



Váš dopis ZN.:

Ze dne: 18. 09. 2023

Naše ZN: SZU/11941/2023



Datum: 12. 10. 2023

Věc: Poskytnutí informací dle zák. č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů

Vážení,

Státní zdravotní ústav (dále jen „SZÚ“) obdržel Vaši žádost podle zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů.

K Vaší žádosti zasíláme následující odpovědi.

Znění žádosti:

„Vážený zaměstnanec SZÚ, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR v souladu se zákonem č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím (právo občanů na přístup k informacím podle čl. 17 a 35 Listiny základních lidských práv a svobod). Formálně žádám o následující informace. Byl bych Vám vděčný, kdybyste mi poskytli publikace nebo vědecké studie, které popisují proces přímé purifikace následujících virových virů ze vzorku pacienta:

- spalničky,
- zarděnky,
- chřipka,
- opar,
- SARS-CoV-2.

Účelem mé žádosti je získat podrobnější informace o metodách a přístupech používaných ve vědeckém výzkumu k účinnému boji s viry a pandemiemi.

Přesný popis požadovaných dokumentů:

Všechny studie a/nebo zprávy odkudkoli na světě popisující čištění (např. filtrací, ultracentrifugací a chromatografií) virů uvedených výše, včetně jakýchkoli jejich kmenů.

Přímo ze vzorku odebraného od nemocné osoby, kde vzorek pacienta nebyl dříve kombinován s žádným jiným zdrojem genetického materiálu (například buňky opičí ledvin neboli buňky Vero; fetální bovinní sérum, kuřecí embryo atd.).“

Odpověď z NRL/ZSP:

Purifikace virů spalniček ani zarděnek přímo z klinických vzorků odebraných od nemocných osob se ve zdravotnických laboratořích, kterou je i naše, neprovádí a pokud je nám známo ani neprováděly. Literární

zdroje splňující zadané požadavky jsou těžko dohledatelné, snad lze zmínit pouze přímý průkaz viru v epitelálních buňkách pomocí imunofluorescenčního testu (1), tato metoda se s nástupem modernějších molekulárních metod přestala v současné diagnostice spalniček i zarděnek používat.

Reference:

1. Minnich LL, Goodenough F, Ray CG. Use of immunofluorescence to identify measles virus infections. J Clin Microbiol. 1991 Jun;29(6):1148-50. doi: 10.1128/jcm.29.6.1148-1150.1991. PMID: 1864932; PMCID: PMC269960.

Odpověď z NRL/HV

Není jasné, jaký opar máte na mysli, jestli způsobený HSV (na rtu nebo genitální) nebo způsobený VZV (pásový opar)?

Na HSV jsme nenašly nic, co by splňovalo zadané podmínky, u VZV jsme zatím našly jediný článek, kde použili vezikulární tekutinu od pacientů (1).

Purifikaci VZV se zabývá (2), použitím rekombinantního kmene se zabývá (3).

Reference:

1. J. Hyg., Camb. (1964), 62, 413-413. Cell-free varicella-zoster virus in tissue culture

By ANNE E. CAUNT AND D. TAYLOR-ROBINSON*

2. Improved Yields of Cell-Free Varicella-Zoster Virus NATHALIE J. SCHMIDT AND EDWIN H. LENNETTE*, INFECTION AND IMMUNITY Vol. 14, No. 3, Sept. 1976, p. 709-715,

3. Microfluidic electrical cell lysis for high-throughput and continuous production of cell-free varicella-zoster virus, Eun-Jae Won a,1, Duc Anh Thai b,1, Duong Duy Duong b,1, Nae Yoon Lee b,*, Yoon-Jae Song a,*, Journal of Biotechnology 335 (2021) 19–26"

Odpověď z NRL/CHNCH

Toto je úkol knihovnické rešeršní práce, která je placena, jedná se o veřejně dostupné informace, které nejsou předmětem naší odbornosti, ale odbornosti knihovnické, kromě toho, nemáme na SZÚ ani k dispozici veškerý publikovaný materiál, je třeba se obrátit na Národní lékařskou knihovnu a pečlivě zadat klíčová slova pro podrobnou rešerši. Samozřejmě mohu tento požadavek zadat naší knihovně službě, ale tato služba nebude zdarma. Není naší povinností znát veškeré uveřejněné práce na dané téma.

FBS se používá pro výživu buněk, další uvedené materiály jsou buněčné kultury nebo KE používané pro namnožení viru před jeho purifikací, přímo ze vzorku nemocné osoby se viry nikdy nečistily ani čistit a purifikovat nebudou, je to požadavek odpovídající průkazu ohně třením dřívěk, nebo používáním koněspřežky namísto letadla. Lze však doložit publikace, kdy je virus prokázán elektronovou mikroskopií u nemocných.

Znění žádosti:

„Vezměte prosím na vědomí, že nepožaduji studie/zprávy, kde se výzkumníkům nepodařilo virus odstranit, ale místo toho:

- něco kultivovali/pěstovali a/nebo provedli amplifikační test (např. PCR), - a/nebo vytvořili genom z milionů sekvencí nalezených v surovém materiálu, - a/nebo získali elektronově mikroskopické snímky surových objektů.“

Odpověď:

Ad SARS-CoV-2 : pouze v databázi GISAID je zveřejněno více než 16 miliónů WGS SARS-CoV-2, přičemž více než 75 % pochází z klinického materiálu, např. NRL pro chřipku publikovala 15 877 WGS SARS-CoV-2 a všechny tyto sekvence jsou získány přímo z klinického materiálu. U několika případů jsme doložili přítomnost viru i elektronmikroskopicky. Pro celkový přehled je opět třeba zadat rešerši v NLK.

V případě viru chřipky je v GISAID databázi publikováno 353 401 sekvencí viru humánní chřipky, přičemž se jedná o 1 652 141 sekvencí segmentů. V tomto případě lze odhadem usoudit, že přímo z klinických materiálů bude pocházet méně než 75 % sekvencí. Tuto informaci nelze jednoduše vyhledat, nicméně GISAID databáze je veřejně přístupná, a přístup do ní je schvalován administrátory GISAID. Po schválení si tuto informaci můžete zjistit sam/a, postačí k tomu cca několik dnů práce, tedy je nutno u každé sekvence zkontrolovat původ (klinický materiál či kultura viru na KE či buněčná kultura). Všechny sekvence zahrnují i izoláty ptačí či pocházející ze zoonotické říše, a takovýchto sekvencí je uveřejněno 458 418 tisíc viru, 2 mil sekvencí jsou dány segmentovaným genomem. Virus chřipky má segmentovaný genom, tedy o celogenomová sekvenace zahrnuje vždy sekvenaci jednotlivých segmentů.

Znění žádosti:

„Už vím, že podle virové teorie jsou buňky nezbytné pro replikaci viru. Proto nepožaduji záznamy popisující replikaci viru bez buněk. Nežádám také dokumenty popisující striktní provádění Kochových postulátů, dokumenty popisující virus plovoucí ve vzduchoprázdnu, ani soukromé informace o pacientovi.

Požaduji pouze záznamy, které popisují purifikaci (oddělení viru od všeho ostatního ve vzorku pacienta podle standardní laboratorní praxe pro purifikaci dalších velmi malých částic).

Vezměte prosím na vědomí, že moje žádost zahrnuje jakoukoli studii/zprávu, která splňuje výše uvedený popis a je autorem kdokoli a kdekoli.

Pokud některé publikace odpovídají výše uvedenému popisu požadovaných publikací a jsou v současné době ve veřejné doméně, poskytněte prosím dostatečné informace o každé publikaci, abych ji mohl s jistotou identifikovat a získat přístup ke každé z nich (tj. název, autor, datum, časopis, kde může veřejnost přistup). Pokud je to možné, uveďte adresy URL.

Děkuji za pozornost, kterou věnujete mé žádosti. Doufám ve spolupráci při poskytování potřebných informací.

Odpověď zašlete v papírové podobě na výše uvedenou adresu a kopii dokumentu také zašlete e-mailem.“

Odpověď:

SARS - CoV-2 stejně jako viry chřipky nikdy nebyl purifikován přímo z klinického materiálu pacienta.

Metody purifikace virů jsou různé, dle historické doby, ve které byly použity.

První virus, který byl i objeven, byl virus tabákové mozaiky, a byl objeven jako filtrabilní agens v extraktech z listů tabáku.

Vzhledem k technickým možnostem počátku 20. století, byly viry prokázány nepřímo, a to jako filtrabilní agens, které procházelo porcelánovými filtry, které byly používány pro odstranění bakterií z infekčního materiálu. Přenosy takto filtrované tekutiny bylo jednoznačně potvrzeno, že existují infekční částice,

kteří jsou mnohem menší než bakterie, které nerostou v živných půdách, ale lze jimi infikovat zvířata či lidi (náhodné laboratorní infekce).

V případě viru chřipky je historie poměrně bohatá, ale až do roku 1946, je založena pouze na nepřímých důkazech. Teprve v roce 1946 bylo možné pozorovat virus chřipky pod elektronovým mikroskopem.

Virus chřipky A byl objeven v roce 1933, virus chřipky B v roce 1939 a virus C v roce 1950.

Identifikace chřipkového viru jako příčiny sezónních epidemií a pandemií vedla k vývoji a testování vakcín proti chřipce. Ve 30. a 40. letech 20. století byly vakcíny používány nejprve u vojáků a v roce 1960 bylo doporučeno použití vakcíny i u ostatní populace, u které se předpokládalo vysoké riziko chřipkových komplikací. Jak vidno, vakcíny byly vyráběny i v letech, kdy ještě virus nebylo možné vidět a přímo jej prokázat.

Historie filtrabilních agens:

O základní povaze virů procházejících filtrem bylo známo jen málo. Tato kategorie se objevila až na přelomu století, kdy se stala populární mezi některými bakteriology jako způsob vysvětlení onemocnění, u nichž nebylo možné standardními bakteriologickými metodami zjistit příčiny (6). Filtrem procházející viry byly operativně definovány tím, že nebyly zadržovány standardními bakteriologickými filtry, nebylo možno je množit na umělých médiích ani nebyly viditelné dostupnými metodami světelné mikroskopie (7). Patogen byl charakterizován jako filtrovatelný, když klinický materiál prošel nejmenším dostupným filtrem a současně stále vyvolával onemocnění u hostitele.(8) nová kategorie zahrnovala řadu důležitých lidských a zvířecích chorob: slintavku a kulhavku, drůbeží neštovice, vzteklinu, mor prasat, spalničky a poliomyelitidu.(9)

První teorii chřipky v souvislosti s původcem jako filtrabilním agens navrhl v roce 1914 německý bakteriolog Wilhelm Kruse při studiích běžného nachlazení.(10) Britský zájem vzrostl v roce 1918 po bakteriologických selháních. Mezi říjnem a prosincem 1918 MRC pomáhalo S. L. Cumminsovi, organizovat studium filtrabilních agens v Abbeville ve Flandrech a Etaples ve Francii – tedy vojenských táborech postižených chřipkou – počátek pandemie 1918.(11) Tým Abbeville vedl major Howard Graeme Gibson.(12) S majorem F. B. Bowmanem a kapitánem J. I. Connor, Gibsonův tým navázal na práci dvou francouzských bakteriologů, Charlese Nicolleho a Charlese Lebaillyho, kteří na začátku roku 1918 tvrdili, že objevili filtrabilní agens zodpovědné za chřipku. Jako důkaz Nicolle a Lebailly uvedli, že přenesli nemoc na zdravý opice a muže sériovou inokulací filtrovaných bronchiálních sekretů z infikovaných případů.(13) Ve snaze zopakovat tyto experimenty se Gibsonův tým spoléhal na odborné znalosti a materiály MRC, včetně makaků a pavíánů dodaných z londýnské zoo.(14)

Během týdnů Gibson oznámil, že jeho tým izoloval filtrovatelné činidlo a vytvořil experimentální onemocnění.(15) V prosinci 1918 popsali, jak reprodukovali charakteristické plicní krvácení u opic, podobné tomu, které bylo pozorováno v klinických případech, a izolovali a kultivovali malá „kokoidní tělíska“ z tkáně. Protože látka prošla filtry a vytvořila „experimentální chřipkové“ léze, usoudili, že jde o „filtrovatelný virus“ a „se vši pravděpodobností původce chřipky“. (16) Gibson tragicky zemřel na chřipku, práce týmu zůstala nedokončená, ale ne dříve, než patologové v Etaples v čele s generálmajorem Johnem Rose Bradfordem a kapitánem Jamesem Wilsonem tvrdili, že izolovali podobná tělíska od nemocných v těchto vojenských táborech.(17)

Práce na filtrabilních agens pokračovala a vedla k objevu filtrabilních původců dalších nemocí. Tyto původce, viry, však stále nebylo možné přímo pozorováním, viděním, prokázat.

Byla zformulována hypotéza, že filtrovatelná činidla mohou být příčinou velmi důležitých infekčních onemocnění, pro které nebylo možné nalézt bakteriální původce. V roce 1912 bylo potvrzeno tvrzení vídeňských patologů Karla Landsteinerja a Erwina Poppera, že u poliomyelitidy hraje primární roli filtrabilní agens (18) V roce 1914 byla oznámena úspěšná izolace toto agens od případů příušnic. (19) Po 1. světové válce bylo prokázáno, že klíč k její etiologii pandemie 1918 má filtrovatelný virus. (20)

Identifikace viru odpovědného za lidskou chřipku byla provedena ve Spojeném království. V roce 1922 se Rada pro lékařský výzkum (MRC) rozhodla podpořit studium virů v novém institutu, Národním institutu pro lékařský výzkum (NIMR), který se nachází na předměstí Hampstead v Londýně. Právě v té době oslovil myslivecký časopis The Field MRK, aby sponzorovala studii zaměřenou na prevenci psinky očkovaním. Práce byla svěřena Patricku Laidlawovi, mimořádně kompetentnímu mikrobiologovi. Kvůli vysoké nakažlivosti nemoci byla zřízena speciální zařízení pro ochranu zvířat. Během vypuknutí psinky v této oblasti bylo pozorováno, že divoké fretky mohly být náhodně infikovány. V roce 1926 Laidlaw a George Dunkin úspěšně přenesli virus psinky na fretku. Fretka se stala běžným laboratorním zvířetem, velmi užitečným pro detekci a studium tohoto viru. Christopher Andrews, skvělý mladý lékař, se připojil k Laidlawově týmu. V roce 1933 vypukla v Londýně epidemie sezónní chřipky. Tým Laidlaw a Andrews přivítal nováčka Wilsona Smitha, mladého bakteriologa z NIMR. Na počátku epidemie sezónní chřipky sbíral nosohltanové sekrety pacientů, včetně materiálů od kolegů Andrewse a spolupracovníků, kteří se nakazili chřipkou. Smith se pokusil instilovat filtry hrdelního exsudátu do různých laboratorních zvířat různými cestami, včetně nosní sliznice. Byl neúspěšný. Snadno však dokázal přenést chřipku na fretky, které dostaly vysokou horečku, rýmu, kýchání a změněný celkový stav.

Výzkumníci pokračovali v šíření chřipky z fretky na fretku. Nakonec odhalili filtrovatelný virus, který se mohl sériově přenášet u fretek a vyvolal imunitu vůči reinfekci, protože infikované fretky se staly odolnými vůči chřipce. V roce 1933 Smith, Laidlaw a Andrews publikovali své výsledky; zatímco lidská chřipka byla nepopíratelně způsobena virem, přenos z člověka na člověka se nepodařilo prokázat [1]. V roce 1935 Wilson Smith pěstoval virus lidské chřipky na kultivačních buňkách z tkáňových fragmentů kuřecích embryí [2]. V roce 1936 byl Charles Stuart-Harris, mladý výzkumník NIMR, náhodně vystaven kýchání fretky, kterou nakazil virem chřipky. O dva dny později dostal chřipku a byl několik dní upoután na lůžko. Virus byl izolován z jeho krku a v jeho séru se objevily specifické protilátky. Tato nehoda dokončila přenosový řetězec a konečně splnila třetí Kochův postulát, který vyžadoval reprodukci nemoci u lidí [3]. Virus byl poprvé pozorován pod elektronovým mikroskopem v roce 1943. Jednalo se o maličký obalený virus naježený jehlany, který vešel ve známost jako virus A. Příbuzný virus B byl objeven v roce 1940 během malých epidemií sezónní chřipky u starších pacientů [4] a virus C byl identifikován v roce 1951 jako původce virové rinitidy [5]. Na rozdíl od vysoce variabilních virů A jsou viry B a C geneticky stabilní. Později byly pojmenovány Myxovirus influenzae, A, B a C.

S podporou americké armády vyvinuli Thomas Francis a Jonas Salk na University of Michigan první inaktivovanou vakcínu proti chřipce. Vakcína byla testována na bezpečnost a účinnost v americké armádě, než byla v roce 1945 licencována pro širší použití.

V historii objevu viry chřipky nelze zapomenout na objev viru ptačí chřipky:

Od konce 19. století byla zaznamenána závažná nebakteriální ohniska s vysokou úmrtností u domácích ptáků (přehled v [21, 22]). V devatenáctém a na počátku dvacátého století byla tato ohniska nazvána „drůbeží mor“ a teprve v roce 1955 Schafer zjistil, že „virus ptačího moru“ (FPV) byl skutečně typem IAV s podobnými vnitřními antigeny jako u lidí a prasat. [23] Sekvenační studie provedené o mnoho let později vedly k identifikaci kmenů vysoce patogenního viru ptačí chřipky (HPAI) odpovědných za tato ohniska jako H7 subtyp IAV, včetně A/chicken/Brescia/1902 (H7N7) [24], a dalších mnoha subtypů.

Purifikace virů

Tato metoda nikdy nepoužívá jako výchozí materiál v případě respiračních virů klinický materiál od pacienta. Vždy je virus nejprve pomnožen. V současnosti jsou dostupné takové technologie, které umožňují tento krok zcela vynechat.

Klasickými postupy jsou purifikace chřipkových virů namnožených na kuřecích embryích nebo permissivní buněčné kultuře (VERO E6, MDCK apod):

Centrifugace (klarifikace materiálu)

Ultrafiltrace (zakoncentrování)

A následná purifikace ultracentrifugací

V případě ultracentrifugace klinického materiálu není možné oddělit virus od buněčného detritu, který je v těchto materiálech vždy přítomen a má stejnou velikost a hustotu jako virus,

Moderní technologie purifikace virů zahrnují i další metodiky:

Tangenciální průtokovou filtraci (tangential-flow filtration (TFF) - chromatografii

Následována ultrafiltrací a diafiltrací, (25).

Reference:

1. W. Smith, C.H. Andrewes, P.P. Laidlaw. A virus obtained from influenza patients. Lancet, ii (1933), pp. 66-68
2. W. Smith. Cultivation of the virus of influenza. Br J Exp Pathol, 16 (1935), pp. 508-512
3. W. Smith, C.H. Stuart-Harris. Infuenza infection of man from the ferret. Lancet (1936), pp. 121-123
4. T. Francis. A new type of virus from epidemic influenza. Science, 92 (1940), pp. 405-406
5. R. M. Taylor. A further note on 1233 influenza C virus. Archiv Gesamte Virusforschung, 4 (1951), pp. 485-500.
6. Hist Sci. 1994 Jun;32(2):185-235.
History of virus research in the twentieth century: the problem of conceptual continuity
T van Helvoort 1. PMID: 11639267 DOI: 10.1177/007327539403200204
7. Rivers T. M. 'Some General Aspects of Filterable Viruses. In: Rivers T. M., editor. Filterable viruses. London: Bailliere, Tindall & Cox; 1928. pp. 3-52.
8. Rivers T. M. 'Some General Aspects of Filterable Viruses. In: Rivers T. M., editor. Filterable viruses. London: Bailliere, Tindall & Cox; 1928. p.6
9. Waterson A. P., Wilkinson L. An Introduction to the History of Virology. Cambridge: Cambridge University Press; 1978.

10. Kruse W. 'Die Erreger v. Husten und Schnupfen', Münchener medizinische Wochenschrift. 1914;65:1228.
11. Gibson H. G., Bowman F. B., Connor J. I. MRC Studies of Influenza in Hospitals of the British Armies in France, 1918. London: HMSO; 1919. The Etiology of Influenza: A Filterable Virus as the Cause; pp. 19–36.
12. Cummins S. L. Major H.G. Gibson. British Medical Journal. 1919;8 March:294–5
13. Thomson D., Thomson R. Annals of the Pickett-Thomson Research Laboratory, Parts I & 2. London: Bailliere, Tindall and Cox; 1933. Influenza. p.607
14. NA, FD1/529 Influenza Research by Colonel Cummins with British Forces in France: Cummins S. L. Studies of Influenza in Hospitals of the British Armies in France. London: HMSO; 1919. MRC, Special Report Series No. 36
15. Gibson H. G., Bowman F. B., Connor J. I. A Filtrable Virus as the Cause of the Early Stage of the Present Epidemic of Influenza. British Medical Journal. 1918;645–6. 14 December.
16. Ibid.
17. Bradford J. R., Bashford E. F., Wilson J. A. Preliminary Report on the Presence of a Filter-Passing Virus in Certain Diseases with special reference to Trench Fever, Influenza and Nephritis. Lancet. 1919;1 February:169. pp. 19–36.
18. Gordon M. H. Reports of Local Government Board, Medical Officer. London: HMSO; 1911. Notes on Acute Poliomyelitis with Reference to its Etiology, Histology, and Immunity; pp. 115–21.
19. Gordon M. H. Reports of Local Government Board, Public Health. Vol. 96. London: HMSO; 1914. On Experimental Investigations in Relation to Mumps or Epidemic Parotitis.
20. Andrewes F. W. Report on the Pandemic of Influenza, 1918–19. London: HMSO; 1920. The Bacteriology of Influenza; pp. 110–25. in Ministry of Health.
21. Alexander DJ, Brown IH. 2009. History of highly pathogenic avian influenza. Rev. Sci. Tech. 28, 19–38. (10.20506/rst.28.1.1856) [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Lupiani B, Reddy SM. 2009. The history of avian influenza. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 32, 311–323. (10.1016/j.cimid.2008.01.004) [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Schafer W. 1955. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest [Comparative sero-immunological studies on the viruses of influenza and classical avian influenza]. Zeitschr. Naturforsch. 10, 81–91 (in German). (10.1515/zn-1955-0205) [CrossRef] [Google Scholar]
24. Röhm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Süss J, Webster RG. 1995. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? Virology 209, 664–670. (10.1006/viro.1995.1301) [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. <https://nuvonis.com/wp-content/uploads/2019/10/Single-Step-Purification-2018.pdf>

S pozdravem



MUDr. Barbora Macková
Státní zdravotní ústav
ředitelka