Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Partyzánské náměstí 2633/7
Moravská Ostrava, 702 00 Ostrava

[redacted]

Váš dopis zn.
Ze dne:
Číslo jednací: ZU/05756/2021
Číslo spisu: S-ZU/35186/2020
Spisový znak: 0.2.6

Vyřizuje.: JUDr. Šárka Bendová
Tel.:
Mobil:
Fax:
E-mail:

[redacted]

Datum: 16.3.2021

Věc : Poskytnutí informace podle § 14 odst. 5 písm. d) zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě obdržel dne 2.3. 2020 Rozhodnutí Ministerstva zdravotnictví ze dne 10.2.2021 č.j. MZDR 3028/2021-/PRO, kterým nadřízený orgán rozhodl o Vaší stížnosti ze dne 6.1.2021 takto:

Zdravotnímu ústavu se sídlem v Ostravě se dle § 16a odst.6 písm. b) informačního zákona přikazuje, aby ve lhůtě 15 dnů ode dne doručení tohoto rozhodnutí vyřídil žádost stěžovatelky ze dne 12.12. 2020 v bodě 4), 8), 9 a 10)

Na základě a v souladu se shora uvedeným rozhodnutím MZ vám poskytujeme k jednotlivým bodům níže uvedené informace:

4) detailní postup kultivační metody - viability viru

Pro kultivaci viru SARS-CoV-2 se používají buněčné kultury CV-1 (buňky ledvin kočkodana zeleného) v monolayeru (jednovrstevný buněčný povlak) v kultivačních zkumavkách typu Leighton. Po odsátí udržovacího média se do zkumavky napipetuje 300 µl vyšetřovaného vzorku, kterým je výtěr z nosohltanu ve virologickém odběrovém médiu, který byl použit na vyšetření metodou RT-PCR SARS-CoV-2. Vzorky jsou očkovány nejpozději do 24 hodin po odběru nebo jsou až do naočkování uloženy při -80°C a rozmraženy až bezprostředně před naočkováním. Zkumavky uložíme do stojánků v šikmé poloze do termostatu při 37°C na dobu 30 minut.

Paralelně se vzorky kultivujeme buňky i v kontrolních zkumavkách, do nichž je místo vzorku aplikováno 300 µl udržovacího média (E-MEM, Sigma-Aldrich). Poté do všech zkumavek, včetně kontrolních, napipetujeme 1,7 ml udržovacího média. Inkubujeme v termostatu při 37□C. Denně prohlížíme zkumavkové kultury v inverzním mikroskopu při 100 až 200 násobném zvětšení, přičemž hodnotíme morfologické změny buněk – rozvoj cytopatického efektu (CPE) vznikající v důsledku infekce buněk virem přítomným ve vzorku. Zároveň kontrolujeme i kontrolní zkumavky. Jakmile je cytopatického efektu dosaženo přibližně v 75 % buněk ve zkumavce, provedeme druhou pasáž. Po 7 dnech provedeme 2. pasáž i u těch vzorků, ve kterých není patrný cytopatický efekt, a pokračujeme v kultivaci dalších 7 dní. Pokud ani po dalších 7 dnech nedojde k cytopatickému efektu, ukončíme izolační pokus jako negativní. Ve zkumavkách s pozitivním cytopatickým efektem ověřujeme přítomnost SARS-CoV-2 metodou RT-PCR.

8) na základě jakých vědeckých poznatků publikovaných v odborné literatuře je možné vědecky interpretovat výsledky genetických testů (RT PCR, RT PCR v reálném čase) tak, že detekce přítomnosti části genomu (v rozsahu jednotek procent z celkového řetězce) je vyhodnocena jako důkaz přítomnosti celého neporušeného genetického řetězce, jako je tomu u genetických testů na přítomnost SARS-CoV-2?

Smyslem PCR testování je prokázat, že došlo k infekci virem SARS-CoV-2 u testovaného pacienta. K tomu není vždy nezbytné, aby v daném okamžiku a vzorku byl zachován celý genetický řetězec původce. Tento přístup pro průkaz infekčních onemocnění, včetně jeho ověření a validace, je popsán v celé řadě veřejně dostupných publikaci a je standardizován v mikrobiologické diagnostice v řadě aplikací již desetiletí.
Vycházet je možno např. z níže uvedených publikací a souvisejících citacích.

1.Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990;322:178-83.
2. Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. J Infect Dis 1993;168:1-8.
3.Fredericks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. Clin Infect Dis 1999;29:475-88.
4: Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. CMAJ. 2000 Aug 8;163(3):301-9. doi: 10.1016/s1381-1169(00)00220-x. PMID: 10951731; PMCID: PMC80298.

5: Wattré P. La biologie moléculaire au service de la virologie médicale quotidienne. 1. Principes méthodologiques [Molecular biology at the service of the daily medical virology. 1. Methodological principles]. Ann Biol Clin
(Paris). 1997 Jan-Feb;55(1):25-31. French. PMID: 9099248.

9) na základě jaké přesné citace vědecké publikace/vědeckých publikací, která/é vědeckým, tzn. ověřitelným a opakovatelným způsobem dokládá/dokládají to, že virus SARS-CoV-2 byl řádně izolován. Tzn., že virové částice byly vyčištěny a izolovány pomocí centrifugace s hustotním gradientem, bílkoviny byly biochemicky analyzovány. Důkaz, že k takové izolaci došlo, byl doložen fotografií z koncentrovaných izolovaných částic. Z takto izolovaných částic byla vyextrahována molekula RNA, gelovou elektroforézou změřena její velikost a sekvenováním standardně dlouhých sekvencí sestaven její řetězec. ***Tuto informaci požadujeme proto, abychom si mohli být jisti, že pracujete se skutečným virem SARS-CoV-2, nikoliv pouze s jeho hypotetickým modelem. Určitě je jednoduché takto důležitou základní informaci, kterou máte sami ověřenou, doložit.***

Izolace viru SARS-CoV-2 z klinického materiálu pacientů včetně jeho identifikace molekulárně genetickýcmi a elektronmikroskopickými metodami je dokumentována v níže citovaných publikacích č. 1, 2 a 3. Autoři k izolaci viru SARS-CoV-2 použili a popsali metodu, která se běžně používá ve virologických laboratořích k izolaci virů. Izolace virů je takto definována i v odborné virologické literatuře (odkazy 4 – kapitola 3.III, Izolace virů na buněčných kulturách, str. 80-81, odkaz 5 – kapitola 3, Primary Isolation of Viruses, str. 36-51). Není nám známo, zda autoři těchto publikací použili i postupy popsané žadatelkou.

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
2. Harcourt J, Tamin A, Lu X, et al. Isolation and characterization of SARS-CoV-2 from the first US COVID-19 patient. Preprint. bioRxiv. 2020;2020.03.02.972935. Published 2020 Mar 7. doi:10.1101/2020.03.02.972935
3. Park WB, Kwon NJ, Choi SJ, et al. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea. J Korean Med Sci. 2020;35(7):e84. Published 2020 Feb 24. doi:10.3346/jkms.2020.35.e84
4. LENNETTE, Edwin H. a Nathalie J. SCHMIDT. Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz. Praha: Avicenum, 1974. ISSN 0024-1113.
5. SPECTER, Steven. Clinical virology manual. 4th ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2009. ISBN 978-1-55581-462-5.

10) na základě jaké přesné citace vědecké publikace/vědeckých publikací, která/é vědeckým, tzn. ověřitelným a opakovatelným způsobem dokládá/dokládají to, že takto doložený virus SARS-CoV-2 splňuje Kochovy / Riversovy postuláty průkaznosti jeho příčinné souvislosti k onemocnění COVID-19 a je tedy oprávněno považovat jej za původce tohoto onemocnění. ***Tuto informaci požadujeme proto, abychom si mohli být jisti, že vynaložené úsilí a finance na vaši studii testů, se opravdu vztahuje k onemocnění COVID-19. Určitě je jednoduché takto důležitou základní informaci, kterou máte sami ověřenou, doložit"***

Tuto skutečnost dokládá níže citovaná publikace č. 6, která vyšla v časopise Nature. Její autoři uvádějí, že svými experimety potvrdili platnost Kochových postulátů a společně s předchozími klinickými studiemi i příčinnou souvislost SARS-CoV-2 s nemoci Covid 19.

"Our results demonstrate the pathogenicity of SARS-CoV-2 in mice, which—together with previous clinical studies1—completely satisfies Koch's postulates7 and confirms that SARS-CoV-2 is the pathogen responsible for COVID-19."

6. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, Wei Q, Yu P, Xu Y, Qi F, Qu Y, Li F, Lv Q, Wang W, Xue J, Gong S, Liu M, Wang G, Wang S, Song Z, Zhao L, Liu P, Zhao L, Ye F, Wang H, Zhou W, Zhu N, Zhen W, Yu H, Zhang X, Guo L, Chen L, Wang C, Wang Y, Wang X, Xiao Y, Sun Q, Liu H, Zhu F, Ma C, Yan L, Yang M, Han J, Xu W, Tan W, Peng X, Jin Q, Wu G, Qin C. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature. 2020 Jul;583(7818):830-833. doi: 10.1038/s41586-020-2312-y. Epub 2020 May 7. PMID: 32380511.

K Vaší níže uvedené námitce poskytujeme následující informace:

Požadujeme přesný popis, jakým povinný subjekt provádí PCR testy a interpretuje jejich výsledky, protože z odpovědi je možné dedukovat, že nepostupuje dle závazných instrukcí uvedených výrobcem.
Povinný subjekt musí uvést:
i) jak dlouhé úseky (přesný počet bp) RNA přepsané na DNA jsou pomocí testovací aparatury detekovány a množeny a vyčíslit jejich procentuální poměr k celkové délce genomu testovaného patogenu

Výrobce soupravy COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit v instrukcích pro uživatele tyto informace neuvádí. Souprava má CE certifikaci k použití jako in vitro diagnostika a její výkonnostní charakteristika je dána parametry senzitivity a specificity. Délka detekovaného úseku a jeho procentuální podíl z celkové délky genomu není parametrem, který by rozhodoval o spolehlivosti soupravy pro průkaz přítomnosti RNA SARS-CoV-2 v odebraných vzorcích.

ii) způsob, jakým interpretuje výsledky testu PCR (COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit výrobce Diana Biotechnologies)

Výsledky testů interpretujeme v souladu s pokyny výrobce popsaných v kapitole 3.8 uživatelské příručky na základě tzv. prahového cyklu amplifikace. Stručně jsou kritéria interpretace uvedena v následující tabulce:

FAM	HEX	Cy5	Interpretace
+ [3]	+ [3]	+ [1] / - [2]	**COVID-19 pozitivní**
-	-	+ [1]	**Nedetekovatelné (COVID-19 negativní)**
-	-	-	**Nespolehlivý výsledek:** nízký výtěžek izolace RNA nebo inhibice RT-PCR, **doporučeno zopakovat izolaci RNA.**
$C_t > 30$ [3]	-	+ [1]	**Slabě COVID-19 pozitivní** [4,5]
-	$C_t > 30$ [3]	+ [1]	
$C_t > 30$ [3]	-	-	**Slabě COVID-19 pozitivní:** nízký výtěžek izolace RNA nebo inhibice RT-PCR [6]
-	$C_t > 30$ [3]	-	
$C_t < 30$ [3]	-	+ [1] / - [2]	**Nespolehlivý výsledek:** může ukazovat kontaminaci produktem amplifikace nebo mutaci v jednom z genů, doporučeno zopakovat izolaci RNA, doporučeno zopakovat analýzu s RT-PCR soupravou, která detekuje jiné geny
-	$C_t < 30$ [3]	+ [1] / - [2]	

iii) zda ověřil délku namnožených sekvencí pomocí PCR aparatury po provedení testu na COVID-19, zda namnožené sekvence délkou odpovídají cílovým sekvencím uváděných výrobcem a s jakým výsledkem.

Výrobce neuvádí nutnost ověřování namnožených sekvencí měřením jejich délky. Amplifikace správného úseku je u metodiky real-time PCR konfirmována fluorescenčním signálem sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy přítomné v reakci. Tento postup je spolehlivější než ověřování měřením délky, neb stejnou délku mohou mít také dva zcela různé úseky DNA. Sekvence shodující se se sekvencí použitých primerů, včetně potvrzení shody se sekvencí příslušné fluorescenční sondy, a to na dvou různých genech viru SARS-CoV-2, spolehlivě prokazují, že

prokázaný úsek RNA přepsané do DNA odpovídá přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 v souladu s parametry specificity uvedenými výrobcem.

Postupujeme tedy výhradně dle pokynů uvedených v soupravě COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit výrobce Diana Biotechnologies, a to jak v otázce laboratorního postupu, tak interpretace výsledku. Pokyny výrobce pro použití těchto testů v laboratoři jsou veřejně dostupné, lze je najít na tomto odkazu https://www.dianabiotech.com/downloads/.

S pozdravem

Ing. Eduard Ježo

Digitálně podepsal Ing. Eduard Ježo
Datum: 2021.03.16 20:53:07 +01'00'

Ing. Eduard Ježo
ředitel ZÚ se sídlem v Ostravě

Rozdělovník
1x adresát
1x ZÚ

Datovou schránkou