	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze Ústav dědičných metabolických poruch	Účinnost formuláře od: 1.7.2014
	F-UDMP- T-08 Pokyny pro odběr a transport vzorku kůže k založení kultury fibroblastů	

Odběr se provádí sterilně z vhodného místa (např. z vnitřní strany horní části paže). Jde-li o odběr kůže při pitvě (ověřeno, že se kultivace podaří ze vzorku odebraného do 3 dnů po exitu, ale i po delší době – do 7 dní může být kultivace úspěšná), volíme místo podél řezu a ze dvou až tří míst do oddělených nádobek pro vyšší pravděpodobnost mikrobiální kontaminace a následné ztráty materiálu.

Optimální velikost vzorku je 6x4x1 mm (do škáry), při odběru při pitvě mohou být i větší.


- Pomůcky:**
1. Dezinfekční prostředky: Skinsept-mucosa, 70% etanol
 2. Sterilní voda (aqua pro injectione) není nutná
 3. **Sterilní** jemná chirurgická pinzeta a ostré nůžky (horkovzdušná sterilizace)
 4. Transportní médium (**sterilní kultivační médium** M199, MEM, DMEM, RPMI bez séra s přídavkem antibiotik, mohou poskytnout laboratoře, které pěstují buňky, např. virologie, není-li tato možnost, lze použít **sterilní fyziologický roztok nebo PBS**). Optimální objem 5 až 10 ml pro 1 vzorek, (ale větší objem není na závadu), médium musí být cca do 2/3 objemu použité nádoby = zkumavka se šroubovacím uzávěrem 15 až 50 ml z PP, kultivační lahvička, atp
- Vhodná antibiotika: Gentamicin 50 ug/ml, nebo kombinace Penicilin, Streptomycin a Amphotericin, v obvyklé koncentraci používané pro kultivaci buněk.
5. Lokální anestetikum Mesocain 1% (není nezbytné)

Postup: - povrch kůže je třeba řádně otřít (vetřít) sterilními tampony s vhodnou dezinfekcí (např. Skinsept-mucosa), nechá se chvíli působit. Pak se zastříkne 2x 10 až 20 ml 60 až 70% ethanolu a/nebo isopropanolu, který se nechá odpařit. Pak se kůže opláchně sterilní vodou a sterilními nástroji se kůže odstříhne a vloží do transportního média. Zkumavka se ihned pevně uzavře, vhodně zabalí a odešle do laboratoře.

Důležité je dodržet dostatečnou dobu působení povrchových dezinfekčních prostředků a používat sterilní nástroje. Po odpaření alkoholové dezinfekce není potřeba kůži oplachovat vodou.

Transport:

- Víčko nádoby se sterilně odebranou tkání chraňte proti vniknutí prachu pod víčko překrytím Al fólií, parafilmem nebo vložením do čistého sáčku.
 - Nádobka musí být dále chráněna před mechanickým poškozením a vlivem extrémních teplot, zejména mrazem, v krabici s izolací bublinkovou fólií nebo buničinou. (Buničina a vata jsou zdrojem spor plísní, neobalujte jimi lahvičku s nekrytým víčkem!)
 - Není-li možné odebranou tkáň odeslat a zpracovat krátce po odběru, uložte ji v transportním médiu do chladničky (+6 až +15° C). Takto lze tkáň uchovat max. 7 dní.
- Nemrazit!!!!**
- Odebraná tkáň je do laboratoře transportována při teplotě do 25°C, při delší době transportu (déle než 6 hodin) při teplotě 6-15°C.

	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze Ústav dědičných metabolických poruch	Účinnost formuláře od: 1.7.2014
	F–UDMP– T-08 Pokyny pro odběr a transport vzorku kůže k založení kultury fibroblastů	

Transport napěstovaných buněk:

Podari-li se vám dohodnout napěstování fibroblastů v laboratoři poblíž vašeho pracoviště, dohodněte přepravu do naší laboratoře v co nejnižší pasáži, když tvoří téměř souvislou vrstvu (malé mezery mezi buňkami) a to 2 lahvičky o růstové ploše alespoň 25 cm². Kultivační lahvičky je třeba doplnit médiem až po hrdlo, (při otřesech při přepravě se tvoří pěna, která buňkám škodí). Doplněné lahvičky už nedávejte do inkubátoru, ale uchovávejte a přepravujte je při teplotě do 25°C, chráněné před tepelným a mechanickým poškozením.

Případné dotazy zodpoví:

Ing. Markéta Nováková, Laboratoř tkáňových kultur, ÚDMP VFN a 1.LF UK
 Tel.: 22496 5642, Marketa.Novakova3@vfn.cz, Marketa.Novakova@lf1.cuni.cz