

## METODICKÁ SMERNICA PRE SPRÁVNU LABORATÓRNU PRAX

MSA-G/14

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

(OECD Guideline No. 14)

Schválil: **Ing. Štefan Král, PhD.**  
riaditeľ SNAS

Účinnosť od: 15.09.2024	Vydanie: 5 Aktualizácia: 0	Označenie RD: MSA-G/14
----------------------------	-------------------------------------	---------------------------

- Tento dokument bol vytvorený elektronicky -

---

Táto metodická smernica je prekladom dokumentu 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, © 2018, © 2024 SNAS pre slovenské vydanie  
Za kvalitu slovenského prekladu a jeho kompatibilitu s pôvodným textom a národnou legislatívou zodpovedá SNAS.

Spracovali: **Ing. Henrieta Bóriková**  
**Ing. Kvetoslava Forišeková**

Dátum **30.07.2024**  
spracovania:  
Preskúmala: **RNDr. Lívia Kijovská, PhD.**

Nadobudnutím účinnosti tejto MSA končí účinnosť **MSA-G/14** zo dňa 15.07.2018.

Táto MSA neprešla jazykovou úpravou.

Metodické smernice na akreditáciu sa nesmú rozmnožovať a kopírovať na účely predaja.

Dostupnosť MSA: <https://www.snas.sk>

---

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVODNÉ USTANOVENIA.....</b>	<b>5</b>
1.1	PREDHOVOR.....	5
<b>2</b>	<b>DEFINÍCIA POJMOV .....</b>	<b>5</b>
2.1	SLP .....	5
2.2	POJMY TÝKAJÚCE SA TESTOVACIEHO PRACOVISKA .....	6
2.3	POJMY TÝKAJÚCE SA NEKLINICKÝCH ŠTÚDIÍ ZDRAVOTNEJ A ENVIRONMENTÁLNEJ BEZPEČNOSTI.....	7
2.4	POJMY TÝKAJÚCE SA TESTOVANEJ LÁTKY .....	8
2.5	POJMY TÝKAJÚCE SA INŠPEKCIE TESTOVACIEHO PRACOVISKA.....	9
<b>3</b>	<b>SKRATKY .....</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>SÚVISIACE PREDPISY .....</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>VECNÁ ČASŤ.....</b>	<b>11</b>
5.1	ÚVOD.....	11
5.1.1	Účel dokumentu.....	12
5.1.2	Rozsah.....	12
5.1.3	Definícia pojmov špecifických pre in-vitro štúdie.....	12
5.2	ZODPOVEDNOSTI.....	15
5.2.1	Vedenie testovacieho pracoviska.....	15
5.2.2	Vedúci štúdie.....	15
5.2.3	Pracovníci podieľajúci sa na štúdiu.....	16
5.3	ZABEZPEČENIE KVALITY.....	16
5.4	TESTOVACIE PRACOVISKO .....	17
5.4.1	Všeobecne .....	17
5.4.2	Priestory pre testovacie systémy .....	17
5.4.3	Priestory pre zaobchádzanie s testovanými a referenčnými látkami.....	18
5.5	PRÍSTROJE, MATERIÁL, ČINIDLÁ.....	18
5.6	TESTOVACIE SYSTÉMY .....	19
5.6.1	Podmienky pre testovacie systémy.....	19
5.6.2	Novoprijímané testovacie systémy .....	19
5.6.3	Záznamy o testovacích systémoch.....	20

---

<b>5.7</b>	<b>TESTOVANÉ A REFERENČNÉ LÁTKY (VRÁTANE POZITÍVNYCH A NEGATÍVNYCH KONTROLNÝCH LÁTKO)</b> .....	<b>20</b>
<b>5.8</b>	<b>ŠTANDARDNÉ PRACOVNÉ POSTUPY</b> .....	<b>21</b>
5.8.1	Priestory .....	21
5.8.2	Prístroje .....	21
5.8.3	Materiály, chemikálie a roztoky.....	21
5.8.4	Testovacie systémy.....	21
5.8.5	Realizácia štúdie .....	21
5.8.6	Zabezpečenie kvality.....	22
<b>5.9</b>	<b>REALIZÁCIA ŠTÚDIE</b> .....	<b>22</b>
<b>5.10</b>	<b>SPRÁVA O VÝSLEDKOV ŠTÚDIE</b> .....	<b>22</b>
<b>5.11</b>	<b>UCHOVÁVANIE ZÁZNAMOV A MATERIÁLOV</b> .....	<b>22</b>

## 1 ÚVODNÉ USTANOVENIA

### 1.1 PREDHOVOR

V súčasnosti sa stupňuje úsilie o obmedzenie používania zvierat pri testovaní bezpečnosti chemických látok. *In vitro* metódy hrajú čoraz významnejšiu úlohu ako alternatíva, či doplnenie 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 v oblasti testovania genotoxicity. Pracovná skupina OECD pre Správnu laboratórnu prax preto vypracovala ďalší návod, s dôrazom na použitie OECD zásad SLP pri *in vitro* štúdiách.

Pod vedením Švajčiarska bola zriadená pracovná skupina, ktorá sa zišla v Berne 12. - 13. februára 2004. Pracovnú skupinu tvorili členovia Pracovnej skupiny SLP alebo nimi nominovaní odborníci na testovanie *in vitro*, zastupujúci Belgicko, Francúzsko, Nemecko, Japonsko, Holandsko, Švajčiarsko, Spojené štáty americké a Európsku komisiu.

Dokument pripravený touto skupinou bol preskúmaný Pracovnou skupinou SLP na svojom 18. zasadnutí v máji 2004, kde bol doplnený a schválený. Výbor pre chemikálie (Chemicals Committee) a Pracovná skupina pre chemikálie, pesticídy a biotechnológiu (Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology) na svojom 37. spoločnom zasadnutí následne schválili dokument a odporučili, aby bol tento dokument postúpený generálnemu tajomníkovi na zverejnenie.

## 2 DEFINÍCIA POJMOV

Prevzaté z OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No.1, OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997).

*Pozn. SNAS: Vysvetlenie špecifických pojmov je uvedené v príslušných MSA-G, ktorých sa to týka.*

### 2.1 SLP

**Zásady správnej laboratórnej praxe** – systém kvality vzťahujúci sa na proces organizácie a podmienky, za ktorých sa neklinické štúdie plánujú, vykonávajú, overujú, zaznamenávajú, ukladajú a oznamujú. Neklinické štúdie sa vykonávajú na testovacích pracoviskách, ktorými sú laboratória, skleníky a polia.

**Národný program dodržiavania zásad SLP (NP SLP)** – zisťuje, či testovacie pracoviská zaviedli zásady SLP do praxe a či sú schopné zabezpečiť, že výsledné údaje majú zodpovedajúcu kvalitu. NP SLP vymedzuje pôsobnosť a rozsah programu, poskytuje informáciu o mechanizme, prostredníctvom ktorého testovacie pracovisko vstúpi do programu, o druhoch inšpekcii testovacích pracovísk a auditov štúdií, opisuje rôzne druhy inšpekcii, ako aj ich frekvenciu a vymedzuje právomoci inšpektorov.

**Osvedčenie SLP** – je dokument, ktorým sa deklaruje, že testovacie pracovisko (laboratórium) vykonáva štúdie (testy, skúšky) v súlade so zásadami Správnej laboratórnej praxe.

## Národná monitorovacia autorita v dokumentoch OECD a EC = akreditujúca osoba (SNAS) v legislatíve SLP na Slovensku

### 2.2 POJMY TÝKAJÚCE SA TESTOVACIEHO PRACOVISKA

**Testovacie pracovisko** – pracovisko uvedené v zákone<sup>1</sup> vrátane osôb, priestorov a prevádzkových jednotiek potrebných na vykonávanie neklinických štúdií zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti. Pre multicentrové štúdie, teda také, ktoré sú vykonávané na viacerých miestach, sa pod testovacím pracoviskom rozumie miesto, kde pracuje vedúci štúdie spolu so všetkými ďalšími testovacími miestami zúčastňujúcimi sa na štúdiu.

**Testovacie miesto** – znamená také miesto, kde je vykonávaná určitá časť štúdie.

**Vedenie testovacieho pracoviska** – osoba(y), ktorá je zodpovedná za organizáciu a chod testovacieho pracoviska podľa zásad správnej laboratórnej praxe. Vykonáva právne úkony, administratívno-správne úkony vo všetkých veciach testovacieho pracoviska na základe zmluvy o zriadení pracoviska zakladajúcou listinou alebo zákonom.

**Vedenie testovacieho miesta** – (ak bolo vymenované) – osoba(y) zodpovedajúca za to, aby časť štúdie, za ktorú zodpovedá, bola vykonávaná v súlade so zásadami SLP.

**Vedúci testovacieho pracoviska** – v prípade zložitejšej organizačnej štruktúry testovacieho pracoviska osoba, ktorá je priamo zodpovedná za konkrétnu činnosť testovacieho pracoviska podľa zásad správnej laboratórnej praxe (riaditeľ odboru, vedúci laboratória...). Právomoci na zabezpečenie činnosti podľa zásad SLP má delegované od vedenia testovacieho pracoviska buď poverením alebo definovaním v pracovnej náplni.

**Objednávateľ štúdie** – subjekt, ktorý si objednáva, finančne zabezpečuje a predkladá neklinickú štúdiu zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti na posúdenie.

(Pozri aj Nariadenie vlády č. 320/2010 Z. z. v znení neskorších predpisov, § 3, (5)).

#### Poznámka

*Objednávateľom môže byť:*

- *Subjekt\*, ktorý prichádza s návrhom vykonať a podporuje, poskytnutím finančných alebo iných zdrojov, neklinické štúdie zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti;*
- *Subjekt\*, ktorý predkladá neklinické štúdie zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti oprávnenej autorite pri registrácii produktu, alebo pri inej žiadosti, pre ktorú je súlad so zásadami SLP vyžadovaný.*

---

*\* „Subjektom“ môže byť jednotlivec, obchodná spoločnosť, združenie, vedecký, alebo akademický ústav, vládna agentúra alebo ich organizačné jednotky, alebo akýkoľvek iný právne identifikovateľný subjekt.*

**Vedúci štúdie** – osoba zodpovedajúca za celkové vykonanie neklinickej štúdie bezpečnosti zdravia a životného prostredia, vrátane plánu štúdie a záverečnej správy.

---

<sup>1</sup> § 2 písm. e) zákona č. 67/2010 Z.z. o podmienkach uvedenia chemických látok a chemických zmesí na trh a o zmene a doplnení niektorých zákonov (chemický zákon).

**Vedúci čiastkovej štúdie** – osoba, ktorá v prípade štúdie vykonávanej na viacerých miestach koná v mene vedúceho štúdie a zodpovedá za jej pridelené časti štúdie.

**Program zabezpečenia kvality (Quality Assurance Programme – QAP)** – definovaný systém, zahŕňajúci zamestnancov, ktorý je nezávislý od vykonávania štúdie a slúži na zabezpečenie súladu postupu prác v testovacom pracovisku so zásadami správnej laboratórnej praxe.

**Zabezpečenie kvality (Quality Assurance – QA)** – zdroje zodpovedné za implementáciu a udržiavanie QAP.

*Pozn.: Zodpovednosti QA v SLP, okrem iného, nezahŕňajú riadenie dokumentácie systému kvality, riadenie nástrojov pre vylepšenia organizačných procesov (hoci niektoré testovacie pracoviská môžu prideliť tieto činnosti QA), schvaľovanie odchýlok alebo schvaľovanie primeranosti zdrojov. Uznáva sa, že iné systémy kvality (napr. ISO 9000, Správna výrobná prax (GMP), ISO 17025) používajú pojem „zabezpečenie kvality“ v inom kontexte.*

**Štandardné pracovné postupy (ŠPP)** – sú dokumentované postupy, ktoré opisujú, ako vykonávať testy alebo činnosti, ktoré nie sú detailne špecifikované v študijných plánoch alebo v oficiálnych a všeobecne akceptovaných testovacích metódach (OECD, REACH).

**Master Schedule** – súbor informácií o vykonávaných štúdiách na testovacom pracovisku, slúži na sledovanie štúdií a vyťaženia testovacieho pracoviska.

### **2.3 POJMY TÝKAJÚCE SA NEKLINICKÝCH ŠTÚDIÍ ZDRAVOTNEJ A ENVIRONMENTÁLNEJ BEZPEČNOSTI**

**Neklinická štúdia zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti** – ďalej len „štúdia“ – znamená experiment alebo súbor experimentov, ktorými je testovaná látka skúmaná v laboratórnych podmienkach alebo v životnom prostredí, s cieľom získať údaje o jej vlastnostiach a/alebo zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti, ktoré sú plánované ako podklad pre rozhodnutie príslušnej regulačnej autority pred jej povolením do používania.

**Krátkodobá štúdia** – štúdia krátkeho trvania so všeobecne používanými bežnými technikami.

**Multicentrová štúdia** – akákoľvek štúdia, ktorej niektoré fázy sú vykonávané na viac ako jednom mieste. Takéto štúdie sú nevyhnutné, ak je potrebné využiť miesta, ktoré sú zemepisne vzdialené, organizačne rozdielne alebo ináč oddelené. To sa týka aj oddelenia organizácie, ktoré slúži ako testovacie miesto, kým iné oddelenie tej istej organizácie pôsobí ako testovacie pracovisko.

**Fáza / etapa štúdie** – definovaná činnosť alebo súbor činností pri uskutočňovaní štúdie.

**Plán štúdie** – dokument, ktorý definuje ciele a experimentálne plánovanie skúšok na vykonávanie štúdie, vrátane jeho zmeny a doplnky.

**Doplnok plánu štúdie** – predstavuje cieleňú zamýšľanú zmenu plánu štúdie.

**Odchýlka od plánu štúdie** – neočakávaná odchýlka od plánu štúdie po dátume začatia štúdie.

**Testovací systém** – biologický, fyzikálny alebo chemický systém alebo ich kombinácia použitá v štúdiu.

**Primárne údaje** – všetky pôvodné záznamy a dokumentácia vypracovaná v testovacom pracovisku, alebo ich verifikované kópie, ktoré sú výsledkom pozorovaní a činností vykonaných v štúdiu. Primárne údaje môžu zahŕňať aj fotografie, mikrofilmy, počítačové médiá na uchovávanie údajov, diktované pozorovania, záznamy z automatizovaných prístrojov alebo iné záznamové médiá určené na uchovávanie dát.

**Vzorka** – každý materiál odobratý z testovacieho systému za účelom vyšetrenia, analýzy alebo uchovávania.

**Dátum začiatku štúdie** – dátum, kedy vedúci štúdie podpísal plán štúdie.

**Dátum experimentálneho začiatku štúdie** – dátum, kedy boli získané prvé údaje zo štúdie.

**Dátum ukončenia experimentu** – posledný deň, kedy boli získané údaje zo štúdie.

**Dátum ukončenia štúdie** – dátum, kedy vedúci štúdie podpísal záverečnú správu zo štúdie.

## 2.4 POJMY TÝKAJÚCE SA TESTOVANEJ LÁTKY

**Testovaná látka** – látka, ktorá je predmetom SLP štúdie. Závery SLP štúdie poskytnú informácie o vlastnostiach testovanej látky, ktoré umožnia zhodnotiť, aké riziko predstavuje testovaná látka pre bezpečnosť ľudí, zvierat alebo pre životné prostredie.

*Treba upozorniť že v niektorých OECD Test Guidelines sa pre „testovanú látku“ používa aj pojem "test chemical". (odsúhlasené v júni 2013, OECD's Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology). Teda môžeme sa stretnúť aj s pojmami "test item", "test compound", "test substance". Cieľom tohto návrhu nebolo zavedenie novej definície pojmu "chemikália", ale skôr išlo o zosúladenie terminológie s definíciou uvedenou v UN GHS pre klasifikáciu a označovanie, kde sa pod chemikáliou myslí aj "látka a zmes"*

**Referenčná látka** – akákoľvek látka, použitá ako základ na porovnanie s testovanou látkou.

**Šarža** – špecifické množstvo testovanej alebo referenčnej látky vyrobené v jednom cykle výroby, takže sa dá očakávať, že majú homogénny charakter a dajú sa za také pokladať.

**Nosič / Vehikulum** – akákoľvek látka, ktorá slúži ako nosič na zmiešavanie, dispergovanie, alebo zvyšovanie rozpustnosti testovanej a/alebo referenčnej látky s cieľom umožnenia a zjednodušenia jej podávania/aplikácie testovaciemu systému.

**Formulácia (test. látka + nosič)** – kombinácia testovanej látky a rôznych prísad, ako pomocných látok, ktoré sú skombinované a podávané a/alebo aplikované testovaciemu systému v rôznych formách (napr. tabletky, kapsule, roztok...).

**Príprava testovanej látky/alebo pripravená testovaná látka** – môže byť formuláciou (alebo zmesou) obsahujúcou testovanú látku, alebo testovanú látku v nosiči, kde sa táto kombinácia získa riedením, miešaním, dispergovaním, vytvorením suspenzie, rozpustením a/alebo iným procesom so zámerom aplikovať ju testovaciemu systému. Testovaciemu pracovisku môže byť dodaná testovaná látka (na priame podanie), alebo



testovaná látka, ktorá ešte musí byť nejako pripravená alebo pripravok s testovanou látkou, ktorý možno priamo podať alebo aplikovať testovaciemu systému (tiež nazývaná “ready-to-use”).

Testovaná látka, ktorá je zapuzdrená (encapsulated) alebo balená iným spôsobom, bez prítomnosti pomocných látok alebo nosiča, sa nepovažuje za to isté ako „pripravená testovaná látka“ opísaná v tomto dokumente.

**Charakterizácia** – určuje vlastnosti testovanej látky a poskytuje dôkazy na podporu vhodnosti jej použitia v SLP štúdiách.

**Identifikácia** – proces kontroly a hodnotenia testovanej látky porovnaním s dodanými informáciami, s cieľom určiť, či testovaná látka je tá, ako bola očakávaná. Poskytnutými informáciami môžu byť prepravné doklady, e-maily od dodávateľa, označenie etiketou na testovanej látke, atď. Typickými znakmi používanými na identifikáciu testovanej látky môžu byť – názov, číslo šarže, čistota, koncentrácia, zloženie, chemické, fyzikálne a biologické parametre. Identifikácia môže tiež zahŕňať fyzikálnu a/alebo analytickú kontrolu. Proces identifikácie musí byť vykonaný pred začiatkom experimentálnej fázy SLP štúdie.

**Dátum expirácie** – stanovený dátum, do ktorého sa očakáva, že testovaná látka si zachová svoje vlastnosti v rámci špecifikácií, pokiaľ je skladovaná za definovaných podmienok a po uplynutí ktorého už nemôže byť použitá.

**Dátum retestovania** – dátum, kedy testovaná látka môže byť znovu otestovaná, s cieľom ubezpečiť sa, že je ešte stále vhodná na použitie.

## 2.5 POJMY TÝKAJÚCE SA INŠPEKCIE TESTOVACIEHO PRACOVISKA

**Inšpekcia testovacieho pracoviska** – kontrola postupov testovacieho pracoviska a praktických činností smerujúcich k dosiahnutiu stupňa zhody so zásadami SLP, počas ktorej sa skontrolujú systémy riadenia a pracovné postupy testovacieho pracoviska, ako aj integrita údajov, aby sa zabezpečilo, že výsledné údaje majú náležitú kvalitu na posúdenie a rozhodovanie národnými regulačnými orgánmi.

**Inšpektor** – osoba, vykonávajúca inšpekcie testovacích pracovísk a audity neklinických štúdií v zastúpení akreditujúcej osoby (SNAS).

**Audit štúdií** – porovnanie prvotných údajov a súvisiacich záznamov v predbežnej alebo záverečnej správe, s cieľom určiť, či primárne údaje boli presne zaznamenané, či sa testovanie vykonalo v súlade s plánom štúdie a štandardnými pracovnými postupmi, získať dodatočné informácie neuvedené v správe a stanoviť, či postupy použité pri spracovaní údajov mohli ovplyvniť ich validitu.

**Správa o inšpekcii** – oficiálny písomný doklad o vykonanej inšpekcii, v ktorej sú identifikované všetky posudzované prvky a činnosti, menovite uvedené všetky nedostatky a posúdená miera dodržiavania zásad SLP. Určuje kvalitu a integritu údajov preverovaného testovacieho pracoviska.

### 3 SKRATKY

<b>GLP</b>	Good Laboratory Practice
<b>MSA</b>	Metodická smernica
<b>OECD</b>	Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (Organisation for Economic Cooperation and Development)
<b>SLP</b>	Správna laboratórna prax
<b>SNAS</b>	Slovenská národná akreditačná služba
<b>ŠPP</b>	Štandardný pracovný postup
<b>SR</b>	Slovenská republika
<b>ÚZK/QAU</b>	Útvar zabezpečenia kvality/Quality Assurance Unit
<b>NP SLP</b>	Národný program dodržiavania zásad SLP
<b>TFM</b>	Vedenie testovacieho pracoviska (Test Facility Management)
<b>QA</b>	Pracovník ÚZK (Quality Assurance)
<b>QAP</b>	Program zabezpečenia kvality (Quality Assurance Programme)
<b>REACH</b>	Európska chemická legislatíva – REACH (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals)

### 4 SÚVISIACE PREDPISY

**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 č. 320/2010 Z. z.**, ktorým sa upravujú činnosti testovacích pracovísk a činnosti inšpektorov vykonávajúcich inšpekcie, audit a overovanie dodržiavania zásad správnej laboratórnej praxe.

**Nariadenie vlády SR č. 92/2012 Z. z.**, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 320/2010 Z. z., ktorým sa upravujú činnosti testovacích pracovísk a činnosti inšpektorov vykonávajúcich inšpekcie, audit a overovanie dodržiavania zásad správnej laboratórnej praxe.

**Zákon č. 53/2023 Z. z.** o akreditácii orgánov posudzovania zhody

**MSA série G** – všetky MSA vydané SNAS, týkajúce sa SLP dostupné na webovej stránke [www.snas.sk](http://www.snas.sk)

**EU**

**Smernica 2004/9/ES** o inšpekcii a overovaní správnej laboratórnej praxe (kodifikovaná verzia)

**Smernica 2004/10/ES** o zosúlad'ovaní zákonov, predpisov a správnych opatrení uplatňovaných na zásady správnej laboratórnej praxe a overovanie ich uplatňovania pri testoch chemických látok (kodifikovaná verzia)

**Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006** z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (**REACH**) a o zriadení európskej chemickej agentúry (ECHA), o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice

rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES, v platnom znení.

**Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008** zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, platnom znení.

**Nariadenie Komisie č. 440/2008** z 30. mája 2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia EP a R č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (**REACH**).

## OECD

- 1981 Council Act Decision [C (81)30/Final] on the Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals,
- 1989 Council Decision Recommendation on Compliance with Principles of Good Laboratory Practice [C (89)87/Final]

## 5 VECNÁ ČASŤ

### 5.1 Úvod

Štúdie využívajúce *in vitro* testovacie systémy sa dlhodobo používajú pre získanie údajov o bezpečnosti chemikálií s ohľadom na ľudské zdravie a životné prostredie. Národné právne predpisy vyžadujú, aby boli tieto štúdie realizované v súlade s požiadavkami správnej laboratórnej praxe<sup>2</sup>. Tradične bývajú *in vitro* metódy používané hlavne v oblasti testovania genotoxicity. V štúdiách genotoxicity je zhodnotenie rizika založené na veľkom súbore údajov 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 pre všetky typy štúdií. Z tohto dôvodu sú zásady SLP a súvisiace konsenzné dokumenty<sup>3</sup> všeobecným návodom na vykonávanie všetkých neklinických zdravotných a environmentálnych štúdií bezpečnosti, vrátane *in vitro* štúdií. S cieľom uľahčiť aplikáciu a výklad zásad SLP vo vzťahu k špecifickej situácii testovania *in vitro*, ďalšie objasnenia a usmernenia, pokladané za užitočné, sú uvedené v tomto dokumente.

<sup>2</sup> Revised OECD Principles of Good Laboratory Practice [C(97)186 (Final)]

<sup>3</sup> OECD series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring

### 5.1.1 Účel dokumentu

Účelom tohto dokumentu je napomôcť 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 (doplňkovú) interpretáciu zásad a ich aplikáciu pre *in vitro* štúdie vykonávané pre regulačné účely. Je písaný takým spôsobom, aby umožnil ľahké porovnávanie so zásadami SLP (rovnaké členenie kapitol).

### 5.1.2 Rozsah

Tento dokument je špecificky zameraný na použitie zásad SLP pre *in vitro* štúdie realizované v rámci neklinických testov bezpečnosti látok obsiahnutých vo farmaceutických výrobkoch, pesticídoch, kozmetických výrobkoch, veterinárnych liekoch a liečivách, potravinových a krmovinových doplnkoch, priemyselných chemikáliách (*Pozn. SNAS – od prvého vydania tohto dokumentu aj v biocídoch, nanomateriáloch a zdravotníckych pomôckach*). 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/alebo 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 výrobky, pesticídy, potravinové a krmovinové doplnky, kozmetické výrobky, veterinárne lieky a podobné výrobky, a pre reguláciu priemyselných chemikálií. (*Pozn. SNAS – od prvého vydania tohto dokumentu aj pre biocídy, nanomateriály a zdravotnícke pomôcky*)

### 5.1.3 Definícia pojmov špecifických pre in-vitro štúdie

**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“ (*pozn. SNAS: 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 skôr na kontrolu správnej 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“.

(nosič)“ . 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, v ktorých je riziko potenciálnej mikrobiálnej a vírusovej kontaminácie minimalizované.

**Bunkové línie** - bunky, ktoré prešli genetickou zmenou, zabezpečujúcou ich prežitie, v dôsledku čoho sú schopné viacnásobne sa množiť *in vitro*, môžu byť namnožené a potom uchované zmrazením ako uskladnené vzorky v bunkovej banke. Kontinuálne množená bunková línia je vo všeobecnosti omnoho homogénnejšia a stabilnejšia a preto reprodukovateľnejšia ako heterogénna populácia primárnych buniek.

**Kontrola, negatívna** - oddelená časť testovacieho systému, do ktorej je zámerne aplikovaná látka, o ktorej je známe, že by testovací systém na ňu nemal reagovať; negatívna kontrola poskytuje dôkaz, že testovací systém na túto látku nereaguje za skutočných podmienok testu.

**Kontrola, pozitívna** - oddelená časť 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 reaguje za skutočných podmienok testu.

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

**Kontrola, pomocná látka, nosič** - oddelená časť testovacieho systému, ku ktorej sa pridáva nosič (pomocná látka používaná na rozpustenie testovanej látky); kontrola 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.  
(Pozn. SNAS – u rastlín tkanivá)

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

**High through-put skrining** - vysokovýkonný screening: Použitie miniaturizovanej technológie založenej na robotike na screening veľkých knižníc zlúčenín proti

izolovanému cieľovému génu, proteínu, bunke, tkanivu atď., aby sa vybrali zlúčeniny na základe špecifických aktivít vhodných 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 porovnávanie 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 diferenciácie, 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 vystavených pôsobeniu týchto toxikantov. 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 úrovní expresie 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 expresie 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.

## 5.2 ZODPOVEDNOSTI

### 5.2.1 Vedenie testovacieho pracoviska

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. Napríklad sa musí 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 "Súlada 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.

### 5.2.2 Vedúci štúdie

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* štúdií 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 (vid' 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, keď bola odskúšaná s príslušnou referenčnou látkou.

Preukázať vlastnosti *in vitro* systémov môže byť tiež náročné. Hoci 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 vhodnými referenčnými látkami, vrátane použitia pozitívnych, negatívnych, neošetrených kontrol a/alebo nosiča, pokiaľ je to potrebné. 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. preverení (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 byť minimálne schopný posúdiť vhodnosť systému pre zabezpečenie kvality, ktorý používa výrobca a mať k dispozícii všetku dokumentáciu potrebnú na hodnotenie spôsobilosti testovacieho systému, napr. výsledky testov výkonnosti.

### 5.2.3 Pracovníci podieľajúci sa na štúdií

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, ktoré zabránia krížovej kontaminácii medzi testovacími systémami a zaručia integritu štúdie. Zamestnanci podieľajúci sa na štúdií musia byť informovaní a presne dodržiavať požiadavky na izoláciu testovacích systémov a štúdií, vrátane biologicky nebezpečných materiálov. Pri testovaní nebezpečných chemikálií v *in vitro* štúdiách musí byť uplatnená primeraná opatrnosť minimalizujúca riziká vyplývajúce z ich použitia.

## 5.3 ZABEZPEČENIE KVALITY

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 útvorom 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 byť zamerané na postupy a opatrenia pre:

- monitorovanie šarží zložiek kultivačných médií pre bunkové a pletivové kultúry, ktoré sú kritické z hľadiska výkonnosti testovacieho systému (napr. plodové tel'acie sérum, atď.) a ďalších materiálov s ohľadom na ich vplyv na výkonnosť testovacieho systému;
- posúdenie a zabezpečenie funkčnosti a/alebo 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 mraziacich zariadeniach;
- zabezpečenie sterility materiálov a dodávok používaných na bunkové a pletivové kultúry;
- udržiavanie primeraného vzájomného oddelenia rozdielnych štúdií a testovacích systémov.

## 5.4 TESTOVACIE PRACOVISKO

### 5.4.1 Všeobecne

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.

### 5.4.2 Priestory pre testovacie systémy

Zásady SLP vyžadujú, aby bol k dispozícii dostatočný počet miestností alebo priestorov na zabezpečenie izolácie testovacieho systému a aby tieto priestory boli zabezpečené tak, 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, tak ako 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.

### **5.4.3 Priestory pre zaobchádzanie s testovanými a referenčnými látkami**

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 nosičmi – rozpúšťadlami umožňovali prácu v aseptických podmienkach a takto chránili testovací systém a štúdiu minimalizovaním možnosti ich kontaminácie pri príprave testovaných a referenčných látok.

### **5.5 PRÍSTROJE, MATERIÁL, ČINIDLÁ**

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, kde je to požadované. Pre špeciálne zariadenia treba stanoviť kritické parametre, ktoré je potrebné nepretržite sledovať, resp. nastaviť hraničné hodnoty spolu s inštaláciou alarmov.

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

## 5.6 TESTOVACIE SYSTÉMY

*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.

### 5.6.1 Podmienky pre testovacie systémy

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 aj o podmienkach prostredia (napr. o hladine kvapalného dusíka v kryogénnom zásobníku, teplote, vlhkosti a koncentrácii CO<sub>2</sub> 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). Keďže 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.

### 5.6.2 Novoprijímané testovacie systémy

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) a odozva testovacieho systému. Výsledky takéhoto hodnotenia musia byť tiež doložené a uchovávané v záznamoch o štúdiu. Pokiaľ nie je možné vykonať takéto testy, napríklad 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 s testovacím systémom, 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.

### 5.6.3 Záznamy o testovacích systémoch

Zásady SLP vyžadujú, aby sa uchovávali záznamy o zdroji, dátume dodávky a stave testovacích systémov pri dodaní; pre bunky a tkanivá by tieto záznamy majú 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 uchovávať, sú okrem iných aj 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.), chronológia udržiavania, počet pasáží bunkových línií, kultivačné podmienky a subkultivačné intervaly, podmienky zmrazenia/rozmrazenia atď. Pre transgénne testovacie systémy je navyše potrebné určiť povahu transgénu (aký typ génu bol vložený) a sledovať udržiavanie jeho expresie použitím vhodných kontrol.

Zvláštnu pozornosť je potrebné venovať správne 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 reagenty z hľadiska ich označovania a expiračných dôb platia rovnako i pre testovacie súpravy používané ako *in vitro* testovacie systémy. Testovacie súpravy, či už použité ako testovacie systémy alebo na iný účel, 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 nosiča 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 testovacích systémoch a rovnako všetky záznamy z jednotlivých štúdií musia mať oficiálne uznané označenie daného testovacieho systému.

### 5.7 TESTOVANÉ A REFERENČNÉ LÁTKY (VRÁTANE POZITÍVNYCH A NEGATÍVNYCH KONTROLNÝCH LÁTOK)

Vo všeobecnosti nie sú stanovené žiadne 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 však vyžadované aseptické podmienky, aby sa zabezpečila ochrana testovacích systémov pred mikrobiálnou kontamináciou.

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

Exspiračná 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 nosiče sa nelíši od historických kontrolných údajov zaznamenaných na testovacom pracovisku a tieto údaje sú navyše porovnateľné s publikovanými referenčnými hodnotami.

## **5.8 ŠTANDARDNÉ PRACOVNÉ POSTUPY**

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 majú 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:

### **5.8.1 Priestory**

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.

### **5.8.2 Prístroje**

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 CO<sub>2</sub> v inkubátoroch.

### **5.8.3 Materiály, chemikálie a roztoky**

Hodnotenie vhodnosti, možnosti predĺženia exspiračnej doby, hodnotenie a udržiavanie sterility, skríning bežných patogénnych kontaminantov; opis postupov pre výber a použitie nosičov; overenie postupov pre kompatibilitu nosičov s testovacím systémom.

### **5.8.4 Testovacie systémy**

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.

### **5.8.5 Realizácia štúdie**

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

### 5.8.6 Zabezpečenie kvality

Definovanie kritických fáz, frekvencia inšpekcií.

### 5.9 REALIZÁCIA ŠTÚDIE

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 (*Pozn. SNAS: Nariadenie 320/2010 Z. z. v aktuálnom znení*) s OECD dokumentom „Aplikácia Zásad SLP na krátkodobé štúdie“ (MSA G-07).

### 5.10 SPRÁVA O VÝSLEDKOVÝCH ŠTÚDIE

Existuje množstvo problémov špecifických pre *in vitro* testovanie, ktoré by mali byť riešené v pláne štúdie ako aj v záverečnej správe zo štúdie. Tieto problémy sú predovšetkým vedeckej alebo technickej povahy, ako napr. (vedecká) požiadavka, aby všetky interné kontroly (príslušné pozitívne, negatívne a neošetrené kontroly a/alebo kontroly nosiča) vykonávané za účelom kontroly bias (systémovej chyby, odchýlky) a hodnotenia výkonnosti testovacieho systému boli vykonané súčasne s testovanou látkou vo všetkých *in vitro* štúdiách. Konkrétnejšie usmernenie o oblastiach, ktoré musia byť uvedené v pláne štúdie a v záverečnej správe, možno nájsť v príslušných testovacích metódach OECD alebo v iných vhodných zdrojoch (*Pozn. SNAS: Napr. Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 z 30. mája 2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) v platnom znení*).

### 5.11 UCHOVÁVANIE ZÁZNAMOV A MATERIÁLOV

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, transgénnne 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 balíka štúdií bezpečnosti.

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

\*\*\*