

Annexes

Annexe 1

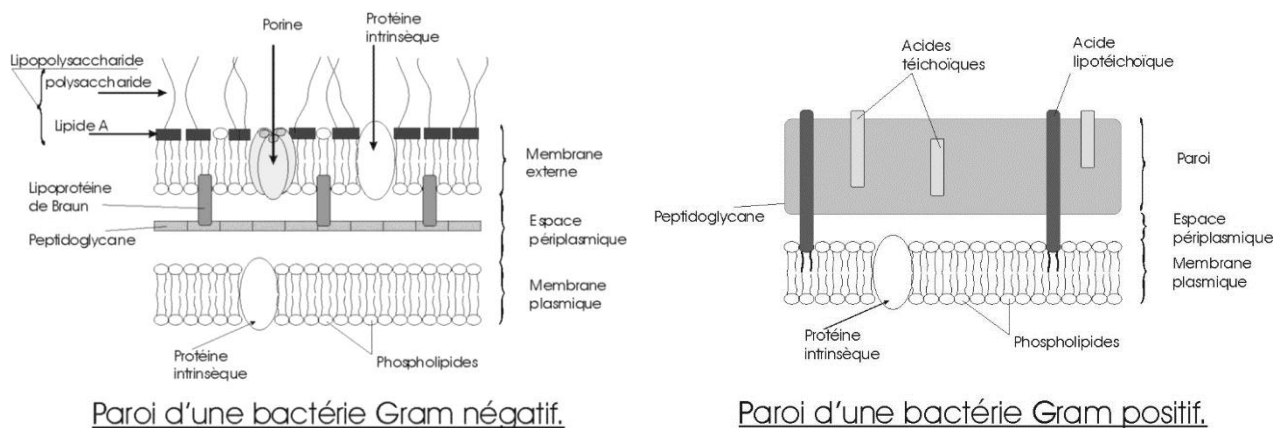
1- La coloration de Gram

A- Principe

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux à ensemercer etc...

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet (*rem : certaines bactéries telles que les Bacillus, apparaissent parfois roses et violettes sur le même frottis, on les dit « Gram labiles » et les différences de coloration sont dues à des différences d'âge des bactéries*)

La coloration de Gram est une coloration qui teste l'alcool résistance d'une souche bactérienne. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi :



Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine que celles à Gram positives. De plus, cette paroi est très riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans laquelle l'éthanol est fortement soluble...

B- Technique

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Coloration : **violet de gentiane phéniqué durant une minute**. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.
- rincer à l'eau du robinet
- Mordançage : recouvrir la lame de **réactif de Lugol 1 minute** (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration).
- Rincer à l'eau
- Epreuve (alcool résistance) : **Plonger 3 ou 4 fois une demi-secondedans un pot d'alcool** puis rincer à l'eau du robinet immédiatement. Pendant cette étape, les lipides de la paroi des Gram moins sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps

bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries Gram moins sont alcoolo-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram plus ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcoolo-résistantes et restent colorées en violet.

- Contre coloration : **Fuschine diluée au 1/20^{ème} ou de safranine pendant une minute.** Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine. Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses.
- Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier absorbant.
- Observer à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.

*Remarque : la coloration de Gram est parfois appelée **coloration V.L.A.F** afin de se rappeler les colorants et dans quel ordre ils doivent être utilisés (Violet, Lugol, Alcool, Fuschine).*

Annexe 2

2- La composition des milieux de culture (www.biokar-diagnostics.fr)

Toutes les compositions sont pour la préparation d'un litre de milieu.

Gélose Chapman

- Peptone..... 10,0 g
 - Extrait de viande de bœuf..... 1,0 g
 - Chlorure de sodium..... 75,0 g
 - Mannitol 10,0 g
 - Rouge de phénol..... 0,025 g
 - Agar-Agar 15,0 g
 - Eau distilléeqsp 1 Litre
- pH = 7,4

Gélose Mac-Conckey

- Peptone pancréatique de gélatine 17,0 g
 - Tryptone 1,5 g
 - Peptone pepsique de viande..... 1,5 g
 - Lactose 10,0 g
 - Sels biliaires 1,5 g
 - Chlorure de sodium..... 5,0 g
 - Rouge neutre 30,0 mg
 - Cristal violet..... 1,0 mg
 - Agar agar bactériologique 13,5 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

Gélose Mossel

- Peptone..... 10,0 g
 - Extrait de viande 1,0 g
 - Mannitol 10,0 g
 - Jaune d'œuf à 20 % 10 %
 - Sulfate de Polymyxine B 0,01 g
 - Rouge de phénol 0,025 g
 - Chlorure de sodium 10,0 g
 - Agar 14,0 g
- pH=7,2

Gélose King A

- Peptone dite "A" 20,0 g
 - Glycérol 10,0 g
 - Sulfate de potassium 10,0 g
 - Chlorure de magnésium 1,4 g
 - Agar purifié..... 12,0 g
- pH = 7,2

Gélose King B

- Peptone dite "B" 20,0 g
 - Glycérol 10,0 g
 - Hydrogénophosphate de potassium 1,5 g
 - Sulfate de magnésium heptahydraté 1,5 g
 - Agar purifié 12,0 g
- pH = 7,2

Gélose Mueller – Hinton

- Hydrolysât acide de caséine 17,5 g
 - Infusion de viande 2,0 g
 - Amidon soluble 1,5 g
 - Agar agar bactériologique 17,0 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $7,3 \pm 0,2$.

Bouillon nutritif

- Tryptone 10,0 g
- Extrait de viande 5,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g