

المختبر الوطني للصحة العمومية

A1	الكود:
V1	الإصدار:
2013-8-1	نافذ من تاريخ:
2015-8-1	يُسحب في تاريخ:
4	الصفحات:
	توقيع المميز:

1- صبغة غرام

2- الأهداف والنطاق

تُستخدم تقنية صبغة غرام في صبغ البكتيريا والخمائر والشعيات الهوائية.

وينطبق هذا الإجراء التشغيلي الموحد على جميع الموظفين التقنيين في فرع الميكروبيولوجيا المدربين على تنفيذ هذا الإجراء ولديهم الكفاءة اللازمة والتفويض بإجرائه.

3- الصيغ المقتضبة والتعاريف

للاطلاع على الصيغ المقتضبة والتعاريف والمصطلحات يُرجى الرجوع إلى الفصل 1 "عام" من دليل الجودة.

4- المهام والمسؤوليات والمساءلة

للاطلاع على التفويضات العامة يُرجى الرجوع إلى مصفوفة التفويض.

المهمة	مفوض	مسؤول
تحضير الكواشف المختبرية	مساعد المختبر	مدير المختبر
تحضير الشرائح	أخصائي تكنولوجيا المختبرات	مدير المختبر
صبغة الشرائح	أخصائي تكنولوجيا المختبرات	مدير المختبر
تأويل النتائج	أخصائي تكنولوجيا المختبرات	مدير المختبر
تقديم التقرير عن النتائج	كاتب البيانات	مدير المختبر

5- المبدأ

يحدد تكوين جدار الخلية الخاصة بالكائن المجهرى ما إذا كان سيحتفظ بالصبغة البنفسجية المتبلورة أم سيفقد لونه ولا يكون مرئياً إلا بواسطة الصبغة المضادة أي السفرانين. والكائنات التي تحتفظ بالصبغة البنفسجية المتبلورة تتلون باللون الأزرق، أما التي لا تحتفظ بها فتتلون باللون الأحمر بفعل السفرانين. فالكائنات المجهرية الزرقاء إيجابية الغرام. والكائنات المجهرية الحمراء سلبية الغرام.

6- السلامة والبيئة

يجب مراعاة قواعد السلامة عند العمل باستخدام المواد الخاصة بالمرضى التي قد تكون معدية. وللإطلاع على قواعد السلامة العامة يُرجى الرجوع إلى دليل السلامة البيولوجية.

خذ قسامات متساوية من مزارع الدم واستخدمها في إعداد الشرائح في خزانة السلامة البيولوجية.

المختبر الوطني للصحة العمومية

A1	الكود:
V1	الإصدار:
2013-8-1	نافذ من تاريخ:
2015-8-1	يُسحب في تاريخ:
4	الصفحات:
	توقيع المميز:

7- العينة

يمكن إعداد صبغات غرام من مزرعة الدم والمزرعة الصلبة. وفي كلا نوعي العينات لا تلزم إلا كمية صغيرة:
نوع العينة: الكمية الدنيا **ظروف التخزين**
 مزرعة الدم: قطرة واحدة 4 درجات مئوية، الغرفة ألف 2، جهاز التبريد 1
 المزرعة الصلبة: مستعمرة واحدة 4 درجات مئوية، الغرفة ألف 2، جهاز التبريد 1
 بعد الحضانة تُحفظ الزراعات في درجة حرارة 4 مئوية في جهاز التبريد. وتُحفظ الصبغات في درجة حرارة الغرفة.

8- المعدات والإمدادات

الإمدادات: شرائح زجاجية
 محقن بإبرة
 ممصات باستير
 غائنة
 رفر الصبغ

مكان التخزين:
 الغرفة ألف 3، الخزانة 1
 الغرفة ألف 3، الخزانة 1
 الغرفة ألف 3، الخزانة 1
 الغرفة ألف 3، الخزانة 1
 الغرفة ألف 1، حجرة السلامة

المعدات (كود المعدة): سخان الشرائح (B001)
 المجهر الضوئي (B005)

مكان التخزين:
 الغرفة ألف 1، حجرة السلامة
 الغرفة ألف 1، الطاولة

9- الكواشف المخبرية والمواد الكيميائية

البند (الرجوع إلى الإجراء التشغيلي الموحد) **مكان التخزين** **ظروف التخزين**
 الصبغة البنفسجية المتبلورة (P23) الغرفة ألف 3، خزانة السلامة 3 درجة حرارة الغرفة
 البيود (P23) الغرفة ألف 3، خزانة السلامة 3 درجة حرارة الغرفة
 95% إيثانول/ أسيتون (P23) الغرفة ألف 3، خزانة السلامة 3 درجة حرارة الغرفة
 سفرائين (P23) الغرفة ألف 3، خزانة السلامة 3 درجة حرارة الغرفة
 زيت الغطس الغرفة ألف 1، الطاولة

10- مراقبة الجودة

إجر مراقبة الجودة مرة أسبوعياً على النحو الموضح أدناه. وتتمثل مراقبة الجودة في قراءة الشرائح المجهزة بالكائنات الإيجابية الغرام والسلبية الغرام. وفي حال إيجابية الغرام تُستخدم المكورات العنقودية الذهبية، وفي حال سلبية الغرام تُستخدم الإشراكية القولونية.

التأويل والحدود المقبولة:

- تظهر العنقودية الذهبية الإيجابية الغرام في شكل مكورات زرقاء
- تظهر الإشريكية القولونية السلبية الغرام في شكل عصيات حمراء

معالجة النتائج:

- سجل نتائج مراقبة الجودة في صحيفة مراقبة الجودة الخاصة باختبار صبغة غرام الواردة في الملحق 1.
- سجل نتائج مراقبة الجودة غير المقبولة في استمارة عدم الامتثال أيضاً لبدء تحليل المشكلة واتخاذ الإجراءات التصحيحية.
- استعرض نتائج مراقبة الجودة شهرياً.

الإجراءات التي تُتخذ في حال تجاوز النتائج للحدود المقبولة (تُنفذ على يد أخصائي تكنولوجيا المختبرات):

- اصبغ شرائح جديدة كمجموعة للضبط
- إذا ظلت النتيجة غير مقبولة، تحقق من جودة الكاشف المختبري، وتحقق من أن إجراء الصبغ قد أُتبع على النحو الصحيح، وتحقق من أن السلالات المرجعية الصحيحة قد استُخدمت.

المختبر الوطني للصحة العمومية

A1	الكود:
V1	الإصدار:
2013-8-1	نافذ من تاريخ:
2015-8-1	يُسحب في تاريخ:
4	الصفحات:
	توقيع المميز:

11- الإجراء

11-1 تحضير اللطاخات

من مزرعة الدم

- 1- خذ قسامة صغيرة باستخدام ممص باستور أو غائنة، وضع قطرة أو مقدار غائنة من الدم على شريحة زجاجية
- 2- ضع الشريحة على سخان الشرائح لتجف وتثبت لمدة 30 دقيقة تقريباً

من المستعمرات:

- 1- ضع قطرة من الماء المقطر المعقم أو محلول ملحي على شريحة زجاجية
- 2- خذ مستعمرة باستخدام غائنة بمقياس 1 مكرو لتر واخلطها في القطرة لتكوّن مستحلب
- 3- ضع الشريحة على سخان الشرائح لتجف وتثبت لمدة 30 دقيقة تقريباً

11-2 إجراء الصبغ

- 1- اغمر الشريحة الجافة بالصبغة البنفسجية المتبلورة واطرها لمدة دقيقة
- 2- اشطف بمياه الصنبور وصفها من الماء الزائد
- 3- اغمر الشريحة ببود غرام واطرها لمدة دقيقة
- 4- اشطف بمياه الصنبور وصفها من الماء الزائد
- 5- استخدم كحول إثيلي/ أسيتون 95% لإزالة اللون حتى تفقد الأجزاء الرقيقة معظم الصبغة البنفسجية المتبلورة (تتوقف المدة اللازمة لإزالة اللون على سمك اللطاخة)
- 6- اشطف بمياه الصنبور وصفها من الماء الزائد
- 7- اصبغ بالسفرانين لمدة 10 ثوان
- 8- اشطف بمياه الصنبور وصفها من الماء الزائد
- 9- ضع الشريحة على السخان حتى تجف أو جففها برفق باستخدام منشفة ورقية

11-3 الفحص

- 1- ضع قطرة من زيت الغطس على الشريحة
- 2- افحص باستخدام العدسة الشبئية الغاطسة (x100)
- 3- ركز على استخدام الضابط التقريبي والضابط الدقيق حتى تحصل على رؤية واضحة

11-4 النتائج

تأويل النتائج:

- الكائنات الزرقاء - إيجابية الغرام
- الكائنات الحمراء - سلبية الغرام
- تبدو الخمائر إيجابية الغرام
- المادة المحيطة، أي هيولى الخلية يبدو أحمر

11-5 تقديم التقرير عن النتائج

- 1- اوصف الكائنات وفقاً لتفاعلها مع صبغة غرام (إيجابية الغرام - زرقاء، سلبية الغرام - حمراء) ومورفولوجيتها وترتيبها المجهرين (مثل عصيات مزدوجة أو متسلسلة أو عنقودية، أو مكورات صغيرة أو كبيرة أو خيطية، أو خمائر). مثال: "سلاسل من المكورات الإيجابية الغرام"
- 2- سجل النتائج في سجل النتائج
- 3- اتبع الإجراء المعتاد في تقديم التقرير عن النتائج على النحو الموضح في الإجراء التشغيلي الموحد P4V2 "تقديم التقارير عن النتائج"

11-6 الحدود

- 1- يُعد طول الفترة التي تستغرقها الخطوة الخاصة بإزالة اللون (إيثانول/ أسيتيت) حاسم الأهمية. وتتطلب اللطاخات الرقيقة فترة أقصر من اللطاخات السمكية. ويؤدي زوال اللون أكثر من اللازم إلى تحول كل ما هو موجود على الشريحة إلى اللون الأحمر، في حين يؤدي زوال اللون على نحو غير كاف إلى تحوله إلى اللون الأزرق
- 2- الكائنات الإيجابية الغرام ولاسيما المكورات الناجمة عن مزارع غير طازجة (مر عليها أكثر من 48 ساعة)، قد لا تحتفظ بالصبغة البنفسجية المتبلورة وتبدو حمراء

A1	الكود:	<h1>المختبر الوطني للصحة العمومية</h1>
V1	الإصدار:	
2013-8-1	نافذ من تاريخ:	
2015-8-1	يُسحب في تاريخ:	
4	الصفحات:	
	توقيع المميز:	

3- بعض أنواع البكتيريا توصف بأنها "متنوعة الغرام" وقد تصبغ باللون الأزرق أو الأحمر أو تبدو بكلا اللونين (مثل الغاردنريلا المهبلية)

7-11 التنظيف

- 1- ينبغي التخلص من سائل الصبغة المستخدم في حاويات النفايات الكيميائية السائلة
- 2- ينبغي التخلص من لطاخات غرام في صندوق الموصل

13- الوثائق ذات الصلة

- إدارة الجودة 1 "عام"
- دليل السلامة البيولوجية الموجود في جميع غرف المختبر وفي مكتب الإدارة
- الإجراءات التشغيلية الموحد P23 "تحضير الكواشف المختبرية الخاصة بصبغة غرام"
- الإجراءات التشغيلية الموحد E4 "استخدام المجهر الضوئي وصيانته"
- الإجراءات التشغيلية الموحد P4 "تقديم التقارير عن النتائج"

14- الاستثمارات ذات الصلة

- P4F1 "التقرير عن النتيجة"
- سجل المريض، الأمانة

12- المراجع

- Manual of Clinical Microbiology, Chapin, KC, Lauderdale, T., ASM Press, 2003, Washington, DC. Chapter: Reagents, Stains and Media
- Patient Safety Monitoring & International Laboratory Evaluation portal .تم الاطلاع في شباط/ فبراير 20، 2013. متاح على الرابط التالي: <http://resources.psmile.org/resources/process-control/section-specific-information/microbiology/bacteriology/Pro6.7-A-12%20Gram%20Stain%20%20.doc/view>

13- المرفقات

- الملحق 1 "صحيفة مراقبة الجودة، صبغة غرام"

A1A1	الكود:	المختبر الوطني للصحة العمومية
V1	الإصدار:	
2013-8-1	نافذ من تاريخ:	
2015-8-1	يُسحب في تاريخ:	
1	الصفحات:	
	توقيع المميز:	

الملحق 1: صحيفة مراقبة الجودة، صبغة غرام

النتائج المقبولة:

- إيجابية الغرام: مكورات زرقاء (المكورات العنقودية الذهبية)
- سلبية الغرام: عصيات حمراء (الإشريكية القولونية)

سجل جميع نتائج مراقبة الجودة غير المقبولة في استمارة عدم الامتثال لبدء عملية تحليل المشكلة واتخاذ الإجراءات التصحيحية.

السنة: _____

تولى تنفيذ مراقبة الجودة:	النتيجة		رقم دفعة السفرائين	رقم دفعة اليود	رقم دفعة الصبغة البنفسجية المتبلورة	تاريخ إجراء مراقبة الجودة
	سلبية الغرام	إيجابية الغرام				

التوقيع: _____

توقيع مدير المختبر على الاستعراض: التاريخ: _____