



SNAS

SLOVENSKÁ NÁRODNÁ AKREDITAČNÁ SLUŽBA

**METODICKÁ SMERNICA PRE SPRÁVNU LABORATÓRNU PRAX
METHODICAL GUIDELINE FOR GOOD LABORATORY PRACTICE**

**APLIKÁCIA ZÁSAD SPRÁVNEJ LABORATÓRNEJ
PRAXE NA IN VITRO ŠTÚDIE**

THE APPLICATION OF THE PRINCIPLES OF GLP
TO IN VITRO STUDIES

MSA G-14

Vydanie: 3

BRATISLAVA

Marec 2012

Pôvodne publikované OECD v anglickom jazyku pod názvom:
OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No.14,
The Application of the Principles of GLP to in vitro Studies.

ENV/JM/MONO(2004)26

© 2004 OECD

Všetky práva vyhradené.

© 2008, © 2012 SNAS pre slovenské vydanie

Publikované so súhlasom OECD, Paríž.

Za kvalitu slovenského prekladu a jeho kompatibilitu s pôvodným textom a národnou legislatívou zodpovedá SNAS.

Spracoval: Ing. Kvetoslava Forišeková

Preskúmal: RNDr. Zdeno Mahrla, CSc.

Schválil: Ing. Jozef Obernauer, riaditeľ

Účinnosť od: 30 .3. 2012

Nadobudnutím účinnosti tejto MSA končí účinnosť MSA G-14 zo dňa 25. 1. 2008

Táto MSA neprešla jazykovou úpravou.

Metodické smernice sa nesmú rozmnožovať a kopírovať na účely predaja.

Dostupnosť MSA: [http:// www.snas.sk/](http://www.snas.sk/)

OBSAH <i>CONTENT</i>	Strana <i>Page</i>
1 ÚVODNÉ USTANOVENIA / Introductory Provisions	4
1.1 Predslov / Foreword	4
1.2 Úvod / Introduction	4
1.3 Účel dokumentu / Purpose of this Document	4
1.4 Scope / Rozsah	5
1.5 Definícia pojmov / Definition of Terms	5
1.6 Zdroje ďalších informácií pre in vitro testovanie / Sources for Further Information on In Vitro Testing	7
1.7 Skratky / Abbreviations	7
1.8 Súvisiace predpisy / Related Regulations	8
2 VECNÁ ČASŤ / FACTUAL PART	9
2.1 Zodpovednosti / Responsibilities	9
a) <i>Vedenie testovacieho pracoviska / Test Facility Management</i>	9
b) <i>Vedúci štúdie / Study Director</i>	9
c) <i>Pracovníci podieľajúci sa na štúdií / Study Personnel</i>	10
2.2 Zabezpečenie kvality / Quality Assurance	10
2.3 Testovacie pracovisko / Facilities	11
a) <i>Všeobecne / General</i>	11
b) <i>Priestory pre testovacie systémy / Test System Facilities</i>	11
c) <i>Priestory pre zaobchádzanie s testovanými a referenčnými látkami / Facilities for Handling Test and Reference Items</i>	12
2.4 Prístroje, materiál a činidlá / Apparatus, Material and Reagents	12
2.5 Testovacie systémy / Test Systems	12
a) <i>Podmienky pre testovacie systémy / Conditions for Test Systems</i>	12
b) <i>Novoprijímané testovacie systémy / Newly Received Test Systems</i>	13
c) <i>Záznamy o testovacích systémoch / Test System Records</i>	13
2.6 Testované a referenčné látky (vrátane pozitívnych a negatívnych kontrolných látok) / Test and Reference Items (including Negative and Positive Control Items) ..	14
2.7 Štandardné pracovné postupy / Standard Operating Procedures (ŠPP/SOPs)	14
2.8 Realizácia štúdie / Performance of the Study	15
2.9 Správa o výsledkoch štúdie / Reporting of Study Results	15
2.10 Uchovávanie záznamov a materiálov / Storage and Retention of Records and Materials	16

1 ÚVODNÉ USTANOVENIA / *Introductory Provisions*

1.1 Predslov / *Foreword*

V súčasnosti sa stupňuje úsilie o obmedzenie používania zvierat pri testovaní bezpečnosti chemických látok. *In vitro* metódy hrajú čoraz významnejšiu úlohu ako alternatíva, či náhrada pôvodných *in vivo* testov. Očakáva sa, že vývoj v oblasti toxikogenomiky, toxikoproteomiky, toxikometabonomiky a ďalších vysokovýkonných skriningových metód zvýši význam *in vitro* metód pre testovanie bezpečnosti, okrem ich tradičného použitia pri testoch genotoxicity. Pracovná skupina OECD pre Správnu laboratórnu prax považuje preto za užitočné vypracovať ďalší návod, so zvláštnym dôrazom na použitie OECD zásad SLP pri *in vitro* štúdiách.

1.2 Úvod / *Introduction*

Štúdie využívajúce *in vitro* testovacie systémy sa dlhodobo používajú pre získanie údajov o bezpečnosti chemikálií s ohľadom na ľudské zdravie a životné prostredie. Národná legislatíva vyžaduje, aby boli tieto štúdie realizované v súlade s požiadavkami správnej laboratórnej praxe. Tradične bývajú *in vitro* metódy používané hlavne v oblasti testovania genotoxicity. V štúdiách genotoxicity je zhodnotenie rizika vo veľkej miere založené na údajoch získaných zo štúdií používajúcich *in vitro* testovacie systémy. S rastúcou snahou obmedziť v testoch bezpečnosti používanie zvierat získavajú *in vitro* metódy významnejšie postavenie ako alternatíva alebo doplnok *in vivo* testov bezpečnosti. Okrem toho, vývoj na poli toxikogenomiky, toxikoproteomiky, toxikometabonomiky a iných (napr. microarray testy) vysokovýkonných skriningových techník, bude tiež zvyšovať význam *in vitro* metodológie pre testy bezpečnosti.

Požiadavka, aby boli štúdie bezpečnosti plánované, vykonávané, kontrolované, zaznamenávané, predkladané a uchovávané v súlade so zásadami správnej laboratórnej praxe OECD (ďalej Zásady SLP), je rovnaká aj pre rozdielne typy štúdií. Z toho dôvodu sú zásady SLP všeobecným návodom na vykonávanie všetkých neklinických zdravotných a environmentálnych štúdií bezpečnosti, vrátane *in vitro* štúdií. Vypracovanie tohto usmernenia má uľahčiť ich používanie a interpretáciu pri špecifických situáciách *in vitro* testov, poskytnúť návod na ich aplikáciu na *in vitro* štúdie a to tak pre testovacie pracovisko (vedenie testovacieho pracoviska, útvár zabezpečenia kvality, vedúci štúdie a zamestnanci), ako aj pre národné authority monitorovania súladu so SLP.

1.3 Účel dokumentu / *Purpose of this Document*

Účelom tohto dokumentu je napomôcť pri správnej aplikácii a interpretácii zásad SLP pri organizovaní a riadení *in vitro* štúdií a poskytnúť rady pri primeranej aplikácii zásad SLP na *in vitro* štúdie ako pre testovacie pracoviská (manažment, ÚZK, vedúceho štúdie a zamestnancov), tak aj pre národné monitorovacie authority.

Tento dokument má za cieľ poskytnúť ďalšiu (doplnkovú) interpretáciu zásad a ich aplikáciu pre *in vitro* štúdie vykonávané pre regulačné účely. Je písaný takým spôsobom, aby umožnil ľahké porovnanie so zásadami SLP (rovnaké členenie kapitol).

1.4 Scope / Rozsah

Tento dokument je špecificky zameraný na použitie zásad SLP na *in vitro* štúdie realizované v rámci neklinických testov bezpečnosti látok obsiahnutých vo farmaceutických produktoch, pesticídoch, kozmetických výrobkoch, veterinárnych liekoch a liečivách, potravinových a krmovinových doplnkoch, priemyselných chemikáliách a biocídoch. Testovanými látkami sú obvykle syntetické chemikálie, ale môžu nimi byť aj látky prírodného alebo biologického pôvodu a v niektorých prípadoch aj živé organizmy. Cieľom testovania je získanie údajov o ich vlastnostiach a/alebo ich bezpečnosti s ohľadom na zdravie ľudí a životné prostredie.

Ak nie sú špecificky vyňaté národnou legislatívou, zásady SLP sa vzťahujú na všetky neklinické štúdie zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti vyžadované nariadeniami pre účely registrovania alebo poskytnutia licencie pre farmaceutické produkty, pesticídy, potravinové a krmovinové doplnky, kozmetické výrobky, veterinárne lieky a podobné výrobky, a pre reguláciu priemyselných chemikálií

1.5 Definícia pojmov / Definition of Terms

In vitro štúdie - štúdie, ktoré ako testovacie systémy nepoužívajú mnohobunkové celé organizmy, ale skôr mikroorganizmy alebo materiál izolovaný z celých organizmov alebo ich simulácie.

Mnohé *in vitro* štúdie možno na základe definície podľa Zásad SLP kvalifikovať ako krátkodobé. Pre tieto štúdie, ak je to vhodné, sa pre uľahčenie práce vedúcemu štúdie a pracovníkom útvaru zabezpečenia kvality majú prevziať a použiť aj ustanovenia smernice OECD „Aplikácie zásad SLP na krátkodobé štúdie“ (MSA G-07).

Referenčná látka – (podľa všeobecnej definície je akákoľvek látka, použitá ako základ na porovnanie s testovanou látkou). Testovacie metódy pre *in vitro* štúdie v mnohých prípadoch nariaďujú používanie vhodných pozitívnych, negatívnych kontrol a/alebo kontrol pomocných látok. Tieto však neslúžia v zmysle definície SLP pre „referenčné látky“ na hodnotenie odozvy testovacieho systému na testovanú látku, ale len na kontrolu zodpovedajúcej odozvy testovacieho systému. Keďže účel použitia týchto pozitívnych, negatívnych a/alebo pomocných kontrolných látok môže byť považovaný za analógiu použitia referenčnej látky, túto definíciu referenčnej látky treba považovať za takú, ktorá určuje termíny „pozitívna, negatívna a/alebo pomocná kontrolná látka“ ako také. Rozsah, v rámci ktorého je potrebná ich analytická charakterizácia, sa môže líšiť od požiadaviek na v klasickom zmysle chápané referenčné látky.

Aseptické podmienky – podmienky vytvorené a existujúce v pracovnom priestore, ktoré minimalizujú potenciálnu mikrobiálnu a vírusovú kontamináciu.

Bunkové línie – bunky, ktoré prešli genetickou zmenou, zabezpečujúcou ich prežitie, v dôsledku čoho sú schopné viacnásobne sa množiť *in vitro*, môžu byť rozširované a kryogénne konzervované ako bunkové banky. Kontinuálne množená bunková línia je vo všeobecnosti omnoho homogénnejšia a stabilnejšia a preto reprodukovateľnejšia ako heterogénna populácia primárnych buniek.

Kontrola, negatívna – časť (samostatná) testovacieho systému, do ktorej je zámerne aplikovaná látka, o ktorej je známe, že nevyvoláva odozvu testovacieho systému; negatívna kontrola, poskytuje dôkaz o tom, že testovací systém neodpovedá na známy negatívny podnet.

Kontrola, pozitívna – časť (samostatná) testovacieho systému do ktorej je zámerne aplikovaná látka, o ktorej je známe, že vyvoláva odozvu testovacieho systému; pozitívna kontrola

poskytuje dôkaz o tom, že testovací systém odpovedá na známy pozitívny podnet v daných podmienkach testu.

Kontrola, neošetrená – časť testovacieho systému, ktorá sa udržiava v pôvodných kultivačných podmienkach; neošetrená kontrola poskytuje základné údaje o testovacom systéme v podmienkach testu.

Kontrola, pomocné látky – časť (samostatná) testovacieho systému, ku ktorej sa pridáva pomocná látka; kontrola pomocnej látky poskytuje dôkaz o tom, že pridaná pomocná látka nemá vplyv na testovací systém.

Kritické fázy - jednotlivé, definované postupy alebo činnosti v rámci štúdie, ktorých správne vykonanie je kritické pre kvalitu, platnosť (validitu) a spoľahlivosť štúdie.

Krížová kontaminácia – neúmyselná kontaminácia testovanej látky inou testovanou látkou alebo testovacieho systému inou testovanou látkou alebo iným testovacím systémom spôsobená nedbalosťou, ktorá kontaminuje testovanú látku alebo poškodí testovací systém.

Kryogénna konzervácia - uchovávanie buniek a pletív – tkanív v zmrazenom stave za podmienok, pri ktorých sa uchováva ich životaschopnosť.

Kryoskúmavka - špeciálna skúmavka používaná na kryogénne uchovávanie. Kryoskúmavka musí spĺňať špeciálnu podmienku, akou je tesnosť uzáveru i za veľmi nízkych teplôt a pri veľkých teplotných zmenách počas zmrazovania a rozmrazovania.

Ex vivo - bunky, pletivá alebo orgány získané na ďalšiu analýzu z intaktných zvierat.

Génová transfekcia - vloženie cudzej, doplnkovej DNA (jedného alebo viacerých génov) do hostiteľskej bunky.

High through-put skríning - použitie miniaturizovanej, robotizovanej technológie na skríning rozsiahlych súborov látok voči izolovanému cieľovému génu, proteínu, bunke, tkanivu, atď., aby sa dala vybrať látka vykazujúca špecifické aktivity, vhodná na ďalší vývoj.

Mikroarrays - súbor miniaturizovaných plôch pre chemické reakcie metodicky usporiadaných a umiestnených na pevnej podložke, akou je napríklad mikroskopické podložné sklíčko. Microarray DNA sú prostriedkom na porovnanie známych a neznámych vzoriek DNA, sú založené na pravidlách párovania báz a umožňujú automatizáciu procesu identifikácie vzoriek neznámej DNA na použitie pri skúmaní biologických vzoriek na určenie génovej expresie, markerovej schémy alebo sekvencie nukleotidov DNA/RNA.

Primárne bunky - bunky, ktoré sú čerstvo izolované zo zvieracích alebo rastlinných zdrojov. Čerstvo izolované primárne bunky môžu rýchlo dediferencovať v kultúre a často majú obmedzenú životnosť. Primárne kultúry izolované zo zvierat alebo z človeka môžu predstavovať heterogénnu populáciu s ohľadom napríklad na rozdiely v typoch buniek a stavy diferenciacie, ktoré závisia od použitého postupu čistenia (purifikácie). Každý izolát je unikátny a nie je možné ho presne zopakovať. Primárne bunky si bežne vyžadujú zložitú výživu obohatenú o sérum a ďalšie zložky. Následkom toho sa kultúry primárnych buniek veľmi ťažko štandardizujú.

Patentovaný materiál - materiál chránený (patentom, autorským právom, obchodnou značkou, zákonmi) proti nelegálnemu použitiu.

Testovacia súprava - súbor všetkých zložiek potrebných na vykonanie skúšky, testu alebo štúdie, pripravený ako súprava na priame použitie.

Pletivá - mnohobunkové zoskupenia diferencovaných buniek so špecifickou funkciou ako súčasť organizmov.

Toxikogenomika - štúdium odozvy genómov na stres alebo toxické látky životného prostredia. Cieľom toxikogenomiky je nájsť vzťahy medzi toxickou odozvou na toxické látky a zmenami v genetickom profile objektov exponovaných týmito toxikantami. Toxikogenomika spája novovznikajúce technológie genomiky a bioinformatiky, aby identifikovala a charakterizovala mechanizmy účinku známych alebo podozrivých toxických látok. V súčasnosti primárnym toxikogenomickým nástrojom sú mikrotesty DNA a DNA čip, ktoré sa používajú na simultánny monitoring úrovni expície stoviek až tisícov génov.

Toxikometabonomika - kvantitatívne meranie časovej závislosti multiparametrickej metabolickej odozvy živých systémov na patofyziologické stimuly alebo genetickú modifikáciu systematickým skúmaním zloženia biologických tekutín s použitím NMR/ pattern recognition technológie tak, aby bolo možné spojiť toxické pôsobenie na cieľový orgán s NMR spektrálnou schémou a identifikovať originálne markery toxicity.

Toxikoproteomika - štúdium reakcie celkovej expície bielkovín v bunke alebo tkanive na stresy alebo toxické látky životného prostredia. Cieľom toxikoproteomiky je nájsť vzťahy medzi toxickými odozvami na toxikanty a zmenami v celkovom profile proteínov u objektov, ktoré boli vystavené pôsobeniu príslušných toxikantov.

Transgénne bunky - bunky s jedným alebo viacerými cudzími génmi, ktoré následne vykazujú vlastnosti alebo funkcie, ktoré sa za normálnych okolností v rodičovskej bunke buď nevyskytujú, alebo vyskytujú len zriedkavo.

1.6 Zdroje ďalších informácií pre in vitro testovanie / Sources for Further Information on In Vitro Testing

Webové stránky:

1. Good Cell Culture Practices <http://ecvam.jrc.it/publication/index5007.html>
2. MIAME Guideline <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>
3. ECVAM <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
4. ICCVAM <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

1.7 Skratky / Abbreviations

GLP	-	Good Laboratory Practice
SLP	-	Správna laboratórna prax
MSA	-	Metodická smernica na akreditáciu
OECD	-	Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj Organisation for Economic Cooperation and Development)
SNAS	-	Slovenská národná akreditačná služba
ŠPP	-	Štandardné pracovné postupy

1.8 Súvisiace predpisy / *Related Regulations*

MSA série G - všetky MSA týkajúce sa Správnej laboratórnej praxe.

Zákon 67/2010 Z. z. o podmienkach uvedenia chemických látok a chemických zmesí na trh a o zmene a doplnení niektorých zákonov (chemický zákon)

Nariadenie vlády SR č. 320/2010 Z. z., ktorým sa upravujú činnosti testovacích pracovísk a činnosti inšpektorov vykonávajúcich inšpekcie, audit a overovanie dodržiavania zásad správnej laboratórnej praxe v znení neskorších predpisov

2 VECNÁ ČASŤ / FACTUAL PART

2.1 Zodpovednosti / Responsibilities

a) Vedenie testovacieho pracoviska / Test Facility Management

Väčšina zodpovedností vedenia testovacieho pracoviska je všeobecného charakteru, rovnako pre *in vivo* ako aj pre *in vitro* štúdie, ako sú požiadavky na zabezpečenie dostupnosti kvalifikovaných zamestnancov, vhodných priestorov a zariadení na včasné a riadne vykonanie štúdie. Vedenie testovacieho pracoviska si však musí byť vedomé toho, že *in vitro* testovanie môže ovplyvniť vykonávanie niektorých jeho povinností. Napr. musí sa uistiť, že zamestnanci jasne pochopili úlohy, ktoré majú vykonať. Pre *in vitro* štúdie to znamená zabezpečiť špeciálne školenie zamerané na aseptické postupy a na manipuláciu s biologicky rizikovými materiálmi. *In vitro* testovanie si tiež môže vyžadovať špeciálne priestory a zavedenie špeciálnych postupov pre zabránenie kontaminácii testovacích systémov. Ďalším príkladom je požiadavka zaistenia dodávok, vyhovujúcich požiadavkám danej štúdie. Niektoré *in vitro* štúdie si môžu vyžadovať použitie patentovaných materiálov alebo testovacích súprav. Hoci OECD dokument "Súlad laboratórnych dodávateľov so zásadami SLP" (MSA G-05) ustanovuje, že materiály, ktoré majú byť použité v štúdiu v súlade so zásadami SLP, musia byť vyrábané a testované na vhodnosť a to použitím zodpovedajúceho systému pre zabezpečenie kvality a tým sa primárna zodpovednosť za ich vhodnosť prenáša na výrobcu alebo dodávateľa, aj tak je povinnosťou vedenia testovacieho pracoviska, aby preverením metód, postupov a politík dodávateľa potvrdili, že príslušné podmienky sú primerane splnené.

b) Vedúci štúdie / Study Director

Všeobecné povinnosti vedúceho štúdie nezávisia na type štúdie a zodpovednosť uvedená v Zásadách platí rovnako aj na *in vitro* štúdie. Vedúci štúdie je jediným zodpovedným za celkové vedenie a správu o štúdiu.

V prípade *in vitro* štúdie musí vedúci štúdie venovať zvýšenú pozornosť doloženiu oprávnenosti a charakterizácii testovacieho systému, čo je činnosť, ktorá je pre *in vitro* štúdie ťažšie uskutočniteľná. Pozri napr. v časti Testovacie systémy (viď ďalej), kde sa uvádzajú požiadavky na dokumentovanie odôvodnenia výberu a charakterizácie testovacieho systému. V prípade *in vivo* štúdií sú tieto činnosti menej komplikované. Napríklad oprávnenosť použitia vybraných druhov organizmov môže byť doložená charakterizáciou týchto organizmov, ktoré preukážu ich vhodnosť ako modelov pre hodnotenie účinkov, ktoré sú predmetom testu. Charakterizácia jednotlivých zvierat môže byť splnená jednoducho doložením zvieracieho druhu, rasy/kmeňa a podkmeňa, dodávateľa zvierat, počtu, rozsahom hmotnosti, pohlavia a veku.

Tieto požiadavky je podstatne ťažšie splniť pri *in vitro* štúdiách:

Zdôvodnenie výberu testovacieho systému si môže vyžadovať, aby vedúci štúdie dokumentoval, že metóda testu bola validovaná alebo je štruktúrou, funkčne a/alebo mechanicky podobná validovanej referenčnej testovacej metóde. Pred použitím nových testovacích metód, ktoré sú štruktúrou, funkčne a/alebo mechanicky podobné validovanej testovacej metóde, musí vedúci štúdie poskytnúť údaje dokazujúce, že nová testovacia metóda ma porovnateľnú výkonnosť s príslušnou referenčnou metódou.

Preukázať vlastnosti *in vitro* systémov môže byť tiež náročné. I keď vedúci štúdie môže byť schopný doložiť s pomocou dodávateľa niektoré vlastnosti testovacieho systému (napr. bunkovú líniu, vek, pasážovanie, pôvod), musí tiež charakterizovať testovací systém dokázaním, že testovací systém spĺňa požiadavky na výkon, keď je porovnávaný s primeranými referenčnými látkami, pokiaľ je to potrebné, aj vrátane použitia pozitívnych, negatívnych, neošetrených kontrol a/alebo doplnených len pomocnými látkami. Za zvláštny prípad treba považovať *in vitro* štúdie, využívajúce patentované materiály alebo testovacie súpravy. Pokiaľ je dodávateľ, výrobca alebo držiteľ patentu zárukou vlastností takýchto materiálov alebo testovacích súprav a pokiaľ vedenie testovacieho pracoviska zodpovedá za to, že dodávateľ spĺňa podmienky kvality uvedené predtým, napr. preverením (inšpekciou) dodávateľskej praxe, postupov a politiky kvality, je vedúci štúdie zodpovedný za to, že vlastnosti týchto materiálov alebo súprav skutočne spĺňajú požiadavky štúdie a že testovacie súpravy boli primeraným spôsobom validované a sú vhodné na zamýšľané použitie. Keďže kvalita a spoľahlivosť výsledkov štúdie budú priamo ovplyvnené kvalitou a vlastnosťami týchto materiálov alebo testovacích súprav, je zvlášť dôležité, aby vedúci štúdie starostlivo preskúmal a kriticky zhodnotil úplnosť a prijateľnosť dokumentácie o zabezpečení ich kvality. Vedúci štúdie musí minimálne posúdiť vhodnosť systému pre zabezpečenie kvality, ktorý používa výrobca a mať k dispozícii všetku dokumentáciu potrebnú na hodnotenie spôsobilosti testovacieho systému, napr. výsledky uskutočnených štúdií.

c) *Pracovníci podieľajúci sa na štúdiu / Study Personnel*

Zamestnanci musia – tam, kde je to požadované – pri realizácii *in vitro* štúdií dôsledne dodržiavať požiadavky na aseptické podmienky a príslušné postupy, aby sa zabránilo kontaminácii testovacieho systému patogénmi. Musia tiež používať primerané postupy (viď bod 1.6 Zdroje ďalších informácií), ktoré zabránia krížovej kontaminácii medzi testovacími systémami a zaručia integritu štúdie. Zamestnanci štúdie musia byť informovaní a presne dodržiavať požiadavky na izoláciu testovacích systémov a požiadavky na štúdie, biologicky nebezpečných materiálov. Pri testovaní nebezpečných chemikálií v *in vitro* štúdiách musí byť uplatnená primeraná opatrnosť minimalizujúca riziká vyplývajúce z ich použitia.

2.2 Zabezpečenie kvality / *Quality Assurance*

Činnosti pre zabezpečenie kvality sa vo všeobecnosti medzi *in vitro* a *in vivo* štúdiami veľmi neodlišujú. *In vitro* štúdie môžu v niektorých prípadoch spĺňať podmienky pre zaradenie medzi krátkodobé štúdie. V takých prípadoch sa použije OECD dokument "*Aplikácia zásad SLP na krátkodobé štúdie*" (MSA G-07). Takéto štúdie môžu byť teda kontrolované útvaram zabezpečenia kvality prostredníctvom inšpekcie procesov, pokiaľ je to vhodné a povolené národnými smernicami. Keďže zásady SLP vyžadujú, aby zamestnanci útvaru zabezpečenia kvality zvlášť kontrolovali kritické fázy štúdie, je dôležité, aby boli v prípade *in vitro* štúdií informovaní o tom, čo vytvára kritické fázy (a kritické aspekty) týchto štúdií. Pre tieto prípady je potrebné v spolupráci s vedúcim štúdie, vedúcim čiastkovej štúdie a zamestnancami štúdie vypracovať pre zamestnancov úseku zabezpečenia kvality zodpovedajúce návody na kontroly príslušných oblastí. Pretože program pre zabezpečenie kvality musí všade, kde je to potrebné, úplne pokryť špecifické stránky *in vitro* testovania, musia byť vzdelávanie a výcvik zamestnancov úseku zabezpečenia kvality priamo orientované na schopnosť rozoznať potenciálne problémy v špecifických oblastiach *in vitro* testovania.

Špecifické oblasti vyžadujúce kontrolu môžu okrem iných obsahovať postupy a opatrenia pre:

- monitorovanie šarží zložiek médií pre bunkové a pletivové kultúry, ktoré sú kritické z hľadiska výkonu testovacieho systému (napr. plodové teľacie sérum, atď.) a ďalšie materiály s ohľadom na ich vplyv na výkon testovacieho systému;
- posúdenie a zabezpečenie funkčného a morfológického stavu (a integrity) buniek, pletív a ďalších indikátorových materiálov;
- monitorovanie potenciálnej kontaminácie cudzími bunkami, mykoplazmou a ďalšími patogénmi alebo inými náhodnými látkami, pokiaľ to je vhodné;
- čistenie a dekontamináciu priestorov a zariadení a minimalizáciu zdrojov kontaminácie testovaných látok a testovacích systémov;
- zabezpečenie toho, aby špeciálne zariadenia boli používané a udržiavané zodpovedajúcim spôsobom;
- zabezpečenie náležitej kryoochrany a opätovnej vitalizácie (rekonštitúcie) buniek a pletív;
- zabezpečenie náležitých podmienok pre vyhľadávanie materiálov v mrazničkách;
- zabezpečenie sterility materiálov a dodávok používaných na bunkové a pletivové kultúry;
- udržiavanie primeraného vzájomného oddelenia rozdielnych štúdií a testovacích systémov.

2.3 Testovacie pracovisko / Facilities

a) Všeobecne / General

Zásady SLP vyžadujú, že testovacie priestory musia vhodné a spĺňať požiadavky pre štúdie v nich vykonávané a tiež musí byť zabezpečené primerané vzájomné oddelenie rozdielnych činností, aby sa zabezpečila náležitá a neskreslená realizácia každej štúdie. Vzhľadom na fakt, že *in vitro* štúdie vyžadujú všeobecne len obmedzený pracovný priestor a bežne nepožadujú vyhradené priestory, ktoré by vylučovali realizáciu iných štúdií, treba prijať len také opatrenia, ktoré zaisťujú vhodné vzájomné oddelenie *in vitro* štúdií vykonávaných v tom istom fyzickom priestore.

b) Priestory pre testovacie systémy / Test System Facilities

Zásady SLP vyžadujú, aby bol k dispozícii dostatočný počet miestností alebo priestorov na zabezpečenie izolácie testovacieho systému a aby tieto priestory vyhovovali podmienkam, ktoré zabezpečia, aby bola minimalizovaná pravdepodobnosť kontaminácie testovacích systémov. Výraz „priestor“ nie je pritom špeciálne definovaný a jeho interpretácia je preto prispôsobiteľná na rozličné *in vitro* situácie. Dôležitou požiadavkou tu je, aby nedošlo k ohrozeniu integrity žiadneho z testovacích systémov alebo štúdie možnosťou potenciálnej kontaminácie, krížovou kontamináciou alebo ich kombináciou.

Ak sa realizuje primeraný stupeň oddelenia (napr. vhodnými identifikátormi, nálepkami alebo oddeleným umiestnením, aby bolo zrejmé rozlíšenie medzi štúdiami, atď.), je možné inkubovať bunky alebo tkanivá patriace rozličným štúdiám v tom istom inkubátore za predpokladu, že žiadny testovaný materiál/látka nie je natoľko prchavý, aby kontaminoval ostatné štúdie, ktoré sú spoločne inkubované.

Oddelenie kritických fáz štúdie je možné nielen na priestorovom, ale aj časovom základe. Narábanie s bunkovými a pletivovými kultúrami, napr. subkultivačné postupy, pridávanie testovanej látky, atď., sa vykonáva za normálnych okolností v boxe s vertikálnym laminárnym prúdením, ktorý zabezpečuje sterilitu a chráni testovací systém ako aj personál a okolité prostredie. Za týchto okolností je možné dosiahnuť stav, ktorý zabraňuje krížovej kontaminácii medzi rozličnými štúdiami, a to samostatnou, po sebe nasledujúcou manipuláciou s testovacími systémami rozličných štúdií, vrátane starostlivého čistenia a dekontaminácie/sterilizácie pracovných plôch boxu a ostatného zariadenia v laboratóriu, vykonávaných medzi rozdielnymi činnosťami, pokiaľ to je potrebné.

Ďalšou významnou podmienkou je dostupnosť vyhradených miestností alebo priestorov so špeciálnym vybavením na dlhodobé uchovávanie testovacích systémov. Zariadenie, vrátane skladovacích kontajnerov, musí poskytovať primerané podmienky na udržiavanie dlhodobej integrity testovacích systémov.

c) *Priestory pre zaobchádzanie s testovanými a referenčnými látkami / Facilities for Handling Test and Reference Items*

Hoci požiadavky Zásad SLP pri manipulácii s testovanými i referenčnými látkami na ochranu pred krížovou kontamináciou testovanými alebo referenčnými látkami platia rovnako aj pre *in vitro* štúdie, je nevyhnutné brať do úvahy i ďalšie hľadiská. Keďže sterilita je významnou podmienkou pre *in vitro* štúdie, je pri nich nevyhnutné zabezpečiť, aby priestory na prípravu a miešanie testovaných a referenčných látok s nosnými látkami – rozpúšťadlami umožňovali prácu v aseptických podmienkach a takto chránili testovací systém minimalizovaním možnosti kontaminácie testovanými alebo referenčnými látkami.

2.4 Prístroje, materiál a činidlá / Apparatus, Material and Reagents

Hoci bežné požiadavky SLP na prístroje platia i na prístroje používané pre *in vitro* štúdie, platia pre tieto zariadenia i niektoré zvlášť dôležité špecifické požiadavky. Napríklad pre integritu a hodnovernosť niektorých *in vitro* štúdií je dôležité, aby boli zabezpečené a monitorované vhodné podmienky pre také prístroje a zariadenia, ako sú mikrováhy, mikropipety, laminárne boxy alebo inkubátory a aby boli pravidelne udržiavané, sledované a kalibrované. Pre špeciálne zariadenia by sa mali stanoviť kritické parametre, ktoré je potrebné nepretržite sledovať, resp. nastaviť hraničné hodnoty spolu s inštaláciou alarmov.

Požiadavky Zásad SLP pre reagenty, z hľadiska ich označovania a expirácie, platia rovnako i pre *in vitro* štúdie.

2.5 Testovacie systémy / Test Systems

In vitro testovacie systémy sú predovšetkým biologické systémy, hoci v súčasnosti vyvinuté alternatívy ku klasickým *in vivo* testom (napr. génové matice – arrays – pre toxikogenomiku) vykazujú niektoré vlastnosti fyzikálno-chemických testovacích systémov, iné, napr. pre toxikometabonomiku, využívajú predovšetkým analytickú metodológiu. Testovacie súpravy, vrátane patentovaných testovacích súprav, sa tiež považujú za testovacie systémy.

a) *Podmienky pre testovacie systémy / Conditions for Test Systems*

Rovnako ako pre ostatné biologické systémy je potrebné i v tomto prípade definovať, udržiavať a sledovať príslušné podmienky tak, aby sa zabezpečila kvalita a integrita testovacieho systému

ako počas skladovania, tak aj v rámci štúdie. To zahŕňa zdokumentované definovanie, udržiavanie a sledovanie životaschopnosti a citlivosti testovacieho systému, vrátane zaznamenávania počtu pasáží buniek a časov zdvojnásobovania populácie. Záznamy musia byť vedené i o environmentálnych podmienkach (napr. o hladine kvapalného dusíka v kryogénnom zásobníku, teplote, vlhkosti a koncentrácii CO₂ v inkubátoroch a pod.), ako aj o každom narábaní s testovacím systémom, ktorým sa udržiava jeho kvalita a integrita (napr. ošetrovanie antibiotikami alebo fungicídmi, subkultivácia, selektívna kultivácia na obmedzenie frekvencie spontánnych zmien). Udržiavanie vhodných environmentálnych podmienok počas uchovávaní testovacieho systému môže významnejšie ovplyvniť kvalitu údajov v porovnaní s inými biologickými testovacími systémami, preto pre kvalitu a spoľahlivosť výsledkov majú veľký význam záznamy o týchto environmentálnych podmienkach.

b) Novoprijímané testovacie systémy / Newly Received Test Systems

Je nevyhnutné kontrolovať a uchovávať všetku dokumentáciu získanú od dodávateľov *in vitro* testovacích systémov (t.j. pôvod, vek/počet pasáží, čas zdvojnásobenia počtu buniek a ďalšie relevantné parametre, ktoré pomáhajú identifikovať testovací systém). Na hodnotenie životaschopnosti, vhodnosti a citlivosti testovacieho systému sa musia použiť vopred stanovené kritériá (napr. funkčný a/alebo morfológický stav buniek a tkanív, testovanie na známe alebo podozrivé mikrobiálne alebo vírusové kontaminanty). Výsledky takéhoto hodnotenia musia byť tiež doložené a uchovávané v záznamoch o štúdiu. Pokiaľ nie je možné vykonať takéto testy, napr. s primárnymi kultúrami alebo „rekonštituovanými orgánmi“, musí byť medzi užívateľom a dodávateľom vytvorený mechanizmus na stanovenie a preukázanie vhodnosti testovacieho systému. Sledovanie a zaznamenávanie výkonnosti daného testovacieho systému v porovnaní s negatívnou alebo pozitívnou kontrolou môže byť dostatočným dôkazom citlivosti daného testovacieho systému. Akékoľvek problémy testovacieho systému, ktoré môžu ovplyvniť kvalitu, validitu a spoľahlivosť štúdie, musia byť doložené a diskutované v záverečnej správe. Problémy s dodávateľsky zabezpečenými testovacími systémami, vrátane nápravných činností, sú zodpovednosťou dodávateľa.

c) Záznamy o testovacích systémoch / Test System Records

Zásady SLP vyžadujú, aby sa uchovávali záznamy o zdroji, dátume dodávky a stave testovacích systémov pri dodaní. Pre bunky a tkanivá by tieto záznamy mali zahŕňať nielen údaje o ich priamom zdroji (t.j. o obchodnom dodávateľovi), ale tiež údaje o pôvodnom zdroji, z ktorého boli bunky alebo tkanivá získané (t.j. primárne bunky alebo pletivá s darcovskými charakteristikami; stabilizované bunkové línie z uznávaných zdrojov, atď.). Ďalšie informácie, ktoré sa musia okrem iných uchovávať, sú informácie o spôsobe, akým boli bunky alebo pletivá pôvodne získané (napr. odvodené od pletivových explantátov, z biopsií normálnych alebo rakovinových tkanív, prenosom génov plazmidovou transfekciou alebo vírusovou transdukciou, atď.), o udržiavaní, počte pasáží, kultivačných podmienkach a subkultivačných intervaloch, o podmienkach zmrazenia/rozmrazenia atď. Pre transgénne testovacie systémy je okrem toho nevyhnutné zistiť charakter transgénu a sledovať zachovávanie jeho prejavov vhodnými kontrolami.

Zvláštnu pozornosť je potrebné venovať primeranému označovaniu testovacích systémov počas skladovania a používania, vrátane opatrení na zaistenie trvanlivosti označenia. Hlavne v prípadoch, keď veľkosť zásobníkov a podmienky skladovania (napr. kryoskúmavky v kvapalnom dusíku, viaceré testovacie systémy skladované v jednom zásobníku) môžu byť kritickými faktormi pre označovanie, je nevyhnutné príslušnými opatreniami zabezpečiť vždy správnu identifikáciu testovacích systémov.

Požiadavky zásad SLP na testované látky a reagentie z hľadiska ich označovania a expiračných dôb platia rovnako i pre testovacie súpravy používané ako *in vitro* testovacie systémy. Testovacie súpravy použité ako testovacie systémy alebo za iným účelom, napr. na analytické účely, musia mať vyznačenú expiračnú dobu. Predĺženie tejto expiračnej doby je možné len na základe doloženého hodnotenia (alebo analýzy). Pre testovacie súpravy použité ako testovacie systémy môže mať takéto hodnotenie podobu napr. záznamov odoziev, získaných z príslušnej šarže testovacej súpravy na pozitívne, negatívne a/alebo kontroly nosnej látky s dôkazom, že hoci sú po expiračnej dobe, príslušná odozva nie je odlišná od historických kontrolných hodnôt. Zdokumentované rozhodnutie vedúceho štúdie o predĺžení expiračnej doby musí obsahovať i dôkaz o takomto procese hodnotenia.

Aby sa zabránilo novej zámene, označenie testovacích systémov musí byť jasne definované a používané etikety na testovacom systéme a všetky záznamy z jednotlivých štúdií musia mať oficiálne schválené označenie daného testovacieho systému.

2.6 Testované a referenčné látky (vrátane pozitívnych a negatívnych kontrolných látok) / Test and Reference Items (including Negative and Positive Control Items)

Vo všeobecnosti nie sú stanovené špecifické požiadavky na príjem, manipuláciu, vzorkovanie, skladovanie a charakterizáciu testovaných a referenčných látok, ktoré sa používajú v štúdiách využívajúcich *in vitro* testovacie systémy, okrem tých, ktoré sú uvedené vo všeobecných Zásadách SLP. Pri manipulácii s nimi môžu byť vyžadované aseptické podmienky, aby sa zabezpečila ochrana testovacích systémov pred mikrobiálnou kontamináciou.

Pre látky používané ako kontroly (negatívna, pozitívna, kontrola s nosným médiom) môže, ale nemusí byť potrebné stanoviť ich koncentráciu a homogenitu, pokiaľ postačuje dôkaz o očakávanej a správnej odozve testovacieho systému na tieto látky.

Expiračná doba takýchto kontrolných látok sa tiež môže predĺžiť na základe doloženého hodnotenia alebo analýzy. Takéto hodnotenie môže vyplývať z dôkazu, že odozva príslušných testovacích systémov na dané pozitívne a negatívne kontroly a/alebo nosné médiá sa nelíši od pôvodných kontrolných údajov zaznamenaných na testovacom pracovisku a tieto údaje sú navyše porovnateľné s publikovanými referenčnými hodnotami.

2.7 Štandardné pracovné postupy / Standard Operating Procedures (ŠPP/SOPs)

Okrem príkladov uvedených vo všeobecných zásadách SLP (viď kapitolu 7.4.1 – 7.4.5) existujú v rámci *in vitro* testovania špecifické činnosti a postupy, ktoré by mali byť opísané v štandardných pracovných postupoch. Takéto ŠPP musia byť navyše vypracované pre, ale nielen pre nasledujúce názorné príklady činností testovacieho pracoviska v rámci *in vitro* testovania:

a) Priestory / Facilities

Monitoring prostredia s ohľadom na prítomnosť patogénov vo vzduchu a na povrchoch, čistenie a dezinfekcia, postupy v prípade infekcie alebo kontaminácie v testovacom priestore alebo jeho okolí.

b) Prístroje / Apparatus

Použitie, údržba, sledovanie výkonu, čistenie a dekontaminácia zariadení a nástrojov na bunkové a pletivové kultúry, ako sú laminárne boxy a inkubátory; sledovanie hladiny kvapalného dusíka v skladovacích kontajneroch; kalibrácia a sledovanie teploty, vlhkosti a obsahu CO₂ v inkubátoroch.

c) Materiály, chemikálie a roztoky / Materials, Reagents and Solutions

Hodnotenie vhodnosti, možnosti predĺženia expiračnej doby, hodnotenie a udržiavanie sterility, skrining bežných patogénnych kontaminantov; opis postupov pre výber a použitie nosných médií; overenie postupov pre kompatibilitu nosných médií s testovacím systémom.

d) Testovacie systémy / Test Systems

Podmienky pre skladovanie a postupy pre zmrazovanie a rozmrazovanie buniek a pletív/tkanív, testovanie na bežné patogény; vizuálna kontrola kontaminácie; verifikačné postupy (napr. použitie akceptačných kritérií) na zabezpečenie vlastností a citlivosti pri dodaní a počas používania, či už hneď po dodaní alebo po istej dobe skladovania; morfológické hodnotenie, kontrola fenotypovej alebo karyotypovej stability; kontrola transgénnej stability; spôsob založenia (naočkovania) kultúry, podmienky kultivácie so subkultivačnými intervalmi; nakladanie s biologicky nebezpečnými materiálmi a testovacími systémami, postupy na likvidáciu testovacích systémov.

e) Realizácia štúdie / Performance of the Study

Aseptické postupy, akceptačné kritériá pre validitu štúdie, kritériá pre opakovania testov.

f) Zabezpečenie kvality / Quality Assurance

Definovanie kritických fáz, frekvencia inšpekcií.

2.8 Realizácia štúdie / Performance of the Study

Požiadavky SLP na realizáciu *in vitro* štúdií sú zhodné s požiadavkami na bežné štúdie bezpečnosti. Aby sa pri realizácii *in vitro* štúdií zabezpečil ich súlad so SLP, je často potrebné kombinovať všeobecné Zásady SLP (nariadenie 320/2010 Z. z. v znení neskorších predpisov) s OECD dokumentom „Aplikácia Zásad SLP na krátkodobé štúdie“ (MSA G-07).

2.9 Správa o výsledkoch štúdie / Reporting of Study Results

Existuje mnoho špecifických stránok testovania *in vitro*, ktoré musia byť uvedené ako v pláne štúdie, tak aj v záverečnej správe o štúdií. Špecifické prvky sú predovšetkým vedeckej alebo technickej povahy. Takým prvkom je napr. požiadavka, aby všetky interné kontroly (príslušné pozitívne, negatívne a neošetrené kontroly a/alebo kontroly nosného média) vykonávané za účelom kontroly odchýlky a hodnotenia výkonnosti testovacieho systému boli vykonané súčasne s testovanou látkou vo všetkých *in vitro* štúdiách. Dôkladnejšie poučenia o oblastiach, ktoré musia byť uvedené v pláne štúdie a v záverečnej správe, možno nájsť v príslušných testovacích metódach OECD, Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 z 30. mája 2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 19087/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) v platnom znení, alebo v iných vhodných zdrojoch .

2.10 Uchovávanie záznamov a materiálov / *Storage and Retention of Records and Materials*

Všeobecné podmienky pre ukladanie a uchovávanie záznamov stanovené vo všeobecných Zásadách SLP platia rovnako aj pre *in vitro* štúdie. Navyše treba zvážiť uchovávanie vzoriek testovacích systémov, ktoré je možné dlhodobo uchovávať, zvlášť testovacích systémov s obmedzenou dostupnosťou (napr. špeciálne subklony bunkových línií, transgénne bunky a pod.), s cieľom umožniť potvrdenie identity testovacieho systému a/alebo rekonštruovateľnosť štúdie.

Aj pri *in vitro* štúdiách, ktoré sú zaradené medzi krátkodobé, treba zvážiť uchovávanie vzoriek testovaných látok a to zvlášť v prípadoch, kedy *in vitro* štúdie sú súčasťou štúdií bezpečnosti.

Všetky historické záznamy o výsledkoch použitia pozitívnej, negatívnej alebo neošetrenej kontroly a/alebo nosného média musia byť tiež uchovávané, s cieľom stanoviť prijateľný rozsah odozvy testovaného systému.

©SNAS 2012