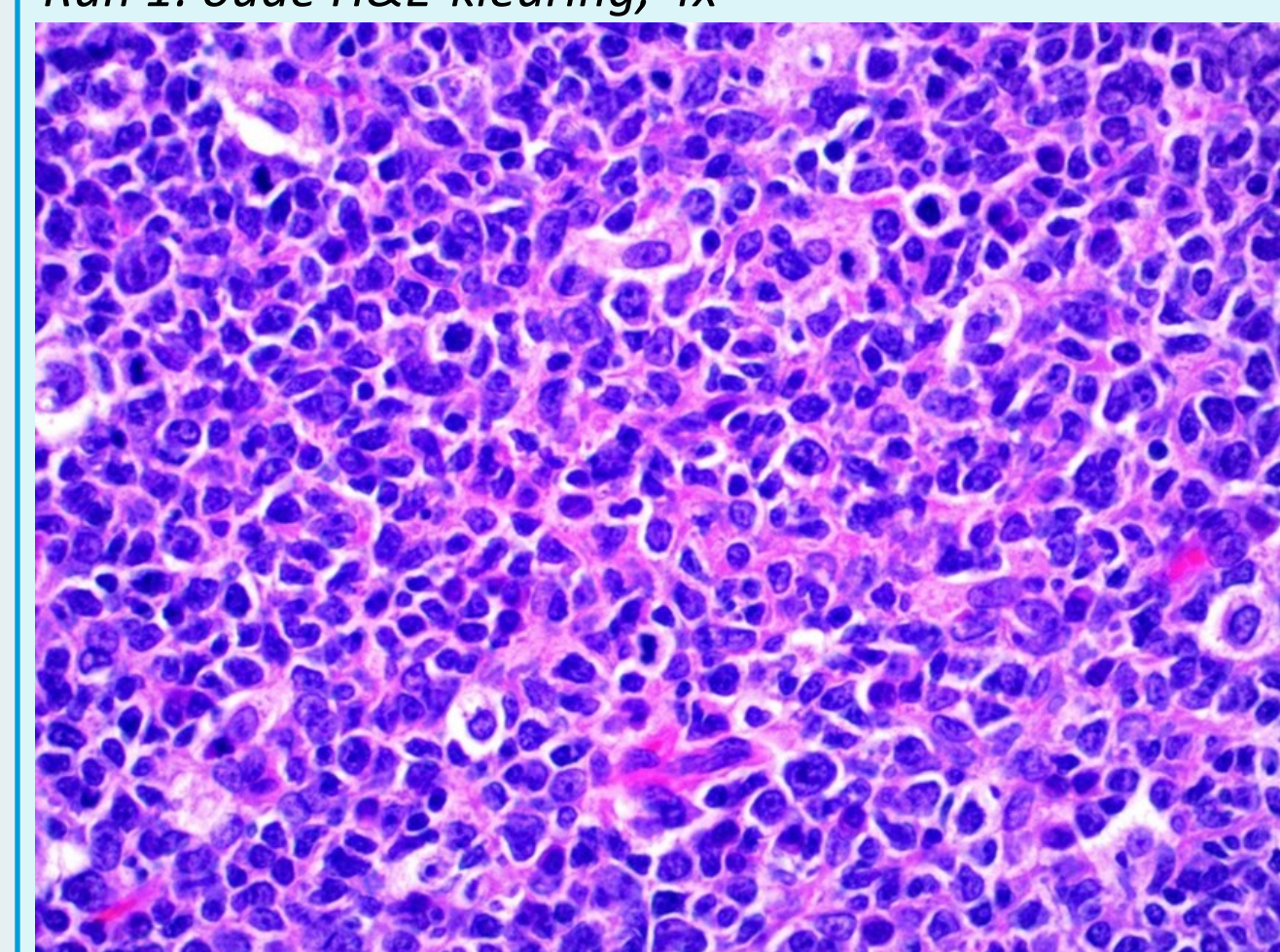


Run 1: oude H&E-kleuring, 4x

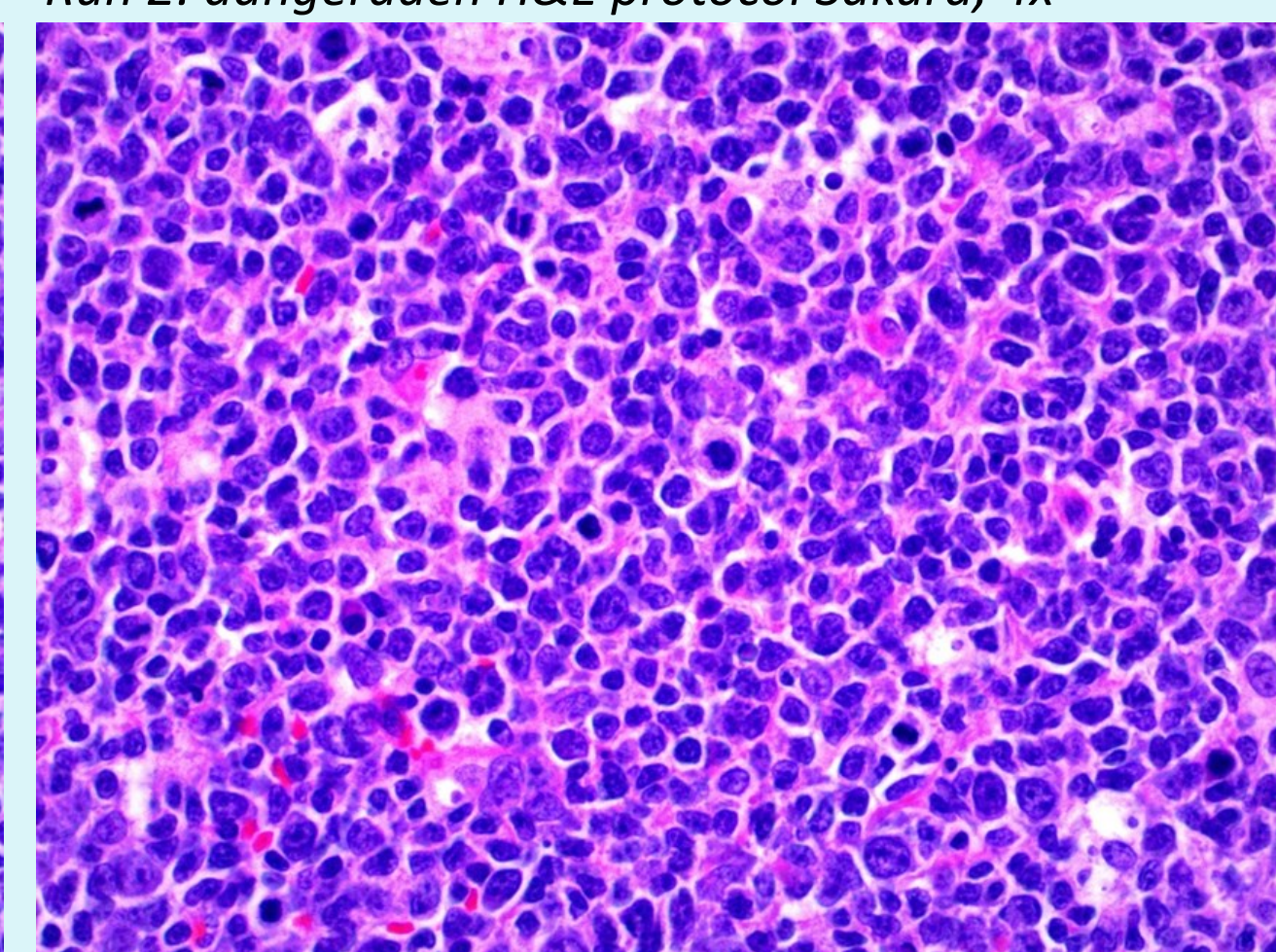
Run 2: aangeraden H&E protocol Sakura, 4x

Run 3: korter H&E protocol, 4x

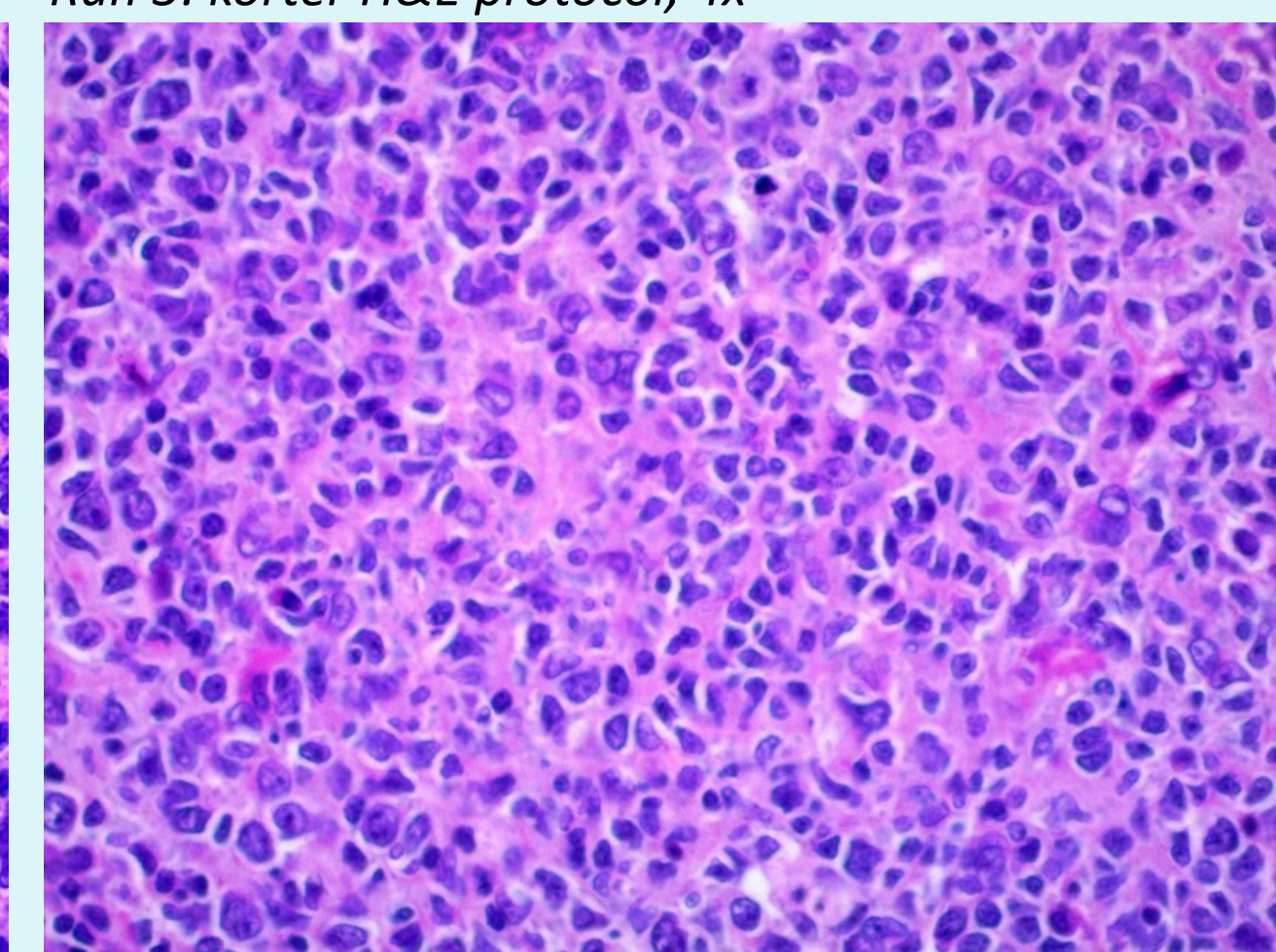
Run 4: langer H&E protocol, 4x



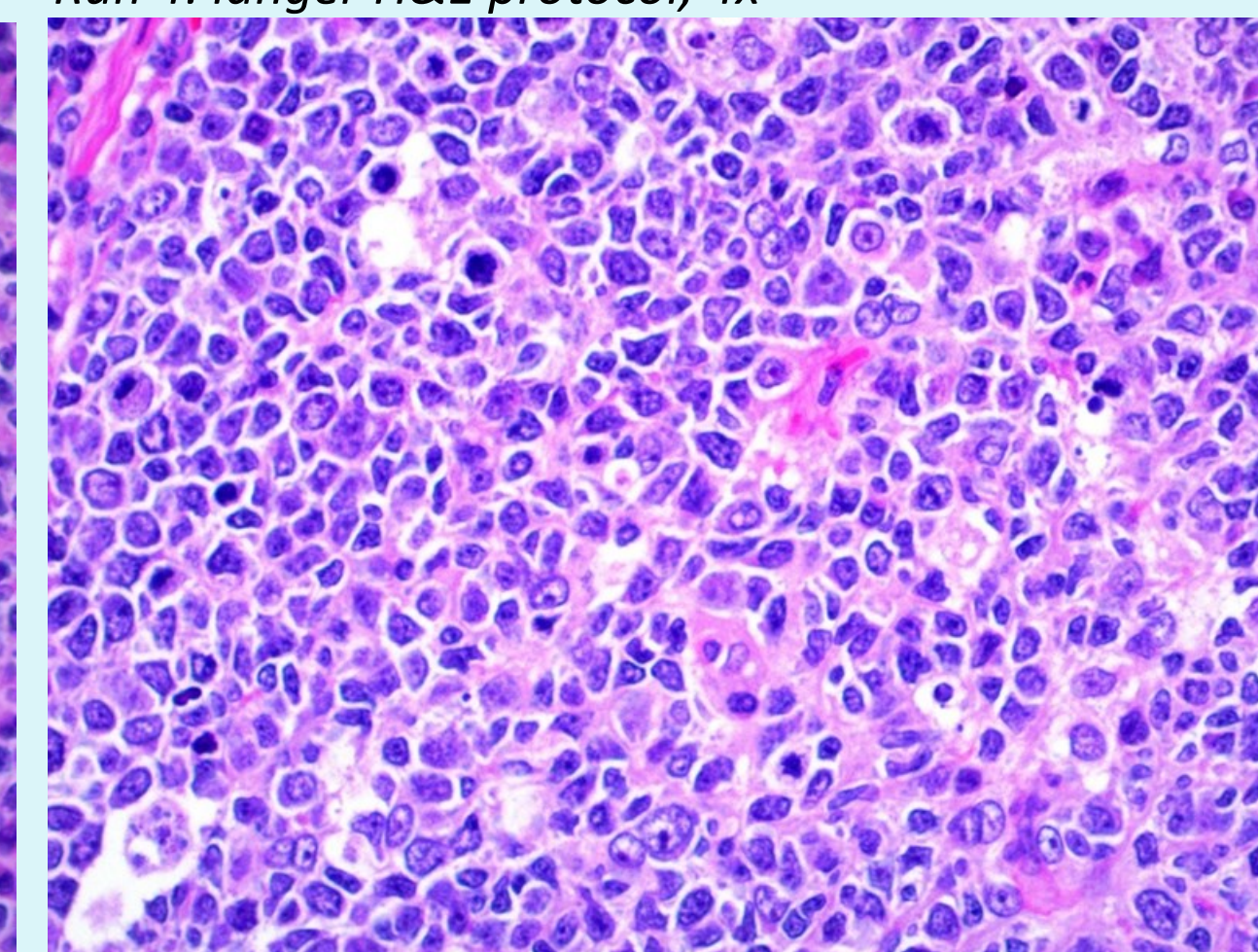
Run 1: oude H&E-kleuring, 40x



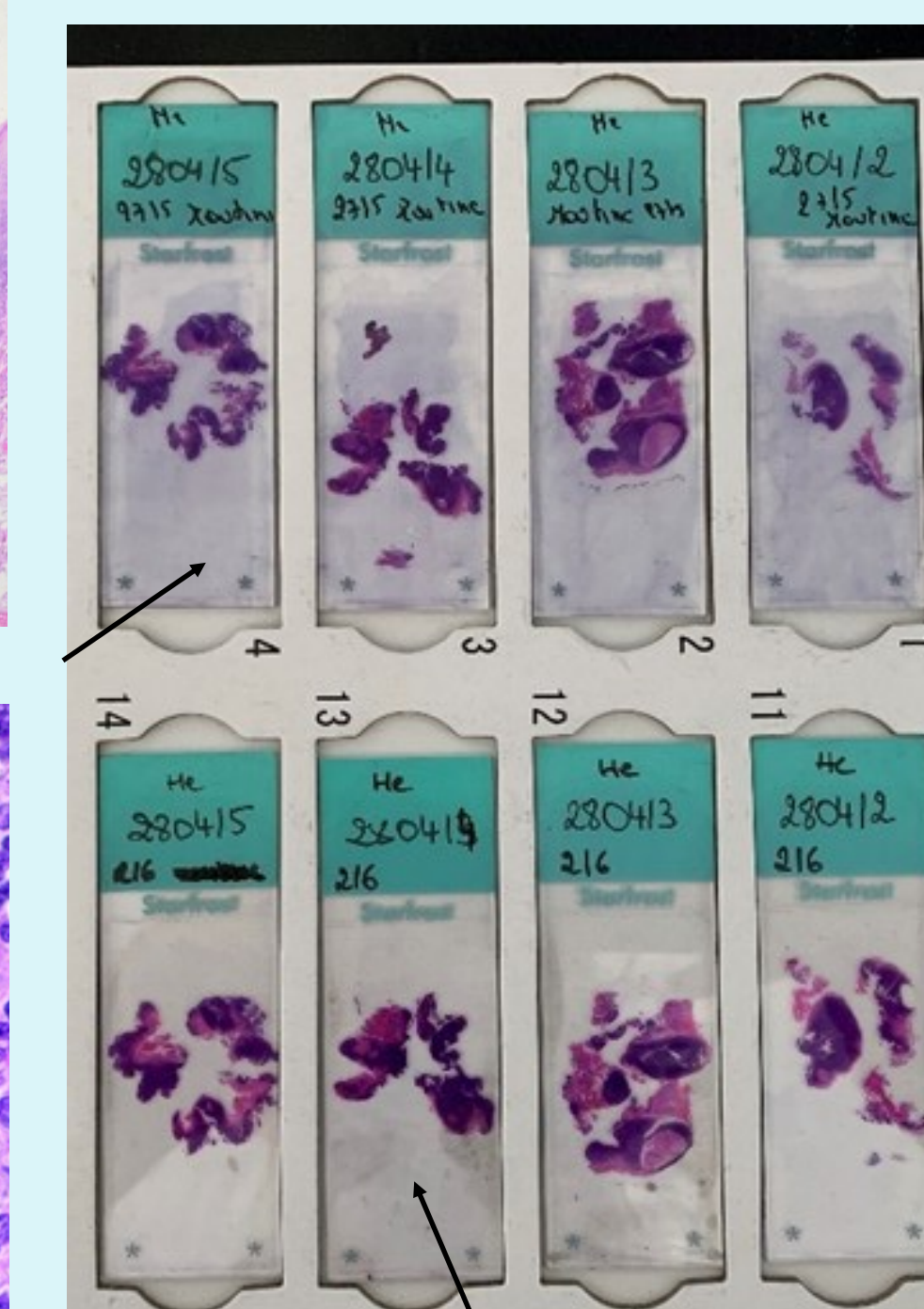
Run 2: aangeraden H&E protocol Sakura, 40x



Run 3: korter H&E protocol, 40x



Run 4: langer H&E protocol, 40x



Weefselcoupes run 1 links; weefselcoupes run 2 rechts

Conclusie

Coupes uit run 2 hebben de mooiste en meeste heldere kleur; er is ook geen achtergrondkleuring waarneembaar. Verder is hier ook het meeste contrast tussen de verschillende cel -en weefselonderdelen waardoor er meer detail waarneembaar is.

Coupes uit run 4 zijn gelijkaardig; enkel de structuren gekleurd door eosine hebben een felle roze tint, maar bevatten niet meer detail. Het is dus geen meerwaarde om de coupes langer in de kleurstoffen te laten zitten.

Er kan geconcludeerd worden dat de Tissue-Tek® H&E Staining Kit van Sakura tezamen met het aangeraden protocol van diezelfde firma het meest optimale resultaat geeft voor de H&E-kleuring.

Referenties

[1]Rolls, G. B., & Sampias, C. C. J. D. (2019, August 14). H&E Staining Overview: A Guide to Best Practices. Leica Biosystems. <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices/>

[2]Depovere J. Anatomopathologie: theorie

Editie 2019-2020. Leuven: Acco; 2019. p. 44-51