

# 革兰氏染色三步法与质量控制

黄元桐 崔杰

(山西省中医研究所 太原 030012)

革兰氏染色 (Gram stain)<sup>[1]</sup> 是细菌学中一个经常使用和十分重要的方法, 自从 1884 年微生物学家 Gram 氏发明著名的革兰氏染色法以后, 100 多年来虽然经过后来学者的几次改进<sup>[2~5]</sup>, 但都仍然沿用着 Gram 氏原来的四步法<sup>[1]</sup>, 基本原理也没有改变。最近 Allen 氏对 Ziehl-Neelsen 抗酸菌染色法的改进, 是一个良好的启示, 使我们开始了革兰氏染色三步法的研究并取得了成功。现将我们建立的革兰氏染色三步法与质量控制报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 结晶紫染色液<sup>[5]</sup>

甲液: 结晶紫 2g; 95% 乙醇 20ml。

乙液: 草酸铵 0.8g; 蒸馏水 80ml。

甲乙二液先分别溶解, 然后混合在一起, 过滤除去残渣后装入滴瓶中备用。

### 1.2 碘液<sup>[5]</sup>

碘 1g; 碘化钾 2g; 蒸馏水 100ml。先取少量蒸馏水加入碘和碘化钾, 使碘完全溶解后再加入全部蒸馏水, 分装于滴瓶中备用。

### 1.3 复红酒精溶液

碱性复红 0.4g; 95% 乙醇 100ml。溶解后装入滴瓶中备用。

### 1.4 革兰氏染色三步法的染色步骤

1. 取洁净载玻片一张, 上放生理盐水一滴, 用白金耳钩取细菌培养物少许放入盐水中, 制成薄薄的细菌涂片, 自干后将玻片在酒精灯火焰上通过 3~5 次, 使细菌固定于玻片上。

2. 在细菌涂片上加上结晶紫染色液, 染 1~2min, 水洗, 除尽水滴。

3. 在涂片上加上碘液, 平放 1~2min, 水洗, 除尽水滴。

4. 在涂片上加上复红酒精溶液, 平放 50~60s, 水洗, 自干后用油浸镜头作镜检。革兰氏阳性的细菌染成深紫色, 革兰氏阴性细菌染成浅红色, 色泽鲜明。

### 1.5 质量控制

1. 取新培养的大肠杆菌 (或变形杆菌) 和表皮葡萄球菌分别制成细菌悬液。

2. 取洁净玻片数张或数十张, 平放桌上, 取一白金耳的大肠杆菌菌液放置于各玻片的左端, 涂布成一个直径 1~1.5cm 的圆形细菌涂片, 自干。

3. 再用一小白金耳的表皮葡萄球菌菌液放置于大肠杆菌涂片的中央, 使成 0.5cm 左右的葡萄球菌菌液区, 自干后在火焰上通过数次固定之, 存放玻片盒中备用。

4. 实际工作时, 取上列涂片一张, 在大肠杆菌和葡萄球菌双重涂片的右侧, 放上一滴或二滴 (两处) 生理盐水, 取一种或两种被检菌分别制成薄薄的涂片, 自干, 火焰固定后, 与左侧质控菌双重涂片同时作革兰氏三步法染色。染色方法如上述。

### 1.6 结果观察

先用油浸镜观察质控菌涂片的染色结果。正确染色结果, 在涂片中央可见到染成浅红色的革兰氏阴性的大肠杆菌和染成深紫色的革兰氏阳性的葡萄球菌, 对比鲜明。若将镜头向外侧移动, 可见到双重

涂片和单层细菌涂片的交界区,在交界区的内侧可见到革兰氏阴性的大肠杆菌和革兰氏阳性的葡萄球菌同时存在,而在交界区的外侧则只能见到单一的染成浅红色的革兰氏阴性大肠杆菌,界限分明,容易识别。只有在质控区见到正确的染色结果时,方可接着观察质控区右侧的被检细菌的染色结果。如此可以确保被检细菌染色结果的准确性。

## 2 结果和讨论

在设置有质控的情况下,我们应用本革兰氏染色三步法试染过多种细菌,包括革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肺炎双球菌、甲型和乙型链球菌、肠道链球菌、蜡状杆菌和革兰氏阴性细菌大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠道产气杆菌、布氏杆菌、伤寒杆菌、幽门弯曲菌和卡他双球菌等,均取得准确无误的染色结果,色泽鲜明,容易识别(图版 I-1~4)。

此外,还试染过包含有多种细菌的痰液标本和齿垢标本,同一涂片上存在多种革兰氏阳性菌和阴性菌,经本法染色后,革兰氏阳性菌和阴性菌对比鲜明,清晰可辨(图版 I-4)。

本法中,使用 0.4% 复红酒精溶液作为复染剂,可以达到退色和复染双重目的,效果良好。我们也曾试用过以 0.3% 沙黄酒精溶液为复染剂,也可以达到退色和复染的双重目的,效果同样良好。

细菌学染色方法的可靠性很大程度上取决于染色方法本身的技术稳定性。本染色法中,结晶紫染色和碘液处理两步规定为 1min,稍长时间也不致影响染色结果,而第三步即用复红酒精溶液退色和复染一步可能是关键性的,我们规定为 50~60s,经上百次的染色试验证明是可靠的。为了查明这一步的可靠性,我们曾用三种细菌的涂片做了 30s、1min、2min、3min 和 5min 的不同时间的退色复染试验。结果表明,在 5min 以内的各次试验中结果一致良好。这一结果说明,本革兰氏染色三步法具有良好的技术稳定性,容易掌握,不易发生变动。

染色结果的可靠性一方面也决定于被检细菌的状态,新鲜培养的细菌能正确反映它本身应有的染色性,而老培养则常常可使一些革兰氏阳性菌变为革兰氏阴性,值得注意。

革兰氏染色是一个古老和经典的方法,自从 1884 年 Gram 氏创立以其本人姓氏命名的革兰氏染色法以来已整整 110 年<sup>[1]</sup>,在这一个多世纪的时期中,革兰氏染色从一开始就成为全世界各细菌实验室每天使用而不可缺少的细菌检验技术,为细菌学在医、农、工各个领域里的应用和发展做出了重大的不可估量的贡献。革兰氏染色法在过去的一个多世纪中,虽然经过几次改进<sup>[2~5]</sup>,却都一直沿用着 Gram 氏原法的四步染色法,四步法效果很好,但操作比较复杂,现代实验室工作繁忙,对各项技术方法有力求简便的要求,以便在有限的时间内完成更多的任务。本文报道的革兰氏染色三步法,基本原理没有改变,只是把酒精退色和复染的两步合并在一部中进行,这就可以达到减少操作,缩短时间、提高工作效率的目的。

## 参 考 文 献

- [1] Gram C. *Fortschritte der Medicine*, 1984, 2: 185.
- [2] Claudius M. *Ann Inst Pasteur*, 1897, 77: 332.
- [3] Burke V. *J Bact*, 1922, 7: 159.
- [4] Kopeloff N, Beerman P. *J Infect Dis*, 1922, 31: 480.
- [5] Preston N W, Morrell A. *J Path Bact*, 1962, 84: 241.
- [6] Allen J L. *Med Lab Sciences*, 1992, 49: 99.

## A SIMPLIFIED GRAM STAIN AND ITS QUALITY CONTROL

Huang Yuantong Cui Jie

(*Shanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012*)

**Abstract** A simplified Gram's staining method is described. The decolorization step of 95% alcohol in the original Gram's stain was omitted, and substituted by a counter stain prepared with 0.4% fuchsin in alcohol which acts as both decolorization and counter staining in the simplified Gram staining method. Under quality control, a lot of different bacteria including Gram positive and negative organisms were stained with the simplified Gram staining method. The result was comparable to the original Gram stain. The simplified Gram staining method is a time-saving and practical method that could be used as a routine technic in the bacteriological laboratories.

**Key words** Gram stain, Staining method

### 图版说明

革兰氏三步法染色: 1. 蜡状杆菌(深紫色)和大肠杆菌(浅红色); 2. 葡萄球菌(深紫色)和变形杆菌(浅红色); 3. 链球菌(深紫色)和布氏杆菌(浅红色); 4. 齿垢涂片中的革兰氏阳性细菌(深紫色)和革兰氏阴性细菌(浅红色).