

## 624-71 avec 65092A, 65092B, 65092E

### Microscopie

### Coloration de Gram Harleco® avec solution iodée de Lugol



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

### Utilisation prévue

La coloration de Gram Harleco® est utilisée pour l'évaluation qualitative de la coloration différentielle des bactéries provenant de culture et d'échantillons humains par la méthode de coloration de Gram modifiée.

La solution iodée de Lugol est destinée à être utilisée dans la procédure de coloration de Gram Harleco 65092-93.

### Principe

La coloration différentielle des cellules bactériennes dans les tissus par la méthode de Gram a été mentionnée en premier lieu dans un traité rédigé par Cad Freidlander<sup>3</sup> en 1883. En 1884, Christian Gram<sup>4</sup> a publié une description détaillée de sa procédure de coloration. Trois modifications parmi les diverses apportées ont donné des résultats supérieurs : celles de Hucker<sup>1,2,5</sup>, Burke<sup>6</sup> et Kopeloff-Beerman<sup>7</sup>.

Notre méthode utilise la technique de Gram, sauf que la solution de décolorant à base d'éthanol a été remplacée par une solution de décolorant à base d'isopropanol et d'acétone. Le rôle de l'isopropanol dans l'acétone est de réduire le taux de décoloration<sup>2</sup>. Les cellules tant à Gram positif qu'à Gram négatif incorporent le colorant primaire de violet cristallisé. L'ajout d'iode provoque la formation d'un complexe iode-violet cristallisé dans la paroi cellulaire.

Lorsque le décolorant est ensuite ajouté, les lipides sont extraits des parois cellulaires des bactéries à Gram négatif et la porosité de la paroi augmente<sup>8,9</sup>. Le complexe iode-violet cristallisé diffuse alors en dehors de la cellule. Dans le même temps, les cellules bactériennes à Gram positif sont déshydratées, la taille des pores de la paroi cellulaire est réduite et le complexe iode-violet cristallisé est piégé dans les cellules<sup>8,9</sup>.

La porosité accrue des cellules à Gram négatif permet au contre-colorant, la safranine, de pénétrer dans les bactéries.

### Échantillons

Préparer la lame comme indiqué dès l'obtention de l'échantillon. Une fois préparés, les échantillons peuvent être conservés indéfiniment à température ambiante dans des récipients adaptés, par ex. dans des boîtes de lames.

### Échantillons cultivés

#### Milieus liquides :

1. Stériliser une anse métallique en la passant à la flamme d'un bec Bunsen et la laisser refroidir.
2. Tremper l'anse dans la suspension d'échantillon et la répartir sur une lame en verre propre.
3. Laisser sécher le frottis à l'air et fixer à la chaleur en le passant à la flamme d'un bec Bunsen ; laisser refroidir la lame avant de la colorer.

#### Milieus gélosés :

1. Stériliser une anse métallique en la passant à la flamme d'un bec Bunsen et la laisser refroidir.
2. Placer une anse d'eau ultra pure sur une lame en verre propre.
3. Stériliser une anse métallique en la passant à la flamme d'un bec Bunsen et la laisser refroidir.
4. Toucher une colonie avec l'anse, la suspendre dans la gouttelette d'eau et la répartir uniformément sur une lame.

5. Laisser sécher le frottis à l'air et fixer à la chaleur en le passant à la flamme d'un bec Bunsen ; laisser refroidir la lame avant de la colorer.

### Échantillons humains :

1. Une explication complète du prélèvement des échantillons de patients est incluse dans le Manual of Clinical Microbiology<sup>10</sup>.
2. Obtenir l'échantillon avec une anse, un écouvillon ou une pipette stérile.
3. Répartir l'échantillon sur une lame de verre propre, laisser sécher à l'air, fixer à la chaleur et laisser refroidir la lame avant de la colorer.

### Réactifs

Réf. 65092A

Violet cristallisé Harleco® 500 ml  
Violet cristallisé, 100 % P.D.C.\* (3,5 g/l)  
Alcool SDA-3A, 95 % éthylique, 5 % méthylique (200 ml/l) – Conservateur

**AVERTISSEMENT ! PROVOQUE UNE IRRITATION DES YEUX.** Éviter le contact avec les yeux. Laver soigneusement après manipulation. **COMBUSTIBLE.** Maintenir éloigné des sources de chaleur et des flammes nues.

PREMIERS SECOURS : en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment les yeux à l'eau pendant au moins 15 minutes. Appeler un médecin.

Réf. 65092B

Colorant safranine Harleco® 500 ml  
Safranine O, 100 % P.D.C. Alcool SDA-3A (6,04 g/l), 95 % éthylique, 5 % méthylique (200 ml/l)

**AVERTISSEMENT ! COMBUSTIBLE.** Maintenir éloigné des sources de chaleur et des flammes nues.

Réf. 624-71

Solution iodée de Lugol Harleco® 500 ml  
Solution aqueuse diluée d'iode et d'iodure de potassium

**AVERTISSEMENT ! PROVOQUE UNE IRRITATION DES YEUX.** Éviter le contact avec les yeux. Laver soigneusement après manipulation. PREMIERS SECOURS : en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment les yeux à l'eau pendant au moins 15 minutes. Appeler un médecin.

Réf. 65092E

Décolorant Harleco® 500 ml  
Acétone (200 ml/l) Alcool isopropylique à 99 % (800 ml/l)

**DANGER ! EXTRÊMEMENT INFLAMMABLE. PROVOQUE UNE IRRITATION DES YEUX.** Maintenir éloigné des sources de chaleur, des étincelles et des flammes nues. Conserver le récipient bien fermé. Utiliser avec une ventilation adéquate. Éviter le contact avec les yeux. Laver soigneusement après manipulation. PREMIERS SECOURS : en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment les yeux à l'eau pendant au moins 15 minutes. Appeler un médecin. \*Pure Dye Content (teneur en colorant pur)

Autre matériel requis :

Réf. 64969

Milieu de montage Krystalon™ Harleco®

Réf. 104699

Huile à immersion pour la microscopie

### Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés par un personnel qualifié. Tous les échantillons doivent être clairement marqués. Des instruments adaptés doivent être utilisés pour le prélèvement et la préparation des échantillons. Suivre le mode d'emploi/les instructions d'application du fabricant.

### Préparation des réactifs

Toutes les solutions fournies dans le kit sont prêtes à l'emploi.

### Procédure de marquage

#### Réactifs requis

65092A Violet cristallisé  
65092B Colorant à la safranine  
624-71 Solution iodée de Lugol  
65092E Décolorant

#### Matériel requis, mais non fourni

Anse métallique ou aiguille d'inoculation  
Bec Bunsen  
Lames en verre  
Lamelles

Minuterie (précision : 15 secondes par minute)  
Papier absorbant  
Huile à immersion  
Milieu de montage  
Microscope muni d'un objectif à immersion d'huile

## Procédure : méthode de la lame recouverte

1. Recouvrir la lame préparée de violet cristallisé. Laisser reposer pendant une minute.
2. Rincer délicatement à l'eau distillée.
3. Recouvrir la lame de solution iodée de Lugol et laisser reposer pendant une minute.
4. Rincer délicatement à l'eau distillée.
5. Décolorer l'échantillon en le rinçant pendant 10 secondes avec le décolorant. La décoloration est terminée lorsque la solution qui s'écoule de la lame est incolore.
6. Laver délicatement, mais abondamment à l'eau distillée.
7. Recouvrir la lame de colorant à la safranine et laisser reposer pendant 1 minute.
8. Rincer délicatement à l'eau distillée.
9. Éliminer le liquide avec un papier absorbant.
10. Examiner l'échantillon préparé avec un objectif à immersion d'huile.

### Stabilité des lames préparées

Une fois la coloration de Gram réalisée, la lame est stable indéfiniment, en particulier si elle est recouverte d'une lamelle de verre et de milieu de montage.

### Contrôle Qualité

Pour vérifier la stabilité des réactifs et des colorants, réaliser une coloration de Gram sur des cultures de 18 à 24 h de *S. aureus* et *E. coli*. *S. aureus* se présente comme des cocci violets à Gram positif et *E. coli* comme des bâtonnets à Gram négatif, de couleur rose à rouge. Si ces résultats ne sont pas obtenus, les vérifications suivantes doivent être réalisées :

1. Colorer une lame préparée de cultures de 18 à 24 h de *S. aureus* avec le violet cristallisé. Rincer délicatement à l'eau froide. (Des cocci

violet à Gram positif doivent être observés ; dans le cas contraire, éliminer le colorant.)

2. Colorer une lame préparée de cultures de 18 à 24 h d'*E. coli* avec le colorant à la safranine. Rincer délicatement à l'eau froide. (Des bâtonnets à Gram négatif, de couleur rose à rouge, doivent être observés ; dans le cas contraire, éliminer le colorant.)

3. Colorer une lame préparée de cultures de 18 à 24 h de *S. aureus* avec le violet cristallisé. Rincer délicatement à l'eau froide. Recouvrir la lame de solution iodée de Lugol et laisser reposer pendant 1 minute. Décolorer en rinçant avec le décolorant pendant 10 secondes ou jusqu'à ce que la solution qui s'écoule de la lame soit incolore. À ce stade, l'échantillon devrait être violet ; si ce n'est pas le cas, la solution iodée ne forme pas de complexe iode-violet cristallisé et doit être éliminée.

### Résultats

À Gram positif – violet

À Gram négatif – rose à rouge

### Notes d'application :

Le microscope utilisé doit être conforme aux exigences des laboratoires de diagnostic médical.

Lorsque des systèmes de traitement de lames histologiques et de coloration automatisée sont utilisés, suivre le mode d'emploi fourni par le fournisseur du système et du logiciel.

Les solutions de coloration fraîchement préparées doivent être filtrées avant l'emploi. Éliminer tout excédent d'huile à immersion avant l'archivage.

### Diagnostic

Le diagnostic doit être effectué exclusivement par un personnel formé et agréé. Une nomenclature valide doit être utilisée.

Des tests complémentaires doivent être sélectionnés et réalisés selon des méthodes reconnues.

Des témoins adéquats doivent être effectués pour chaque application en vue d'éviter de rendre des résultats incorrects.

### Stockage

Les réactifs de coloration, le décolorant et la solution iodée de Lugol doivent être conservés dans leur récipient d'origine à température ambiante (15 à 30 °C). Ne pas dépasser la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la

boîte. Il convient de prendre des précautions pour réduire au minimum l'exposition à l'air et à la chaleur, car la solution iodée de Lugol est relativement instable et la concentration en iode peut décliner au fil du temps. Par conséquent, il est important d'inclure des témoins dans le flux de travail quotidien pour s'assurer que la solution d'iode fournit l'activité voulue.

### Signes de détérioration

Un précipité peut se former dans le flacon de violet cristallisé. Si cela semble interférer avec les résultats de coloration, chauffer le flacon dans un incubateur à 37 °C, puis agiter jusqu'à ce que le précipité soit dissout. Filtrer avant utilisation.

Se référer à la section Contrôle qualité pour de plus amples informations.

### Durée de conservation

Le violet cristallisé Harleco, la safranine Harleco et la solution iodée de Lugol Harleco peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur leur emballage.

La solution de décolorant Harleco peut être utilisée jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

À partir du moment où le flacon est ouvert pour la première fois, son contenu peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée s'il est conservé entre 15 et 30 °C.

Les flacons doivent toujours être fermés hermétiquement.

### Instructions supplémentaires

#### À usage professionnel uniquement.

La procédure doit être réalisée par un personnel qualifié uniquement.

Les directives nationales de sécurité sur le lieu de travail et d'assurance qualité doivent être suivies.

Des microscopes équipés selon les normes en vigueur doivent être utilisés.

### Protection contre les infections

Des mesures efficaces doivent être prises pour éviter les infections dans le cadre des directives de laboratoire.

### Instructions d'élimination

L'emballage doit être éliminé selon les directives en vigueur. Les solutions usagées et celles qui ont dépassé la durée de conservation doivent être éliminées en tant que déchets spéciaux conformément aux directives locales.

### Réactifs auxiliaires

Réf. 64969	Milieu de montage Krystalon™ Harleco®	50 ml, 500 ml
Réf. 104699	Huile à immersion pour la microscopie	50 ml, 500 ml

### Classification des risques

Veillez respecter la classification des risques imprimée sur l'étiquette et les informations contenues dans la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur le site Internet et sur demande.

Articles de remplacement pour la procédure de coloration :

65092A-95	Solution de violet cristallisé	4 x 500 ml
65092B-95	Solution de safranine	500 ml
624-71	Solution iodée de Lugol	500 ml
65092E-95	Décolorant	500 ml
65092A-85	Violet cristallisé	4 l
65092B-85	Solution de safranine	4 l
65092E-85	Décolorant	4 l

## Bibliographie

1. Hucker, G.J., J. Bacteriol. 6:395; 1921
2. Hucker, G.J. and Conn, N.J., NY Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 128:1, 1927
3. Friedlander, C., Fortschr. Med. 1:715; 1883
4. Gram, C., Fortschr. Med. 2:185; 1884
5. Hucker, G.J., Abstr. Bacteriol. 8:2; 1922
6. Burke, V.J., Bacteriol. 7:159; 1922
7. Kopeloff, N. and Beerman, P.J., Infect. Diseases. 31:480; 1922
8. Peiczar, M.J. Jr and Reid, M.D. Microbiology, 2nd ed. New York; McGraw-Hill; 50-52; 1965
9. Bartholomew, J.W. and Mittwer, T.J., Bacteriol. 18:1; 1952
10. Manual of Clinical Microbiology of the American Society for Microbiology, 30-45; 1970



Consult instructions  
for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult  
accompanying documents



Use by  
YYYY-MM-DD



Temperature  
limitation

## Marques commerciales

Harleco® est une marque déposée de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

HemaColor® est une marque déposée de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

Krystalon™ est une marque de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

Midas® est une marque déposée de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

Statut : 15/12/2020

20545748



EMD Millipore Corporation  
400 Summit Drive  
Burlington, MA 01821, USA  
Tel. +1-978-715-4321