

VÁŠ DOPIS ZN.:

ZE DNE: 04. 11. 2022

NAŠE ZN.: SZU/14975/2022

VYŘIZUJE:

TEL./FAX.:

E-MAIL:

DATUM: 14. 11. 2022

Poskytnutí informací a o částečném odložení žádosti dle zák. č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů

Vážení,

Státní zdravotní ústav (dále jen „SZÚ“) obdržel dne 4. listopadu 2022 Vaši žádost podle zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „InfZ“), ve které žádáte o následující informace, ke kterým zasíláme níže uvedené odpovědi:

- 1. Jakou diagnostickou sadu pro detekci SARS-CoV-2 ústav používá? Pokud používá více různých sad, prosím uveďte jaké, a žádosti o odpověď pod číslem 2-5 specifikujte ke každé soupravě zvlášť.**

CE-IVD PCR souprava Allplex SARS-Cov-2.

- 2. Plní tato sada technické požadavky pro prostředky používané k in vitro diagnostice podle nařízení vlády č. 56/2015 Sb. (popř. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES) a pokud ano, jaké jsou hodnoty jejich funkčních parametrů dle bodu 4.**

Přílohy 1 – Základní požadavky:

- citlivost k příslušnému rozboru
- citlivost pro diagnózu
- analytická specifita
- diagnostická vhodnost
- přesnost
- opakovatelnost
- reprodukovatelnost?

Výše uvedené nespadá do působnosti SZÚ. SZÚ dle § 2 odst. 1 InfZ je jako povinný subjekt povinen poskytovat informace vztahující se k jeho působnosti, která je uvedena v § 86 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, ve znění pozdějších předpisů, a ve statutu SZÚ.

S ohledem na výše uvedené se v souladu s § 14 odst. 5 písm. c) InfZ Vaše žádost **odkládá.**

Nad rámec shora uvedeného si Vás dovoluujeme odkázat na výrobce uvedené diagnostické sady.

- 3. Jaký je limit detekce této sady a jaká je mezní hranice Ct, kterou udává výrobce, do kdy je výsledek testu pozitivní a od kdy je výsledek negativní? Jak tuto hranici výrobce testu validoval z hlediska analytické a diagnostické specifity a senzitivity?**

Výše uvedené nespadá do působnosti SZÚ. SZÚ dle § 2 odst. 1 InfZ je jako povinný subjekt povinen poskytovat informace vztahující se k jeho působnosti, která je uvedena v § 86 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, ve znění pozdějších předpisů, a ve statutu SZÚ.

S ohledem na výše uvedené se v souladu s § 14 odst. 5 písm. c) InfZ Vaše žádost **odkládá**.

Nad rámec shora uvedeného si Vás dovoluujeme odkázat na výrobce uvedené diagnostické sady.

4. **Žádáme o poskytnutí kompletního verifikačního protokolu této diagnostické sady podle ČSN ISO 15189, jak Vaše laboratoř objektivně ověřila výkonnostní charakteristiky tohoto testu před uvedením do testovací praxe.**

Jedná se o CE-IVD diagnostikum, Národní referenční laboratoř (dále jen „NRL“) verifikuje funkčnost diagnostika s každým použitím (splnění kritérií validity metody).

5. **Jaké přístrojové vybavení laboratoř používá pro izolaci RNA, pipetování a provedení RT-PCR a prosíme o doložení prohlášení o shodě výrobců jednotlivých přístrojů a zařízení, že toto Vámi používané vybavení plní technické požadavky nařízení vlády č. 56/2015 Sb. (popř. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES).**

Pro izolaci RNA laboratoř používá Zybio (EU declaration of conformity) a Kingfisher (Certificate of conformance), pro pipetování automatické pipety eppendorf, bioht a provedení RT-PCR CFX 98.

6. **Organizoval/je ústav externí hodnocení kvality testování detekce viru SARS-CoV-2?**

Ano.

7. **Pokud ano, jakým způsobem jsou vzorky pro kontrolované laboratoře připravovány a jak ověřujete správnost výsledků RT-PCR diagnostiky pro jednotlivé vzorky?**

SARS-CoV-2 se známou sekvencí (WGS) izolované na permisivních buněčných kulturách VERO E6 /VERO E6 TMRSS 2, vhodně nařaděné a ověřené pomocí PCR, Správnost Ct hodnot ověřujeme sadou standardů o známé koncentraci.

V souvislosti s postupy používanými k celogenomovému sekvenování viru SARS-CoV-2:

8. **Uveďte, zda sekvenaci genomu SARS-CoV-2 provádíte ve své laboratoři a kdo je její odborný garant?**

Ano, provádíme. Odborným pracovníkem je RNDr. Helena Jiřincová, kategorie odborný garant není pro WGS zřízena.

9. **Pokud ano, prosíme o doložení přesného laboratorního postupu, jakým při celogenomové sekvenaci laboratoř postupuje, zda se jedná o validovaný postup (nebo metodu) určitého výrobce nebo zda se jedná o in house postup/metodu Vaší laboratoře?**

Izolace RNA, příprava cDNA, příprava amplikonové sekvenační knihovny, sekvenace na přístrojích Illumina MiSeq, Genexus, nebo na chipu Oxford Nanopore MinIon.

Pro sekvenaci vybíráme pozitivní izoláty SARS-CoV-2 s t menší než 32.

Pro přípravu knihovny PRO Illumina miSeq používáme: Komerční soupravu validovanou výrobcem Paragpn, Genomics CleanPlex SARS-CoV-2 nebo protokol Artic v3: NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 FS Library Prep.

Pro přípravu knihovny pro sekvenaci na MinIon, vycházíme z protokolu Artic V3.

Sekvenátor Genexus využíváme jako uzavřený systém.

Ve všech případech kontrolujeme kvalitu sekvencí:

Sledujeme parametry: the base quality, the nucleotide distribution, GC content distribution and the duplication rate.

Zásadní je: average or median depth and the percentage of the genome covered by the sequencing.

Dalšími parametry: Alignment to reference sequence, Variant calling.

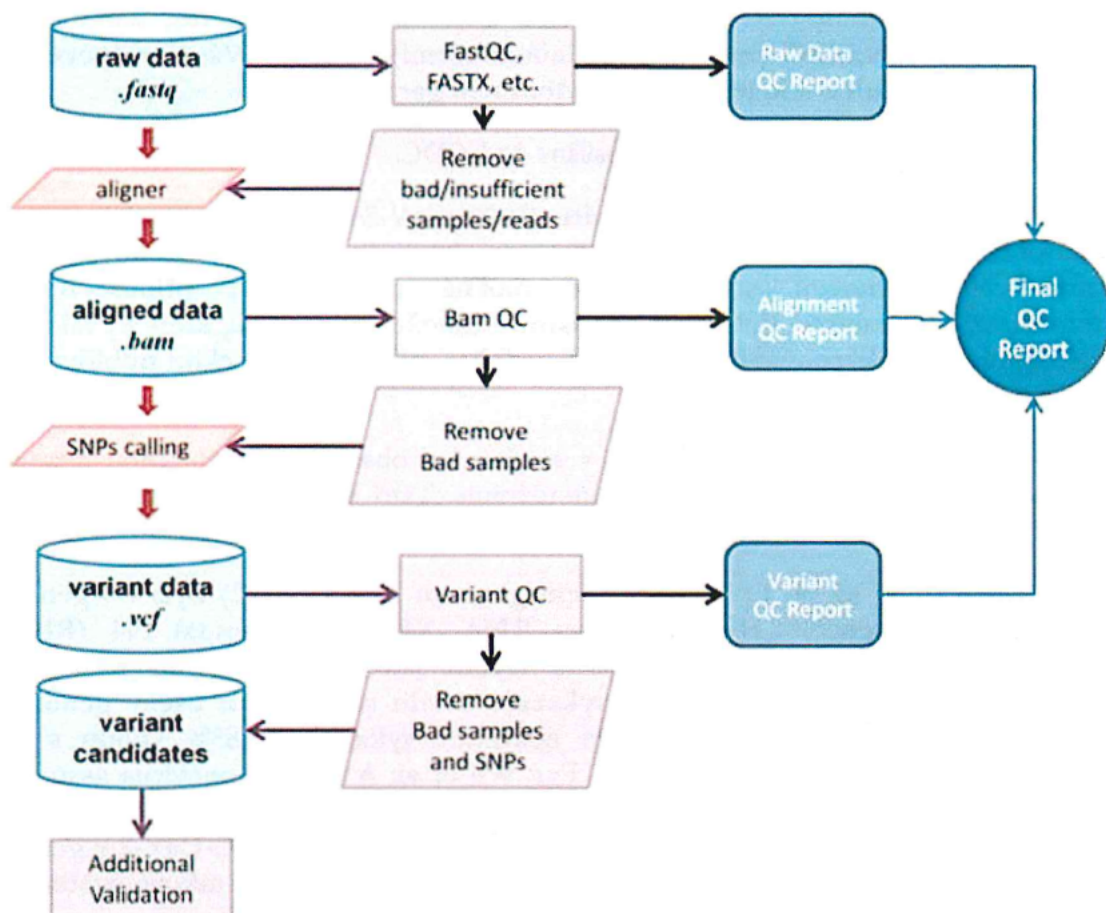
Využíváme automatické procesy:

Illumina – Paragon:Bioxsys: reference based bioinformatic analysis

Illumina NEB protocol: bioinformatical pipeline of FoS CU-BIOCEV (HERA ECDC)

Oxford Nanopore Min Ion: bioinformatical pipeline adaptovanou dle doporučení ARTIc NETWORK Group.

Celý proces získání relevantních sekvenčních dat je uveden na obrázku.



Před zveřejněním v mezinárodní databázi GISAID kontrolujeme sekvence dle aktuálních požadavků uvedených zde: Kontrolu kvality provádíme dle doporučení uveřejněných zde: Aksamentov, I., Roemer, C., Hodcroft, E. B., & Neher, R. A., (2021). Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal of Open Source Software*, 6(67), 3773, 3

Celý proces je prováděn v souladu s mezinárodními doporučeními (Rosenthal, S.H., Gerasimova, A., Ruiz-Vega, R. et al. Development and validation of a high throughput SARS-CoV-2 whole genome sequencing workflow in a clinical laboratory. *Sci Rep* 12, 2054 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06091-0>)

10. Jak proběhla validace tohoto postupu? Prosíme o doložení postupů a výsledků validačního procesu.

Proces je adaptován dle aktuálních mezinárodních doporučení.

11. Jak proběhla verifikace způsobem, který odpovídá ČSN ISO 15189? Žádáme o doložení verifikačního protokolu.

Jedná se o neakreditovanou metodu. Výsledky verifikujeme dle postupu a parametrů uvedených v bodu 9. Některé sekvence ověřujeme paralelní sekvenací v ECDC.

12. Žádáme o poskytnutí informace o veškerém vybavení, které je k celogenomovému sekvenování používáno včetně softwarového vybavení a doložení jeho shody s technickými požadavky nařízení vlády č. 56/2015 Sb. (popř. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES).

Illumina MiSeq, ThermoFisher Ion Torrent Genexus. Shodu s technickými požadavky dokládáme v Příloze č. 1 – prohlášení o shodě.

13. Pokud SZÚ celogenomovou sekvenací viru SARS-CoV-2 neprovádí, ale nechává si ji zpracovat jinou laboratoří (resp. jinými laboratořemi), žádáme Vás o odpověď, která/é laboratoř/e to provádí a kdo je jejím/ich odborným garantem.

NRL WGS provádí, některé vzorky jsou posílány do ECDC.

14. Provedli jste izolaci celého genomu viru SARS-CoV-2 a jeho změření pomocí gelové elektroforézy nebo pomocí jiné přímé metody, která by doložila, že kompletní genom získaný celogenomovou sekvenací je možné detekovat i přímo bez použití bioinformatických metod? Pokud ano, žádáme o doložení materiálu, který by takové ověření celogenomového sekvenování prokázal, případně o odkaz na vědeckou publikaci, která by takový postup doložila.

Ne. Celý genom pravidelně izolujeme, ale v současnosti obsolentní a nepřesnou metodu měření délky pomocí horizontální elektroforézy nepoužíváme. Tato metoda je vhodná pro krátké úseky DNA/případně RNA, nikoli pro celý genom viru.

15. Dne 4.7. 2020 (tedy až po prvním sestavení genomu SARS-CoV-2) byla do genové banky přidána nová sekvence: „Homo sapiens RNA, 45S pre-ribosomal N4 (RNA45SN4), ribosomal RNA“ (GenBank: NR_146117.1). Ověřili jste, zda tato lidská RNA, která byla dodatečně do GenBanky zařazena, nevykazuje shodu s některými úseky genomu SARS-CoV-2? Dle našeho ověření právě tato sekvence vykazuje 98,85% shodu s kontigem identifikovaným jako k141_27232 v práci Fan Wu et al: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. In: Nature 580.7803 (2020). DOI: 10.1038/s41586-020-2202-3, která stojí za prvními 3 kompletními sekvencemi genu SARS-CoV-2 v genové bance z ledna 2020: MN908947.1, MN908947.2 a MN908947.3. Pokud jste takové ověření provedli, žádáme Vás o písemné doložení tohoto prověření.

Sekvence uveřejněná pod přístupovým kódem GenBank: NR_146117 (Homo sapiens RNA, 45S pre-ribosomal N4 (RNA45SN4), ribosomal RNA“) odpovídá (GenBank: NR_146117.1) odpovídá DNA úseku 28S ribosomal N4 (RNA28SN4) na chromosomu 22. Kratší úseky této sekvence vykazují i částečnou shodu s dalšími sekvencemi některých hominidů, např. Pan troglodytes.

Shodu u velmi krátkých úseků lze najít napříč širokým taxonomickým spektrem, po náhodném výběru 18 nukleotidů ze sekvence Homo sapiens RNA, 45S pre-ribosomal N4 (RNA45SN4), ribosomal RNA“ uveřejněné pod přístupovým kódem GenBank: NR_146117.1, získáme částečnou shodu u mnoha taxonomicky velmi odlišných druhů, od Homo sapiens až po 100 % shodu s

Ochotona curzoniae MAPK activated protein kinase 2 (MAPKAPK2), v sekvenci uveřejněné pod přístupovým kódem XM_040985571.

S pozdravem

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV
 Šrobárova 48
100 42 Praha 10
IČ 75010330, tel.: +4202