

兽用生物制品检验中级工职业技能鉴定中革兰氏染色问题分析及建议

张媛,彭小兵,徐磊,王忠田,王甲,郭晔*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-11-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 04-0016-04 [中图分类号] S852.61

[摘要] 通过对参加兽用生物制品检验中级工职业技能鉴定的 63 名考生细菌革兰氏染色结果进行分析,了解我国兽用生物制品生产企业细菌革兰氏染色及显微镜操作能力的整体水平。63 名考生对随机选取大肠杆菌或金黄色葡萄球菌进行革兰氏染色显微镜检查,要求考生在规定时间内完成细菌革兰氏染色并提交显微镜观察结果。92% 考生检验结果满意(58/63);8% 检验结果不满意(5/63);最高分 50 分(满分),最低分 14 分。体现出我国兽用生物制品生产企业检验人员的细菌染色显微镜观察水平参差不齐,尽管大部分检验人员掌握了细菌革兰氏染色及普通光学显微镜操作技能,但仍有小部分检验人员细菌染色及操作显微镜能力有待进一步提高。

[关键词] 革兰氏染色;职业技能鉴定;兽用生物制品检验

Analysis of Problems and Suggestion in Gram Staining among Occupation Skill Testing of Intermediate Class Worker of Veterinary Biological Products Inspecting

ZHANG Yuan, PENG Xiao-bing, XU Lei, WANG Zhong-tian, WANG Jia, GUO Ye *

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Results of Gram staining of bacteria from 63 inspectors who participated in occupation skill testing of intermediate class worker of veterinary biological products inspecting were analyzed, to understand the overall level of inspectors of veterinary biological products manufacturing enterprise on Gram staining and use of microscope. Each participant given a tube of *E. coli* or *S. aureus* solid culture had to accomplish Gram staining of bacteria and observe in a microscope within a specified time (60 minutes). Fifty eight results were satisfied from total sixty three inspectors (92%) while five unsatisfied (8%), and the highest score was 50 (full mark) while the lowest gave 14, indicating that abilities of inspectors of veterinary biological products manufacturing enterprise on Gram staining and use of microscope were mixed, most of inspectors mastered those skills and a small number of inspectors still needed to improve them.

Key words: Gram staining; occupation skill testing; veterinary biological products inspecting

作者简介:张媛,副研究员,从事需氧菌类生物制品的检测工作。

通讯作者:郭晔。E-mail:guoye@ivdc.org.cn

2016年11月10日,兽用生物制品检验员职业技能鉴定(中级工)在中国兽医药品监察所举办。参考人员均为全国各兽用生物制品生产企业的检验人员,实际操作考核项目之一为细菌革兰氏染色,拟通过此项目了解各企业对细菌革兰氏染色及显微镜使用的操作能力。

革兰氏染色法是细菌学上最经典的染色方法,1884年由丹麦细菌学家汉斯·克里斯蒂安·约阿希姆·革兰创立。此染色方法可将细菌分为两大类,即革兰氏阳性(G^+)细菌和革兰氏阴性(G^-)细菌。革兰氏染色结果是鉴别细菌的关键步骤之一,但是革兰氏染色的结果可受许多因素的影响,有时错误的染色反应可导致错误的鉴定。在实验过程中如果控制不好细菌涂片的取菌量、碘液媒染时间和乙醇脱色时间等因素,常常会出现假阳性或假阴性的实验结果^[1]。

1 材料与方法

1.1 考试样品 大肠杆菌 CVCC203 株和金黄色葡萄球菌 CVCC1882 株,均为中国兽医微生物菌种保藏管理中心保藏。革兰氏染色液,购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.2 考核内容与评分标准

1.2.1 基本素养(3分) 要求考生进实验室要穿鞋套、工作服,戴手套、口罩、帽子;实验结束后将废弃物置于废物袋中,废物袋封口放于台面上;将台面上物品摆放整齐;洗手后离开实验室。

1.2.2 制片(10分) 取洁净载玻片一张,加1小滴无菌水,用接种环从培养基上挑取少量大肠杆菌或金黄色葡萄球菌培养物与水滴混匀后,从中央逐步向外围涂开,涂成直径为10~15 mm 稀薄而均匀的圆形菌膜^[2]。

1.2.3 火焰固定(10分) 待菌膜自然风干后,将玻片正面向上在酒精灯火焰上通过2~3次,使细菌固定于玻片上。

1.2.4 染色(15分) 在细菌涂片上滴加草酸铵结晶紫染色液,初染60 s,水洗。在细菌涂片上滴加碘液,媒染60 s,水洗。在细菌涂片上滴加乙醇,脱色30~45 s,水洗。在细菌涂片上滴加番红染色液,

复染60 s,水洗。

1.2.5 显微镜检查(7分) 涂片干后,用油镜作检查,限时5 min 内观察到细菌。染成紫色为革兰氏阳性菌,染成浅红色为革兰氏阴性菌。

1.2.6 检验记录(5分) 考生需写明试验材料、操作步骤、正确描述细菌的颜色及形态,并判断出是革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌。

2 结果

2.1 考试结果 此次职业技能鉴定实际操作考核中关于细菌革兰氏染色部分占50分,63名考生中最高满分50分,最低仅得14分,扣分主要集中在制作涂片和记录部分(表1)。

表1 63名考生细菌革兰氏染色扣分情况

考核项目	扣分人数(占全体考生百分比)
基本素养	19(30%)
制作涂片	25(40%)
火焰固定	3(5%)
染色	13(21%)
镜检	16(25%)
记录	30(48%)

2.2 总体水平 63名考生中,细菌革兰氏染色部分考核合格(不低于30分)58人,占全体考生的92%(58/63);考核不合格5人,占全体考生的8%(5/63)。参考人员多为我国兽用生物制品企业在职检验员,结果显示部分企业检验人员细菌染色及操作显微镜能力还有待进一步提高。

2.3 出现的主要问题分析及建议

2.3.1 基本素养部分 防护用具佩戴不齐全;操作完毕后没有进行手部清洗就离开了考场。建议检验人员在进入实验室后必须要佩戴防护用具,既是对操作人员的保护,也是防止人为污染检验样品的有力措施。个人防护一般包括身体防护、呼吸防护、头部防护、手部防护、足部防护几方面,如果操作烈性病原微生物还要做好眼部防护。另外,人员在实验结束后,要使用中性的清洁剂反复清洗双手,使用过的防护用具要进行无害化处理,不能与其他垃圾混放。

2.3.2 制作涂片部分 没有用玻璃笔在玻片上标记,而是用记号笔;玻片使用前没有擦拭干净,导致镜下见到少许杂质;点燃酒精灯前没有排气;试管开

启前没有用火焰对试管口进行灼烧;没有在玻片上滴加无菌水而直接挑菌;制作的涂片太厚,细菌没有分散均匀,而是聚集成团,造成染色不均匀,例如大肠杆菌,应是革兰氏阴性杆菌,当涂片太厚时,菌体重叠堆积,镜下观察分辨不清是杆菌还是球菌,又因密集不易被脱色或脱色不完全而呈阳性反应;涂片太薄,菌体太稀少,观察时不易找到细菌。建议在制作涂片前用玻璃笔在玻片上划一圆圈或方框用于标记涂片区域,有利于对目标区域进行染色,更有利于在显微镜观察时方便查找。涂片时挑菌应该适量,并不是越多越好,否则很容易造成涂片过厚,染色不均匀,也不利于观察细菌形态及排列方式。

2.3.3 火焰固定部分 没有待涂片自然干燥后再固定;忘记固定;固定时间太长造成细菌变形;固定温度太低,固定不够,菌体附着于玻片上不够牢固,水洗时被水冲掉。固定的目的是为了杀死细菌,使涂抹于玻片上的菌体很好地附着于玻片上,防止被水冲掉,死的蛋白质比活的蛋白质着色力更强^[3]。建议火焰固定时避免火焰直接烘烤破坏细菌形态,而是将玻片快速、多次通过火焰,一边固定一边用手背感受玻片温度,玻片微烫即可。

2.3.4 染色部分 染液或脱色液添加不均匀,有的涂片边缘部位未予以充分覆盖,用上述在涂片区域用圆圈或方框予以标记的方法可以有效解决此问题。没有充分倒尽上一步冲洗所用的水,致使下一步所加染液或脱色液浓度略有稀释且均匀性差。脱色时间不正确,造成脱色过度或脱色不充分,脱色时间过度,造成革兰氏阳性菌亦被脱色而被误认为阴性菌,脱色时间不足,则革兰氏阴性菌也因脱色时间不够而误认为是阳性菌;复染时间过长,遮盖了初染的颜色;在水洗过程中,没有将水冲到废液缸中而是直接冲到了洗手池中;不是用水将染料冲掉,而是先倒掉染料再冲水;直接冲淋菌膜导致部分菌膜脱落;染色过程中污染手指。建议染色时间要适宜,媒染时间小于 60 s 时,不利于结晶紫、碘-碘化钾复合物与细胞的结合,因而造成金黄色葡萄球菌呈假阴性染色结果,但对大肠杆菌染色结果无影响。反之,媒染时间超过 60 s 时,结晶紫、碘-碘化钾复合物与细胞的结合过分牢固,容易使大肠杆菌呈假阳性染色结果,但对金黄色葡萄球菌染色结果无影响^[4]。这是因为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞壁组成和结构不同。金黄色葡萄球菌脂类少,没有外膜,所以,当用乙醇脱色时,由于

乙醇既能抽提草酸铵结晶紫、碘-碘化钾复合物,同时也能脱水,又因为没有脂类外膜对水的屏蔽,水很容易被脱出,造成肽聚糖网眼缩小,染色剂不容易渗出,仍留在肽聚糖分子上,使脱色不明显,仍显紫色,故很难在复染时被番红染成红色。而大肠杆菌细胞壁脂类物质含量高,而且有脂类外膜,一方面阻止乙醇脱水时水外渗,从而保持原肽聚糖网眼大小;另一方面由于细胞壁中的脂类被乙醇溶解,而增加细胞壁通透性,乙醇很容易进入细胞内,将染色复合物提取出来,使菌体呈现无色,从而容易被番红染成红色^[5]。

2.3.5 镜检部分 不会使用油镜,加油过多或过少;不会调试显微镜,观察不到细菌;镜下视野效果不好,菌体不清晰,颜色不正,细菌过于密集或疏散、分布不均匀;超时。值得注意的是,在职业技能鉴定考核中,竟有 1/4 的学员在 5 min 规定时间内无法使用显微镜观察到细菌,随后经考评员调节显微镜后均能观察到,考生心理紧张是原因之一,但这也体现出企业加强显微镜使用等基本操作的培训尤为必要。在使用显微镜观察时,建议香柏油的用量以 1~2 滴、能淹到油镜头的中间部分为宜,用量太多则浸染镜头,太少则视野变暗不便观察。当油镜头与标本片几乎接触时,不可再用粗调螺旋向上移动载物台或下降油镜头,以免损坏玻片甚至压碎镜头。

2.3.6 记录部分 实验材料记录不全或错误;实验步骤记录不全、错误或过于简单;菌体颜色描述不正确;菌体形态描述不正确(如球菌有的考生描述为圆圈,杆菌有的考生描述为圆状体等);革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌判断不正确;记录的内容和观察到的不一致;未观察到细菌却写出了细菌的颜色及形态。建议检验记录要注重真实性、规范性及可追溯性。记录内容一定要和实际操作的内容及观察结果相一致,即记你所做;而且要尽可能的全面,既要包括材料信息,又要包括实验细节;修改要规范,要保证记录的原始性。

3 讨论

尽管细菌的自动化鉴定弥补了传统方法的局限性,但是形态学检查对细菌鉴定仍有很重要的作用,也在一定程度上保证了仪器鉴定的准确性^[6]。革兰氏染色法是动物细菌性疾病诊断的一个传统方法^[7-9]。此外,革兰氏染色法也是菌株筛选鉴定的经典方法^[10-12],兽用生物制品生产企业在研制新的细菌类疫苗,筛选生产用菌种过程中必须要通过革兰

氏染色对细菌进行形态学检定,这是要求疫苗生产企业检验人员、研发人员必须掌握的一项技能。将革兰氏染色作为兽用生物制品检验员职业技能鉴定的一个考核项目可以促使在培人员及从业人员重视、学习并熟练掌握此项细菌染色技术。

显微镜检查不仅对制片、染色有严格的质量控制,而且对人员的素质要求较高。通过此次职业技能鉴定也暴露出来多数企业检验人员在实验室工作基本素养方面或多或少地都存在一些问题,而且,近半数参考人员的检验记录都不完善。兽用生物制品生产企业应不断地加强对在岗位检验人员培训,注重显微镜检查等基本功训练,提高细菌形态学的识别能力,规范检验记录书写,同时还要强化职业素质教育,强调实验室工作的细节,杜绝生物安全隐患。

参考文献:

[1] 沈杰. 大肠菌群革兰氏染色技术的实验研究[J]. 干旱环境监测, 2008, 22(1): 62-64.

[2] 中国兽医药品监察所. 兽用生物制品检验员[M]. 北京:中国

农业出版社, 2013: 116-122.

[3] 周曼. 影响革兰氏染色结果的因素及原因分析[J]. 标准计量与质量, 2003, 12: 20-21.

[4] 刘芬,赵韶星. 革兰氏染色三步法[J]. 山西职业医学院学报, 2002, 2(1): 54-56.

[5] 李彦华. 革兰氏染色原理[J]. 辽宁工程技术大学学报, 2006, 25: 335-336.

[6] 娄荣玲. 形态学检查法在临床细菌鉴定中的应用[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(5): 381.

[7] 卓玛. 犊牛副伤寒的诊断与治疗[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2016, 32(8): 171.

[8] 胡唐雁,李志强. 猪丹毒的诊断与治疗[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2016, 32(8): 186.

[9] 吴义云. 猪传染性胸膜肺炎的诊断与治疗[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2016, 32(8): 192-193.

[10] 徐旺烨,樊琛,乔薪媛,等. 34株鸡大肠杆菌的分离鉴定及致病力分析[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(4): 41-47.

[11] 杜海燕,韩俊伟,李磊,等. 某规模奶牛场隐形成乳房炎病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 当代畜禽养殖业, 2016, (9): 6.

[12] 陈甫,赵晖,别连钰,等. 犬肠道乳酸有益菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, (8上): 150-153.

(编辑:李文平)