

## INDICATIONS

Les réactifs de coloration de Gram Sigma-Aldrich servent à délimiter les organismes à Gram positif et à Gram négatif dans les frottis et les tissus. Les réactifs de coloration de Gram sont destinés à un « usage diagnostique in vitro ».

La coloration de Gram est utilisée en clinique pour délimiter deux groupes de micro-organismes distincts. Ceux qui retiennent le colorant primaire (cristal violet) sont dits à Gram positif. Ceux qui perdent le colorant primaire au cours d'une étape de décoloration sont dits à Gram négatif. Les mécanismes qui permettent aux organismes à Gram positif de retenir le colorant primaire sont inconnus, bien que la chimie et la structure des parois cellulaires y jouent très certainement un rôle.

De nombreuses modifications de la méthode originale de Gram<sup>1</sup> ont été décrites. La procédure Sigma-Aldrich se base sur les travaux de Hucker et Conn<sup>2</sup>, en utilisant une solution cristal violet -oxalate d'ammonium assez stable qui facilite la différenciation.

## RÉACTIFS

### SOLUTION DE CRISTAL VIOLET, référence N° HT90-1

Cristal violet certifié à 2,3 %, oxalate d'ammonium à 0,1 % et alcool éthylique à 20 %, spécialement dénaturé 3A.

### SOLUTION IODÉE DE GRAM, référence N° HT90-2

Iode à 0,33 % et iodure de potassium à 0,66 %.

### SOLUTION DE DÉCOLORATION, référence N° HT90-3

**Nécessaire pour les frottis uniquement.**

Alcool isopropylique à 75 % et acétone à 25 %.

### SOLUTION DE SAFRANINE O, référence N° HT90-4

Safranine certifiée, 0,6 % dans de l'alcool éthylique à 20 %, spécialement dénaturé 3A.

### SOLUTION DE TARTRAZINE, référence N° HT30-2-8

**Nécessaire pour les tissus uniquement.**

Tartrazine à 0,25 % et acide acétique à 0,25 %.

### CONSERVATION ET STABILITÉ :

Conserver à température ambiante (18–26 °C). L'étiquette du réactif porte une date de péremption. Utiliser une seule fois et jeter.

### PRÉPARATION :

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

### PRÉCAUTIONS :

Suivre les précautions habituelles observées lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets selon les règlements locaux, départementaux, régionaux ou nationaux en vigueur. Pour des informations actualisées sur les risques ou la sécurité, se reporter à la fiche technique du produit.

Les lames de contrôle TISSUE - TROL par coloration de Gram sont des coupes de tissus animaux incluses en paraffine contenant des bactéries gram-négatives et gram-positives et doivent être considérées comme potentiellement infectieuses.

### Informations sur les risques et la sécurité (États-Unis)

La solution de cristal violet est **COMBUSTIBLE** et **IRRITANTE**. Irritant pour les voies respiratoires et la peau. Risque de lésions oculaires graves. Effet cancérigène suspecté – preuves insuffisantes. Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité.

Solution iodée de Gram. Attention : cette substance n'a pas encore été testée entièrement.

La solution de décoloration est **INFLAMMABLE** et **IRRITANTE**. Facilement inflammable. Irritant pour les voies respiratoires et la peau. Risque de lésions oculaires graves. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié. Conserver le récipient bien fermé et dans un endroit bien ventilé.

La solution de safranine O est **INFLAMMABLE** et **NOCIVE**. Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Nocif : possibilité d'effets irréversibles par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

L'alcool réactif est **INFLAMMABLE** et **IRRITANT**. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié. Organes cibles : nerfs et foie.

Le xylène est **INFLAMMABLE** et **NOCIF**. Risque possible d'altération de la fertilité. Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant. Nocif par inhalation et par contact avec la peau. Irritant pour les voies respiratoires et la peau. Risque de lésions

oculaires graves. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

L'acétone est **INFLAMMABLE** et **IRRITANTE**. Irritant pour les yeux. L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau. L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges. Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Organes cibles : foie et reins.

Informations sur les risques et la sécurité (Europe) (Attention : ces substances n'ont pas encore été testées entièrement)

La solution de cristal violet est **NOCIVE**. Inflammable. Effet cancérigène suspecté – preuves insuffisantes. Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité.

Solution iodée de Gram. Attention : cette substance n'a pas encore été testée entièrement.

La solution de décoloration est **INFLAMMABLE** et **IRRITANTE**. Facilement inflammable. Irritant pour les voies respiratoires et la peau. Risque de lésions oculaires graves. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié.

La solution de safranine O est **INFLAMMABLE**. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer.

L'alcool réactif est **FACILEMENT INFLAMMABLE** et **IRRITANT**. Facilement inflammable. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié.

Le xylène est **NOCIF**. Inflammable. Nocif par inhalation et par contact avec la peau. Irritant pour la peau. Éviter le contact avec les yeux.

L'acétone est **FACILEMENT INFLAMMABLE** et **IRRITANTE**. Facilement inflammable. Irritant pour les yeux. L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau. L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges. Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un spécialiste.

## PROTOCOLE

### PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS :

Il est recommandé de prélever et de conserver les échantillons conformément au document M29-A2 du NCCLS. Aucune méthode d'analyse actuelle ne garantit totalement que les échantillons de sang ou de tissus ne transmettent pas d'agents infectieux. Par conséquent, tous les échantillons de sang ou de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

**Frottis** : Tous les frottis bien préparés, fixés à la chaleur sont acceptables. L'épaisseur du frottis peut influencer la durée nécessaire pour la décoloration.

**Tissus** : Toute coupe de tissu incluse en paraffine bien fixée et épaisse de 5 microns.

### MATÉRIELS SPÉCIFIQUES NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

Des lames de contrôle positif doivent être incluses dans chaque essai  
ALCOOL, ABSOLU  
ACÉTONE, DE QUALITÉ ACS  
XYLÈNE  
Microscope

### REMARQUES :

Veiller à éviter une décoloration excessive des lames avec la solution de décoloration. Même les organismes à Gram positif perdront leur couleur et deviendront rouges si la solution de décoloration est laissée trop longtemps sur la lame.<sup>4</sup>

Les données obtenues par cette procédure permettent uniquement de faciliter le diagnostic et doivent être révisées conjointement à d'autres tests ou informations sur les diagnostics cliniques.

### PROTOCOLE :

#### PROCÉDURE POUR LES FROTTIS :

1. Plonger le frottis dans la solution de cristal violet, référence N° HT90-1, pendant **1 minute**.
2. Rincer minutieusement à l'eau déionisée.
3. Plonger le frottis dans la solution iodée de Gram, référence N° HT90-2, pendant **1 minute**.
4. Rincer minutieusement à l'eau déionisée.
5. Plonger dans la solution de décoloration, référence N° HT90-3, pendant **10 secondes** maximum, jusqu'à ce que la couleur cesse de s'estomper.
6. Rincer minutieusement à l'eau déionisée.
7. Plonger le frottis dans la solution de safranine O, référence N° HT90-4, pendant **1 minute**.
8. Rincer minutieusement à l'eau déionisée.
9. Laisser sécher à l'air libre et examiner le frottis au microscope.

## PROCÉDURE POUR LES TISSUS :<sup>3</sup>

1. Déparaffiner et hydrater les coupes avec de l'eau déionisée.
2. Placer les lames dans un support pour coloration et recouvrir les coupes de solution de cristal violet, référence N° HT90-1 pendant **1 minute**.
3. Vider la solution de cristal violet et rincer minutieusement dans de l'eau déionisée.
4. Mordancer dans la solution iodée de Gram, référence N° HT90-2, pendant **5 minutes**.
5. Rincer les coupes à l'eau déionisée et absorber l'eau à l'aide d'un buvard.
6. Différencier dans de l'alcool absolu ou de l'acétone.
7. Rincer à l'eau déionisée.
8. Recouvrir les lames de solution de safranine O, référence N° HT90-4, pendant **30 à 60 secondes**.
9. Rincer les coupes à l'eau déionisée et absorber l'eau à l'aide d'un buvard.
10. Recouvrir les coupes de solution de tartrazine, référence N° HT30-2, pendant **5 à 10 secondes**.
11. Absorber l'excès de colorant à l'aide d'un buvard.
12. Rincer dans de l'alcool absolu changé deux fois.
13. Nettoyer dans du xylène et monter.

---

## PERFORMANCE

---

Organismes à Gram positif – Violet

Organismes à Gram négatif – Rouge

Si les résultats observés sont différents des résultats escomptés, contacter le service technique Sigma-Aldrich pour obtenir de l'aide.

---



## RÉFÉRENCES

---

1. Gram C: Ueber die isolierte färbung der schizomyceten in schnitt und trockenpräparaten. Fortschr Med 2:185, 1884
2. Hucker GJ, Conn HJ: Further studies on the methods of Gram staining. NY Agric Exp Stn Tech Bull No. 128, 1927
3. Histopathological Technic and Practical Histochemistry, 3rd ed., RD Lillie, Editor. McGraw-Hill, New York, 1965, pp 565–567
4. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Edition, Sheehan DC and Hrapchak BB, Battelle Press, Columbus (OH), 1980 p 234

Sigma-Aldrich, Inc. garantit la conformité de ses produits avec les informations contenues dans la présente notice et dans les autres notices Sigma-Aldrich. L'utilisateur doit s'assurer que le(s) produit(s) est/sont adapté(s) à l'utilisation qu'il souhaite en faire. D'autres conditions générales peuvent s'appliquer. Voir au verso de la facture ou du bordereau de commande les conditions générales de vente et autres informations.

Protocole N° HT90  
Révision précédente : 2003-09  
Révision : 2005-01

  AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Royaume-Uni

SIGMA-ALDRICH, INC.  
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 États-Unis +1 314 771 5765  
Assistance technique : en PCV au +1 314 771 3122  
ou adresser un email à [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
Pour commander : en PCV au +1 314 771 5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Allemagne 49-7329-970