

## Protocole n° 10

### Coloration de Gram-Hücker

#### Principe :

La coloration de Gram-Hücker est une coloration différentielle qui repose sur la perméabilité de la paroi bactérienne. Les colorants utilisés ne colorent pas la paroi bactérienne, mais sa structure détermine la positivité ou la négativité du Gram. Le Liquide de lugol (mordant) permet de former un complexe intracellulaire avec le Cristal violet oxalate.

Dans le cas des bactéries à Gram négatif, la perméabilité plus grande de la paroi permet à l'alcool d'éliminer ce complexe. Les bactéries à Gram négatif fixent alors la Safranine et apparaissent colorées en rose-orangé.

Les bactéries à Gram positif, dont la perméabilité de la paroi est moins importante, ne sont pas décolorées par l'alcool et restent colorées en violet.

#### Produits nécessaires à la coloration :

Cristal violet oxalate Réf. 361490-	0240, 1000 ou 2500 mL
Liquide de lugol Réf. 367300-	0240, 1000 ou 2500 mL
Liquide de lugol stabilisé PVP Réf. 367400-	0240, 1000 ou 2500 mL
Différenciateur rapide (alcool/acétone) Réf. 361510-	0240, 1000 ou 2500 mL
Différenciateur lent (alcools) Réf. 363030-	0240, 1000 ou 2500 mL
Safranine Réf. 361500-	0240, 1000 ou 2500 mL

#### Préparation des échantillons :

Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire, en l'application de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, J.O. n° 287 du 11 décembre 1999. Il est nécessaire de réaliser une fixation préalable à la chaleur et à l'alcool à chaud. (cf. Note 03 : Fixation des frottis, préalable aux colorations en bactériologie)

#### Mode opératoire :

Veillez lire attentivement l'intégralité des informations qui suivent avant d'utiliser le produit.

- Placer le frottis fixé sur le support de coloration.
- Recouvrir la lame avec le Cristal violet oxalate pendant 1 minute.
- Rejeter le colorant et Rincer à l'eau courante pour éliminer toute trace de Cristal violet oxalate en excès.
- Rincer avec un jet de Liquide de lugol pour éliminer toute trace d'eau.
- Recouvrir la lame avec le Liquide de lugol pendant 30 secondes à 1 minute.
- Rincer abondamment à l'eau courante.
- Décolorer en ajustant les temps selon l'épaisseur du frottis et la technique :
  - Différenciateur rapide (alcool/acétone) entre 2 et 5 secondes
  - Ou Différenciateur lent (alcools) entre 20 et 40 secondes puis rincer rapidement à l'eau courante.
- Recouvrir la lame avec la Safranine pendant 1 minute.
- Rincer brièvement à l'eau courante et laisser sécher le frottis.
- Lecture au microscope, objectif x100 à immersion.

#### Résultats :

Bactéries à Gram Positif : violet.

Bactéries à Gram Négatif : rose-orangé.

#### Recommandations et/ou notes d'utilisation :

Produit destiné à un usage exclusivement professionnel pour le Diagnostic in vitro. L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par une entreprise spécialisée et agréée.

Température de stockage : 15 – 25 °C.

L'addition de Polyvinylpyrrolidone (PVP) dans le Liquide de lugol permet de supprimer la tension de vapeur de l'iode et assure une bonne conservation de la solution prête à l'emploi, en flacon plastique.

On peut améliorer la netteté en observant au microscope en lumière verte (filtre vert ou filtre jaune superposé au bleu). Le contraste dépend de la manière dont est conduite la différenciation.

Le genre *Campylobacter* est mal coloré par la Safranine.

Le genre *Legionella* ne se colore pas.

#### Références Bibliographiques :

CLARK G., Staining Procedures, Williams & Wilkins, 4<sup>ème</sup> éd., 1981, p. 377-379.

VASTEL C.L., Coloration Gram-Hücker, Le Tech. Biol., n° 5, 1978, p. 243-245.