

## DOMAINE D'APPLICATION

A utiliser lors de la méthode de coloration de Gram pour la différenciation initiale des bactéries respectivement gram positifs et positifs.

## RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La coloration gram a été mise au point par Christian Gram en 1884. En effet, la méthode de coloration permet de différencier des bactéries intactes et morphologiquement semblables en deux groupes. Elle se base sur couleur de la paroi cellulaire après avoir utilisé la méthode de coloration. De plus, la morphologie cellulaire, et les détails de sa taille comme de sa structure sont évidents. Ces informations préliminaires peuvent fournir des indices initiaux à propos du ou des types d'organisme présents.

## PRINCIPE

Un complexe de violet de cristal-iodure se forme dans le protoplaste de tous les organismes colorés avec le protocole ci-dessus. Après décoloration, tous les organismes en mesure d'absorber ce complexe de coloration sont classés comme gram positifs. Par conséquent, tous les organismes décolorés qui absorbent le contre-colorant sont classés comme gram négatifs.

Lors de la disruption ou de l'élimination de la paroi cellulaire, le protoplaste des cellules gram positives et négatives ce qui entraîne la disparition de l'attribut gram négatif. Ainsi, le mécanisme de la coloration gram, s'avère être lié à la présence d'une paroi cellulaire intacte pouvant faire office de barrière pour la décoloration du colorant principal. En général, la paroi cellulaire n'est pas sélectivement perméable. En théorie, lors de la procédure de coloration gram, la paroi des cellules gram positives est déshydratée par l'alcool dans le décolorant et perd la perméabilité, tout en retenant le colorant principal. Au cas où cette paroi deviendrait plus perméable, en raison d'une teneur lipidique plus élevée, lors du traitement à l'alcool, la coloration primaire serait perdue tandis que le contre-colorant serait absorbé.

## REACTIFS

### Colorants prêts à l'emploi.

PL.7000	Violet de cristal	500 ml
PL.7001	Violet de cristal	1 litre
PL.7002	Violet de cristal	2 litres
PL.7000/25	Violet de cristal	250 ml
PL.7003	Iode de Gram	500 ml
PL.7004	Iode de Gram	1 litre
PL.7005	Iode de Gram	2 litres
PL.7003/25	Iode de Gram	250 ml
PL.7006	Différenciateur de Gram	500 ml
PL.7007	Différenciateur de Gram	1 litre
PL.7008	Différenciateur de Gram	2 litres
PL.7006/25	Différenciateur de Gram	250 ml
PL.7009	Rouge neutre	500 ml
PL.7010	Rouge neutre	1 litre
PL.7011	Rouge neutre	2 litres
PL.7009/25	Rouge neutre	250 ml
PL.7012	Safranine	500 ml
PL.7013	Safranine	1 litre
PL.7014	Safranine	2 litres
PL.7012/25	Safranine	250ml
PL.7015	Carbolfuchisine diluée	500 ml
PL.7016	Carbolfuchisine diluée	1 litre

PL.7017	Carbolfuchisine diluée	2 litres
PL.7015/25	Carbolfuchisine diluée	250 ml
PL.7052	Solution iodée de Lugol	500 ml
PL.7053	Solution iodée de Lugol	1 litre
PL.7053-2	Solution iodée de Lugol	2 litres
PL.7056	Iode acétone	500 ml
PL.7057	Iode acétone	1 litre
PL.7058	Iode acétone	2 litres
PL.7101	Fuchisine basique / Rouge neutre	500 ml
PL.7102	Fuchisine basique / Rouge neutre	1 litre
PL.7103	Fuchisine basique / Rouge neutre	2 litres
PL.7073	Violet de gentiane - Oxalate d'ammonium	500 ml
PL.7074	Violet de gentiane - Oxalate d'ammonium	1 litre
PL.7075	Violet de gentiane - Oxalate d'ammonium	2 litres
PL.7110	Colorant de Sandiford	500 ml
PL.7111	Colorant de Sandiford	1 litre
PL.7112	Colorant de Sandiford	2 litres
PL.7113	Violet de méthyle	500 ml
PL.7114	Violet de méthyle	1 litre
PL.7115	Violet de méthyle	2 litres
PL.7116	Safranine / Rouge neutre	500 ml
PL.7117	Safranine / Rouge neutre	1 litre
PL.7118	Safranine / Rouge neutre	2 litres
PL.7206	Différenciateur de Gram (Acétone)	500 ml
PL.7207	Différenciateur de Gram (Acétone)	1 litre
PL.7208	Différenciateur de Gram (Acétone)	2 litres
PL.7306	Différenciateur de Gram (SIM)	500 ml
PL.7307	Différenciateur de Gram (SIM)	1 litre
PL.7308	Différenciateur de Gram (SIM)	2 litres

### Colorants concentrés. Diluer dans un 1 litre de solution salée avant utilisation.

PL.8000	Violet de cristal	100 ml
PL.8001	Iode de gram	100 ml
PL.8002	Rouge neutre	100 ml
PL.8003	Safranine	100 ml
PL.8004	Carbolfuchisine diluée	100 ml
PL.8010	Iode de Lugol	100 ml
PL.8011	Violet de méthyle	100 ml

### Colorants concentrés. Diluer dans 4 litres de solution salée avant utilisation.

PL.8000-4.0	Violet de cristal	400 ml
PL.8001-4.0	Iode de gram	400 ml
PL.8002-4.0	Rouge neutre	400 ml
PL.8003-4.0	Safranine	400 ml
PL.8004-4.0	Carbolfuchisine diluée	400 ml
PL.8010-4.0	Iode de Lugol	400 ml
PL.8011-4.0	Violet de méthyle	400 ml

### Colorants concentrés. Diluer dans 5 litres de solution salée avant utilisation.

PL.8000-5.0	Violet de cristal	500 ml
PL.8001-5.0	Iode de gram	500 ml
PL.8002-5.0	Rouge neutre	500 ml
PL.8003-5.0	Safranine	500 ml
PL.8004-5.0	Carbolfuchisine diluée	500 ml
PL.8010-5.0	Iode de Lugol	500 ml
PL.8011-5.0	Violet de méthyle	500 ml

## Kits de coloration (Prêts à l'emploi)

PL.8055/25	Kit de colorants – Violet de cristal, 250 ml, iode de Gram 250 ml, différenciateur de Gram 250 ml, Safranine 250 ml.
PL.8056/25	Kit de colorants gram – Violet de cristal, 250 ml, iode de Gram 250 ml, différenciateur de Gram 250 ml, Safranine 250 ml.
PL.8057/25	Kit de colorants gram – Violet de cristal, 250 ml, iode de Gram 250 ml, différenciateur de Gram 250 ml, Safranine 250 ml.

## Huile à immersion (Risque réduit - sans DBP)

PL.396	Huile à immersion	50 ml
--------	-------------------	-------

## MESURES DE SECURITE

1. Les colorants gram de Pro-Lab Diagnostic sont offerts uniquement en tant que matériel *in vitro* et ne doivent, en aucun cas, être utilisés à des fins curatives ou prophylactiques.
2. Pendant et après l'utilisation, traiter tous les matériaux selon les bonnes pratiques de laboratoire sans jamais oublier que la substance test doit être considérée comme potentiellement infectieuse si elle n'est pas convenablement manipulée.
3. Ce dispositif présente le même risque environnemental que les échantillons cliniques utilisés avec ce dernier. Tous les réactifs doivent être considérés comme potentiellement infectieux : les manipuler, les traiter et les éliminer selon les règles de sécurité en vigueur. L'impact environnemental existe et peut être minimisé par une élimination adéquate.

## STABILITE ET CONSERVATION

Température ambiante. Tenir à l'abri de toute source de feu et des rayons solaires directes. Conservés dans ces conditions, les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

## PRELEVEMENT DES SPECIMENS ET MISE EN CULTURE

Consulter un texte de microbiologie standard.

## MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Lames en verre propres, boucle d'ensemencement stérile, ogive / air chaud, portoir de coloration, huile d'immersion, microscope, papier buvard un substitut équivalent.

## PROCEDURE

1. Préparer un frottis fin et uniforme de spécimen et laisser sécher à l'air libre.
2. Fixer à chaud et laisser refroidir.
3. Inonder la lame de violet de gentiane ou de violet de méthyle et laisser reposer pendant 1 minute. Rincer à l'eau.
4. Inonder la lame d'iode de Gram ou de solution iodée de Lugol et laisser reposer pendant 1 minute. Rincer à l'eau.
5. Décolorer délicatement au différenciateur pendant environ 10 secondes ou à l'iode acétone pendant 1 minute. Rincer à l'eau.
6. Inonder la lame au contre-colorant et laisser reposer pendant 30 à 60 secondes.
7. Bien rincer à l'eau et buvarder délicatement.



- Observer au microscope à immersion d'huile.

### CONTROLE DE QUALITE

L'âge des cultures et le pH du milieu où prolifèrent les bactéries peuvent influencer de façon marquée leur réaction à la coloration gram. Utiliser des cultures fraîches de la veille (24 heures au maximum).

Cultures CQ recommandées ;

- *Escherichia coli* NCTC 10418 (Bacilles gram négatif de rose à rouge)
- Oxford *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (Coques positifs de bleu à pourpre)
- Streptocoque hémolytique groupe A NCTC 8198 (Coques positifs de bleu à pourpre)

### INTERPRETATION DES RESULTATS

Organismes positifs gram – Bleu à pourpre.





Organismes gram négatifs – Rose à rouge.

### LIMITES

- Des faux résultats de coloration gram négatifs et positifs peuvent apparaître en raison des débris cellulaires colorés par lors de la mise application de cette technique. Ex – Les noyaux et le protoplasme de cellules leucocytes et épithéliales sont colorés avec le contre-colorant. Des particules solides peuvent également être colorées par le violet de cristal.
- Le colorant gram ne permet d'obtenir que des données d'identification préliminaires et ne peut en aucun cas remplacer la culture des spécimens.

### BIBLIOGRAPHIE

1. Manual of Clinical Microbiology. Lennette.
2. The Practice of Medical Microbiology. 12th Edition. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.

	= Fabricant
	= Dispositif medical de diagnostic in vitro
	= Limite de temperature
	= Consulter la notice d'utilisation

***Ce mode d'emploi est une traduction professionnelle de la version anglaise d'origine. En cas d'ambiguïté ou de divergence flagrante, veuillez consulter le Service de soutien de Pro-Lab.***