

Protocole n° 19

Coloration de Gram selon Brown et Brenn pour coupes histologiques

Principe :

Cette variante de la coloration de Gram est une coloration différentielle qui repose sur la structure de la paroi bactérienne, différente selon qu'il s'agisse de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

Cette méthode, plus récente que le procédé original de Gram-Weigert, est l'une des meilleures méthodes, en pratique courante, de mise en évidence des deux variétés de germes.

Produits nécessaires à la coloration :

Formol à 10% tamponné Réf. 320720-	2500 ou 5000 mL
Cristal violet oxalate Réf. 361490-	0240, 1000 ou 2500 mL
Liquide de lugol Réf. 367300-	0240, 1000 ou 2500 mL
Fuchsine basique pour bactériologie Réf. 313230-	0025 ou 0100 g
HistoRAL, milieu de montage Réf. 361210-	500 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Bicarbonate de Sodium – Acétone – Ether – Acide picrique – Xylène

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.

Préparation des solutions :

Solution de Fuchsine basique :

Solution-mère : préparer une solution aqueuse saturée (environ à 0,25%) de Fuchsine basique pour bactériologie.

Solution de travail : diluer extemporanément 0,1 mL de la solution-mère avec 100 mL d'eau distillée.

Solution de bicarbonate de sodium : préparer une solution aqueuse à 5% de bicarbonate de sodium

Solution d'acide picrique : préparer une solution d'acide picrique à 0,1% dans l'acétone.

Mélange acétone-éther : préparer un mélange acétone-éther (1 part/1 part)

Mélange acétone-xylène : préparer un mélange acétone-xylène (1 part/1 part).

Mode opératoire :

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

Les pièces sont fixées de préférence dans le Formol à 10% tamponné, incluses et coupées à la paraffine.

- Déparaffiner puis hydrater la coupe.
- Placer la lame sur le support de coloration.
- Recouvrir la lame avec 1 mL (environ 20 gouttes) de Cristal violet oxalate puis 5 gouttes d'une solution de bicarbonate de sodium.
- Laisser agir 1 minute en remuant doucement la lame.
- Rincer à l'eau.
- Faire couler doucement sur la lame la solution de Liquide de lugol et laisser agir 1 minute.
- Rincer à l'eau et sécher complètement au moyen de papier filtre.
- Différencier avec le mélange acétone-éther, que l'on fait couler goutte à goutte jusqu'à disparition de toute coloration bleue.
- Colorer avec la solution de Fuchsine basique fraîchement préparée pendant 1 minute.
- Laver à l'eau et sécher incomplètement au papier filtre, puis plonger rapidement dans un bain d'acétone.
- Différencier immédiatement dans la solution d'acide picrique (pendant environ 30 secondes), jusqu'à ce que la coupe prenne une teinte rose jaunâtre.
- Rincer immédiatement dans un bain d'acétone puis dans le mélange acétone-xylène.
- Passer dans le toluène ou xylène.
- Monter avec un milieu de montage adapté à base de toluène/xylène.

Résultats :

Bactéries à Gram Positif : bleu

Bactéries à Gram Négatif : rouge

Noyaux : rouge



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.

Références Bibliographiques :

GANTER P., JOLLES G., *Histochimie normale et pathologique*, éd. GAUTHIER-VILLARS, vol. 2, 1970, p. 1468-1469.