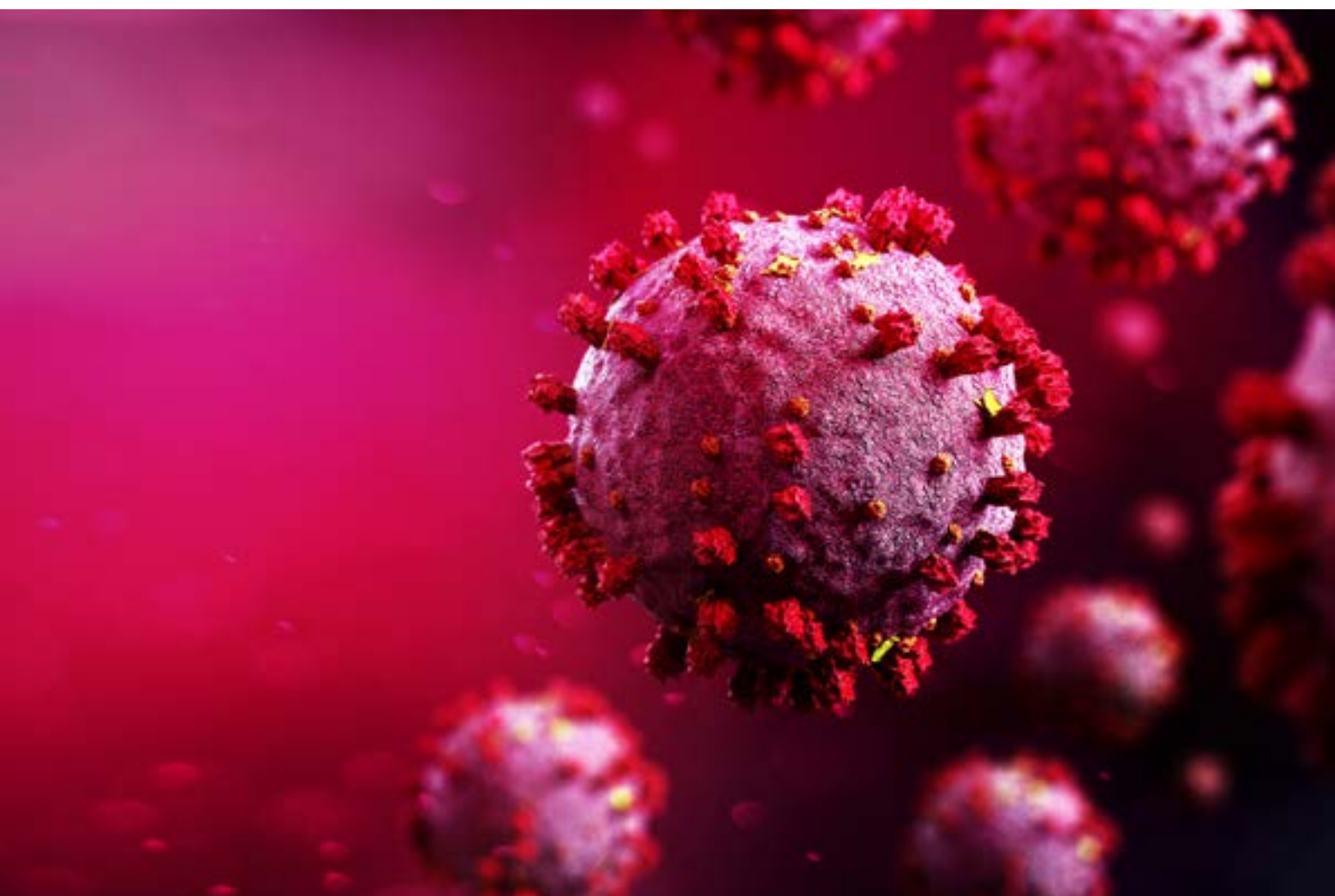


SARS-CoV-2 / COVID-19 **Deel 3**

SARS-CoV-2-diagnostiek: kritische terugblik
update voor het griepseizoen



Prof. Dr. med. Burkhard Schütz en Michelle Passarge, M.Sc.

SARS-CoV-2 / COVID-19 deel 3

SARS-CoV-2-diagnostiek: kritische terugblik
update voor het griepseizoen





○ Het griepseizoen vormt dit jaar een bijzondere uitdaging wanneer het gaat om:

- Het betrouwbaar **aantonen** van SARS-CoV-2-virussen
- Het **onderscheiden** van SARS-CoV-2-virussen ten opzichte van andere vaak voorkomende ziektekiemen die ademhalingsproblemen veroorzaken
- Het opsporen van immuniteit tegen SARS-CoV-2 door middel van tests op **humoraal** en/of **cellulair** niveau.

De testen waarmee we deze uitdagingen aangaan worden in deze brochure beschreven.



Hoewel we in 2021 starten met de coronavaccinatie in Nederland lijkt het erop dat het coronavirus desondanks nog lange tijd bij ons aanwezig zal zijn. Ook al is er een toenemend aantal studies dat een significant lagere dodelijkheid aan het virus toeschrijft dan aanvankelijk werd aangenomen [1 - 5].

De meeste infecties zijn asymptomatisch of vertonen lichte symptomen [6 - 10]. Toch blijft **SARS-CoV-2** gevaarlijk voor ouderen en risicogroepen. Het is vooral belangrijk om deze groepen te beschermen. Om dit te bereiken worden er op grote schaal tests uitgevoerd om zo virusdragers te identificeren die risicogroepen kunnen besmetten.

Elk najaar start een nieuw griepseizoen en daarmee ook de tijd van respiratoire ziekteverwekkers, zoals o.a. griep- en coronavirussen. Velen zullen griepverschijnselen vertonen en worden getest op SARS-CoV-2 uit angst voor **COVID-19**. Dus zal het testen voorlopig doorgaan.

Waar moeten we op letten bij het testen, wat hebben we geleerd uit het verleden? Na deel 2, dat ging over preventie door middel van integratieve therapiebenaderingen, richten we ons nu op de diagnostiek in deze brochure, het 3de deel van onze SARS-CoV-2-/ COVID-19-serie.

Waar moet een goede **SARS-CoV-2-diagnose** vandaag de dag aan voldoen? Dit bespreken we uitgebreid op de volgende pagina's.

SARS-CoV-2 analyse via PCR-testen

De PCR-technologie speelt een belangrijke rol in de **vroege fase** van de virale infectie, wanneer de virussen zich sterk vermenigvuldigen. Het wordt gebruikt voor de directe detectie van de ziekteverwekker [11]. De incubatietijd van een SARS-CoV-2 infectie ligt tussen 2 - 14 dagen, maar meestal tussen 5 - 7 dagen. Geïnfekteerde personen worden ongeveer 2 dagen voor het optreden van de symptomen PCR positief. PCR-testen van symptoomvrije patiënten zijn daarom alleen nuttig in het geval van contact met een bekende positieve patiënt (index).



K345 SARS-CoV-2-qPCR *Basis*

neus-/ keeluitstrijkje

Directe opsporing van ziekteverwekkers (opsporing van een vroege infectie).

Test-specificaties:

- SARS-CoV-2 specificiteit door detectie van 3 doelwitgenen: E-gen, RdRP-gen, S-gen
- Kwantificatie van ziektekiemen door opgave van CT-waarden

Pre-analyse

Of de aanwezige SARS-CoV-2-virussen kunnen worden gedetecteerd, hangt grotendeels af van de juiste monsterafname. Alleen met een correct uitgevoerde **diepe keeluitstrijk** kan de ziekteverwekker worden opgespoord. Het afschrappen van het gehemelte met een wattenstok is vaak niet succesvol bij een lage virusbelasting. Maar zelfs met een correcte monsterafname kunnen virussen niet altijd worden gevonden. Terwijl een keeluitstrijk vaak in minder dan 50% van de gevallen succesvol is, afhankelijk van de virale belasting, is het detectiepercentage bij een **nasofarynxuitstrijk** aanzienlijk hoger, namelijk 63% [12]. Het niet aanwezig zijn van koorts, droge hoest of vermoeidheid sluit geen SARS-CoV-2 infectie uit. Een PCR-onderzoek van diep opgehoest **sputum** kan in dergelijke gevallen nuttig zijn, omdat het detectiepercentage hierbij hoger is [12].

Specificiteit

In de afgelopen maanden zijn er herhaaldelijk berichten geweest die de specificiteit van de SARS-CoV-2-PCR-test in **twijfel trokken** [13]. Individuen zijn positief getest op het virus zonder symptomen. Vervolgtests op verzoek van de lokale gezondheidsdiensten lieten een negatief resultaat zien. Hoe is deze discrepantie ontstaan? Veel laboratoria gebruiken PCR-methoden die alleen het **E-gen** van het virus detecteren om SARS-CoV-2 op te sporen. Deze tests zijn goedkoop en worden gekenmerkt door een hoge gevoeligheid. Echter, omdat het E-gen, dat slechts de viruscoating codeert, niet specifiek is voor SARS-CoV-2 maar ook andere coronavirussen (sarbecovirussen) herkent [14], werden vroeger E-gen-positieve monsters getest met een 2e PCR om er zeker van te zijn dat het inderdaad om SARS-CoV-2 gaat. Er werd gezocht naar specifieke genen in de confirmatieve PCR, zoals het **RdRP-gen**, het **S-gen** of het **ORF1-gen**. Toen de confirmatieve tests in endemische gebieden op aanbeveling van de WHO werden stopgezet, werd de PCR-detectie van SARS-CoV-2 vanaf april 2020 in veel kleinere laboratoria alleen nog via het E-gen uitgevoerd.

CT-waardes en viruslast

Bij PCR-testen is het niet alleen belangrijk om te weten of SARS-CoV-2 al dan niet gedetecteerd is, maar ook om te weten hoeveel virussen er zijn gevonden. Dit wordt aangegeven door de zogenaamde **CT-waarde**, het aantal amplificatiecycli dat nodig is om het virus aantoonbaar te maken. Bij patiënten met een zeer hoge virusbelasting kunnen CT-waarden van minder dan 20 worden gevonden. Gemiddelde CT-waarden van 25 geven de aanwezigheid van ongeveer 100.000 virussen/ml aan. CT-waarden van 30 geven er slechts 100 aan. Als de **CT-waarden boven 33 of 34** liggen, zijn er minder dan 20 virussen/ml. In deze gevallen is het nauwelijks mogelijk om de ziekteverwekkers te kweken. Door de lage virusbelasting zijn de patiënten dus niet meer besmettelijk [15 – 17]. Om de gevoeligheid van de SARS-CoV-2-detectie te verhogen en zelfs de kleinste hoeveelheden virus bij beginnende infecties te kunnen opsporen, werd echter aanbevolen het aantal amplificatiecycli te verhogen tot 40. Daarmee wordt de aantoonbaarheidsgrens van de methode bereikt, waarbij de verhoogde sensitiviteit ten koste gaat van de specificiteit, d.w.z. **vals-positieve resultaten** komen vaker voor.

Bedenklijke positieve SARS-CoV-2-PCR-testen met CT-waarden boven 35 zijn niet ongevoel en moeten **altijd gecontroleerd** worden. Deze kunnen wijzen op afname in een vroege incubatiefase of herstelperiode, of op een slechte kwaliteit van het monster. Testen met een geïntegreerde controle van het uitstrijkje maken het mogelijk om conclusies te trekken over de kwaliteit van het monster en hebben altijd de voorkeur.

Wat betekent dit voor Biovis

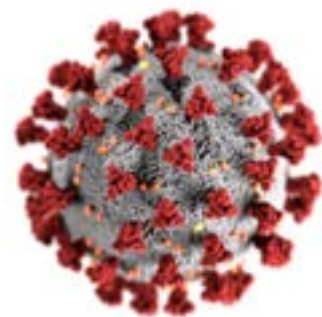
Biovis gebruikt een PCR-methode die een **uitstrijkcontrole** bevat en het mogelijk maakt conclusies te trekken over de kwaliteit van het monster. Wanneer de controletest negatief is, is het afgenomen materiaal niet voldoende voor een betrouwbare virusdetectie. Een herhaling wordt aanbevolen om **vals negatieve resultaten** te voorkomen.

De door Biovis gebruikte testmethode detecteert naast het E-gen ook twee SARS-CoV-2-specifieke genen, het **RdRP-** en het **S-gen**. Deze methode maakt dus betrouwbaar onderscheid tussen het SARS-CoV-2 virus en andere coronavirussen.

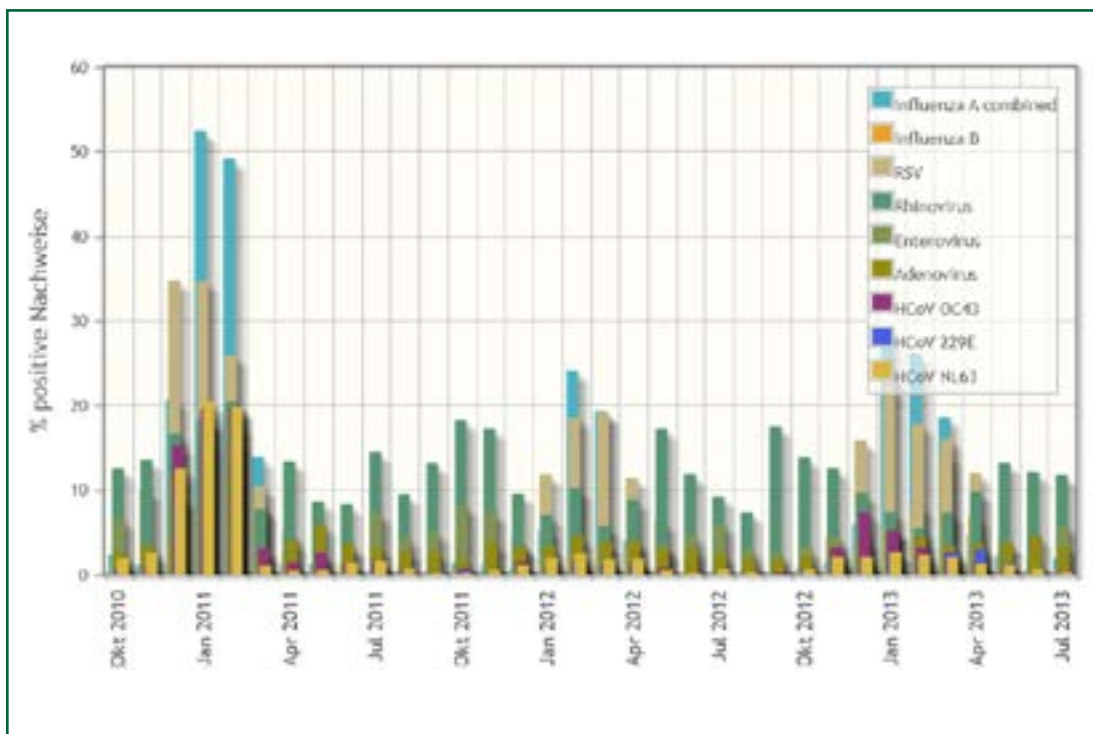
Biovis geeft het resultaat niet alleen aan met 'positief' of 'negatief'. De bevindingen bevatten de **CT-waarden** die het mogelijk maken om conclusies te trekken over de **virale belasting**. Dit is belangrijk omdat verschillende onderzoeken aangeven dat patiënten met CT-waarden boven 33 of 34 niet meer besmettelijk zijn [15 – 17]. Het Robert Koch Instituut, het Duitse publieke gezondheidsinstituut, houdt hier ook rekening mee in zijn ontslagrichtlijnen (vanaf juli 2020) [18].

Résumé: De PCR-methode is een zeer gevoelig en waardevol instrument voor de detectie van SARS-CoV-2, maar alleen als er daadwerkelijk rekening wordt gehouden met bovenstaande criteria.

Elke herfst start een nieuw griepseizoen en daarmee de tijd van respiratoire ziekteverwekkers, zoals griep en coronavirussen (zie Afb. 1). Miljoenen mensen zullen griepverschijnselen vertonen, waarvan velen op SARS-CoV-2 zullen worden getest uit **angst** voor COVID-19.



Alleen al om de angst niet verder te vergroten lijkt het zinvol om bij optredende symptomen in het uitstrijkje niet alleen te zoeken naar SARS-CoV-2, maar ook naar andere veelvoorkomende 'griepvirussen'. De oorzaak zal waarschijnlijk zelden SARS-CoV-2 zijn.



Afb. 1

Seizoensverloop van verschillende respiratoire virussen

(Bron: <https://clinical-virology.net>)

Biovis biedt met het nieuwe **SARS-CoV-2 PCR Plus**-Profiel een Multiplex-PCR-test aan, die naast het nieuwe coronavirus en **influenza A** en **B** en **RSV A** en **B** ook andere veelvoorkomende ziekteverwekkers van luchtweginfecties opspoot. Aangezien de virussen vergelijkbare symptomen met zich meebrengen, biedt de test een snelle en betrouwbare manier om de oorzaak vast te stellen.



K345K SARS-CoV-2-qPCR NIEUW

neus-/ keeluitstrijk

Ziektekiemen: SARS-CoV-2, Influenza A en B, RSV A en B

Vraagstelling: Zijn de symptomen te wijten aan SARS-CoV-2 of aan andere griepvirussen zoals influenza of RSV? SARS-CoV-2 specificiteit middels detectie van meerdere doelgenen: E-gen, RdRP-gen, S-gen. Kwantificering van ziekteverwekkers door opgave van CT-waarden.

Natuurlijk bevat het SARS-CoV-2-PCR-Plus-profiel ook alle bovengenoemde belangrijke criteria. De Multiplex-PCR omvat een **uitstrijkcontrole**, het laat een specifieke detectie van SARS-CoV-2 toe door het combineren van verschillende **doelgenen** en biedt een kwantificering van het virus via **CT-waarden**.

De PCR-technologie wordt gebruikt om ziekteverwekkers op te sporen in een **vroeg stadium** van een virale infectie. Dit is echter niet altijd succesvol [19]. Een foutief uitgevoerde uitstrijk kan ook de oorzaak zijn van fout-negatieve testresultaten, net zoals bij de monsterafname in een vroege incubatiefase of tijdens het herstel. Ook wordt niet bij elke patiënt met symptomen een uitstrijk afgenomen. Wil men weten of er ondanks een ontbrekende of negatieve PCR-test een SARS-CoV-2-infectie is opgetreden, kan dit worden gedaan door het opsporen van antilichamen in het bloed.

Antilichaambepalingen zijn zinvol als er al een immuunreactie op de ziekteverwekker heeft plaatsgevonden. Het wordt dan aanbevolen om altijd **IgM-** en **IgG-antilichamen** tegen SARS-CoV-2 te testen [20].



K341 SARS-CoV-2-antilichamen *serum*

- IgM-antilichamen (3 – 7 dagen na start symptomen, **meldplicht in Duitsland**)
- IgG-antilichamen (14 – 21 dagen na start symptomen, mogelijk immuniteit)

IgM-antilichamen zijn de eerste humorale immuunrespons van het lichaam. Ze zijn vooral aanwezig tijdens het vroege verloop van de ziekte en zijn meestal 3 – 6 dagen na het optreden van de eerste symptomen aantoonbaar (mediaan: 5 dagen). **IgG-antilichamen** daarentegen dienen als langdurig bewijs van een infectie met SARS-CoV-2, d.w.z. ze wijzen op een doorgemaakte infectie. **IgG-antilichamen** worden meestal gevonden vanaf de 10e – 18e dag (mediaan: 14 dagen) na het ontstaan van de eerste symptomen [21].

Het is altijd zinvol om IgM- en IgG-antilichamen tegen SARS-CoV-2 te onderzoeken, ook al zijn de symptomen al enige tijd aanwezig, omdat IgM-antilichamen **vaak 6 – 8 weken aanhouden** en seroconversie naar IgG ook met vertraging kan optreden.

IgA-antilichamen kunnen ook wijzen op een acute infectie met SARS-CoV-2. De mediaan tijd van IgA-antilichaamdetectie is 5 – 7 dagen na het optreden van de symptomen. Door de vaak onduidelijke constellatie bij bevindingen met talrijke IgA-positieve uitslagen en vaak zwakke of geen seroconversie, wordt alleen IgA-antilichaamdetectie tegen SARS-CoV-2 niet meer aangeboden door Biovis. Het is mogelijk dat het coronavirus door het mucosale immuunsysteem (IgA, sIgA) op de slijmvliezen wordt geneutraliseerd, zodat er geen of slechts lichte symptomen optreden en er geen verdere antilichamen worden gevormd. Dit is mogelijk en moet verder worden onderzocht. Voor een toepassing in laboratoria moeten de onderzoeksresultaten daarom worden afgewacht.

Zie ook: **indirect bewijs** van een doorgemaakte COVID-19-infectie met de

SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot (p. 13).

Immunitetsdetectie door IgG-antilichamen

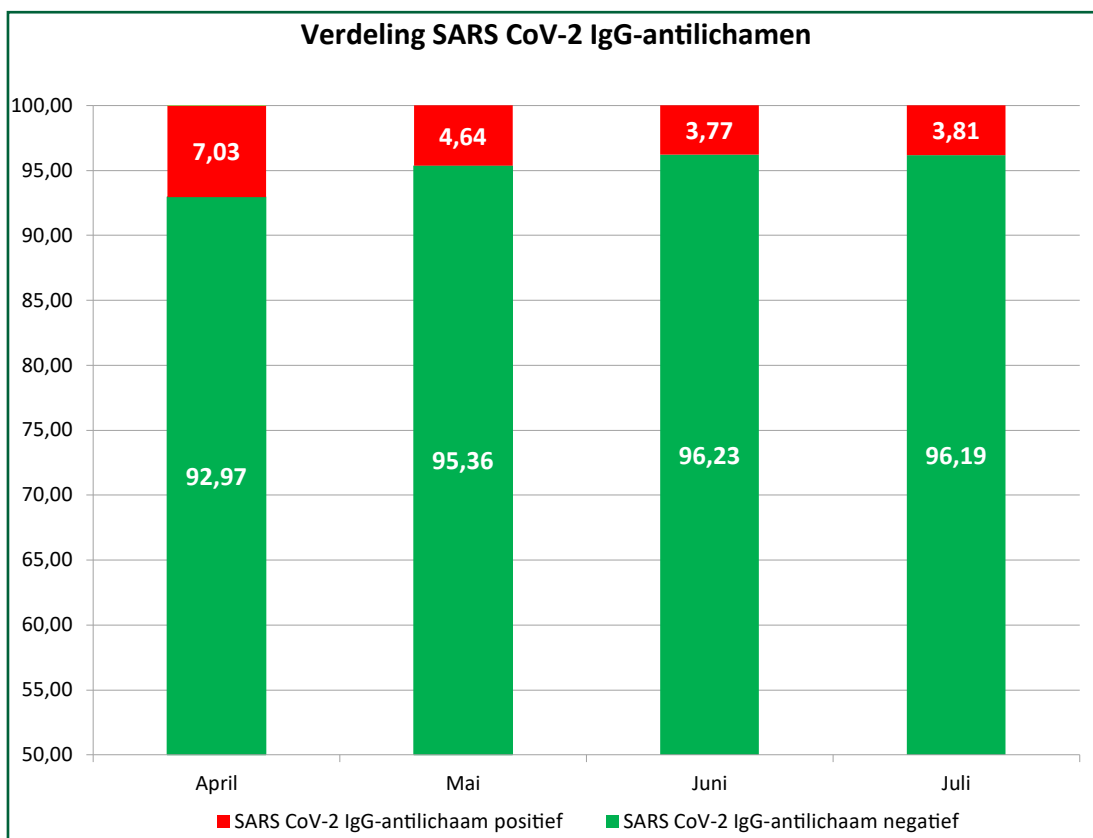
In de afgelopen maanden is herhaaldelijk gevraagd om IgG-antilichaamtesten om vast te stellen of er sprake is van een SARS-CoV-2-infectie en vooral of er sprake is van **humorale immuniteit** voor het virus.

Humorale immuniteit *NIEUW*

K341G SARS-CoV-2-IgG-antilichamen

Serum, capillair bloed, DBS (dried blood spot)

Aanvankelijk werd aangenomen dat de IgG-antilichaamdetectie tegen SARS-CoV-2 samenhangt met aanhoudende immuniteit [22]. Deze veronderstelling wordt in twijfel getrokken door recente studies. Deze tonen aan dat het niveau van de antilichamen van patiënten met een asymptomatisch of mild ziekteverloop binnen enkele weken afneemt en in 40% van de gevallen niet meer aantoonbaar is [23]. Bij symptomatische patiënten is de afname significant minder en de niveaus van antilichamen blijven in grote mate detecteerbaar [23].



Afb. 2
SARS-CoV-2-IgG-antilichaamdetecties in de periode april tot juli 2020 (Bron: Eigen gegevens, gebaseerd op resultaten van onze klanten, met significant hogere frequenties in sommige regio's van Duitsland.)

Onze eigen onderzoeken laten een soortgelijk beeld zien. Het percentage positieve IgG-antilichaamdetecties tegen SARS-CoV-2 is gedaald ten opzichte van april (zie afb 2) en ook de vervolgonderzoeken van eerder positieve patiënten laten dalende antilichaamspiegels zien. Vooral bij patiënten met een mild ziekteverloop. Dit heeft een impact op de immuniteit.

Specificiteit van de gebruikte antilichaamtesten

Lange tijd werd er voor IgG-antilichaamtests gewaarschuwd omdat de beschikbare testsystemen onvoldoende specifiek waren. Pas met de introductie van de 'Roche-testen' leek dit probleem te zijn opgelost. De test werd met veel verve aan het publiek gepresenteerd en gestart met antilichamen-testen op grote schaal. De testfabrikant Roche levert vooral aan grote laboratoria die monsters geautomatiseerd verwerken. Deze systemen zijn niet beschikbaar voor kleinere laboratoria.

Maar is de 'Roche test' echt beter dan andere beschikbare systemen? Nee, zo blijkt uit een studie in Frankfurt, waarin meerdere gangbare testsystemen met elkaar werden vergeleken. Alle geteste methoden toonden vergelijkbare waarden voor sensitiviteit en specificiteit [24], en sommige tests, waaronder de testmethode die bij Biovis wordt gebruikt, maakten indruk door hun zeer hoge specificiteit.

Waarom is specificiteit voor testen zo belangrijk?

Als de **specificiteit** van een gebruikte IgG-test 98% is, zal in een collectief van negatieve, gezonde personen 2% vals-positief reageren. Het aandeel is hoger bij patiënten met reumatische aandoeningen, auto-antilichamen en EBV-infectie. Artsen en therapeuten willen weten of hun patiënten **humorale immuniteit** hebben. Zij zijn daarom geïnteresseerd in de positieve voorspellende waarde van de resultaten, d.w.z. hoeveel van de **positieve resultaten** werkelijk positief zijn.

Test men COVID-19 patiënten die PCR-positief zijn na 4 weken op antilichamen, zullen (bijna) alle patiënten echt positief zijn. Test men alleen patiënten die geen contact hebben gehad met SARS-CoV-2 dan zijn alle positieve resultaten vals-positief. Met een pre-test kans in Duitsland van ongeveer 3% zijn 3 van de 5 IgG resultaten waar en 2 zijn vals-positief. De betekenis van het resultaat hangt dus af van de vraag welke patiënten worden getest. Met name in het geval van gebiedsonderzoek, waarbij patiënten willen weten of ze geïnfecteerd zijn met COVID-19 en of ze humorale immuniteit hebben, nadat ze een griepachtige infectie hebben gehad en PCR-tests meestal niet beschikbaar zijn, moet een test een hoge mate van specificiteit hebben.

Volgens de fabrikant heeft de door Biovis gebruikte IgG-antilichaamtest **een specificiteit van 99,6%**. In een vergelijkende studie van verschillende SARS-CoV-2-testen werd **100% van de geteste serummonsters correct positief** geïdentificeerd [24]. Onze test, die het N-eiwit op SARS-CoV-2-virussen detecteert, was ook iets beter dan de meeste andere methoden qua sensitiviteit.

Sommige laboratoria bieden dure **bevestigingstests** aan om er zeker van te zijn dat positieve IgG-antilichaam-detecties niet vals-positief zijn. De hierboven beschreven specificiteiten doen echter afbreuk aan het nut van deze procedure, vooral omdat in een directe vergelijking de bevestigingstests geen betere specificiteitswaarden hebben opgeleverd dan de procedure die wij gebruiken [24].

Gevolgen:

Als men wil weten of er immuniteit voor SARS-CoV-2 aanwezig is, is het niet voldoende om IgG-antilichaamdetectie aan te vragen. Zelfs in het geval van een positief resultaat met een test die een hoge specificiteit heeft, kunnen de antilichamniveaus binnen enkele weken dalen, vooral bij patiënten met een asymptomatisch of licht ziektebeloop [25, 26].

Antilichamniveaus moeten daarom worden gemonitord!

Immuniteit tegen SARS-CoV-2 kan echter ook aanwezig zijn bij een negatieve antilichamen test. Het is dan niet gebaseerd op een **humorale** maar op een **cellulaire** immuniteit door de aanwezigheid van SARS-CoV-2-specifieke T-celklonen, die via een nieuwe **SARS-CoV-2-Fluorescentie ELISpot** kunnen worden gedetecteerd.

Het belang van cellulaire immuniteit in de verdediging tegen SARS-CoV-2-virussen



K346

SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot

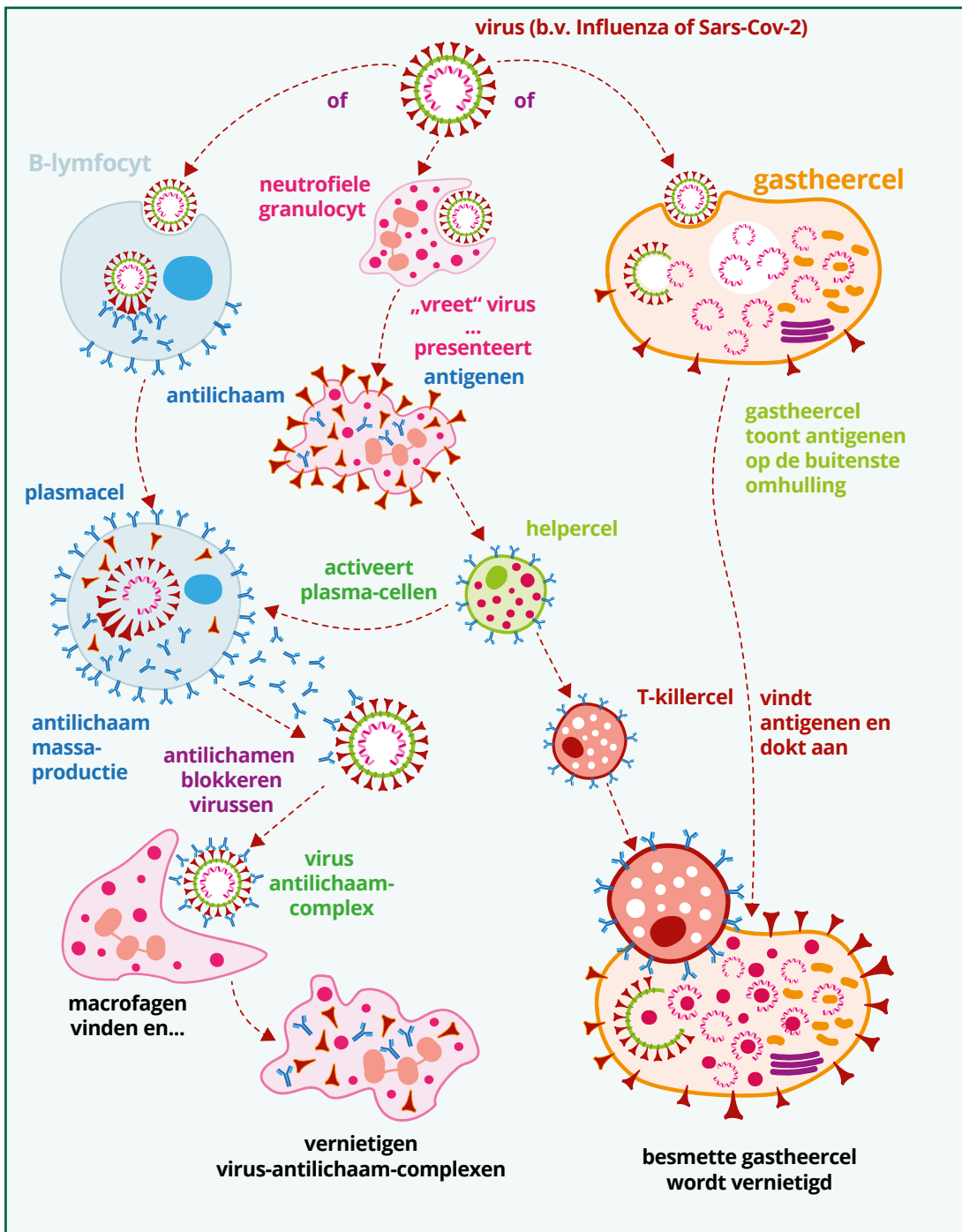
NIEUW

EXP 3 CPDA / 3 ACDB

Indicatie van cellulaire immuniteit (T-cellen) tegen SARS-CoV-2 en/of Coronavirussen door het vrijkomen van IFN- γ en IL-2 door patho-geen-specifiek geactiveerde T-effector- of geheugencellen.

De verdediging tegen virussen gebeurt niet alleen via antilichamen. Ook het cellulaire immuunsysteem speelt een belangrijke rol [27]. Ons immuunsysteem bestaat uit een aangeboren (niet-specifieke) en een verworven (specifieke) immuniteit. De verworven immuunrespons is in staat om virale antigenen te herkennen en gerichte cellulaire en humorale afweermechanismen te initiëren.

T-lymfocyten vormen het centrale onderdeel van de verworven immuniteit. Zij vormen het startpunt van de cellulaire en humorale immuunrespons. T-helpercellen (CD4+ T-cellen) vormen zich uit naïeve T-cellen nadat deze in contact zijn gekomen met virale antigenen. Eenmaal geactiveerd, delen T-helpercellen cytokines uit die de immuunrespons reguleren. Er worden patho-geen-specifieke T-celklonen gegenereerd die selectief virale antigenen herkennen en in het bloed worden gevonden als effector of geheugen T-cellen [28]. Effector T-cellen (killer T-cellen) vernietigen virus-geïnfecteerde gastheercellen. De geactiveerde T-helpercellen kunnen echter ook plasmacellen stimuleren en zo de productie van antilichamen op gang brengen [29] (zie. Afb. 3).



Afb. 3

Immuunafweer tegen virussen
(bron: biovis)

Wanneer het virus de mens een tweede keer infecteert, worden bestaande geheugencellen geactiveerd, die de mogelijkheid hebben om op maat gemaakte immuunreacties uit te lokken die leiden tot de snelle vernietiging van het virus.

Pathogeen-specifieke T-cellen en in het bijzonder hun T-geheugenfractie worden alleen in lage aantallen gevonden in het bloed. Daarom zijn er zeer gevoelige analysemethoden nodig die deze betrouwbaar kunnen detecteren. De ELISpot-test (Enzyme-Linked Immuno Spot) is een voorbeeld van een dergelijke methode [30].

SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot

De SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot meet specifieke cytokines die vrijkomen door geactiveerde cellen na stimulatie met virale antigenen. Hierdoor kan de frequentie van specifieke cytokine-releasing T-cellen worden bepaald, evenals de intensiteit van de cytokine-secretie [31]. De ELISpot-methode is zeer gevoelig en kan één cytokine-releasing T-cel uit 100.000 cellen detecteren [30].

Met conventionele ELISpot-assays kan slechts één cytokine (bv. IFN- γ) worden geanalyseerd, terwijl met de nieuwe **SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot** van Biovis twee cytokinen per cel (IFN- γ en IL-2) tegelijkertijd kunnen worden gedetecteerd. De gebruikelijke hoge specificiteit en sensitiviteit van deze methode blijven behouden.

IFN- γ is een pro-inflammatoire cytokine die voornamelijk wordt geproduceerd door **geactiveerde T-cellen en NK-cellen**. De afscheiding van IFN- γ door effectorcellen (bijv. cytotoxische T-cellen) is kenmerkend voor Th1-reacties [30]. IL-2 (T-cel groeifactor) regelt de activiteiten van T-lymfocyten. Het bevordert de activering en uitbreiding van T-cellen en de differentiatie van CD8+ T-cellen in **geheugencellen** [32].

In de SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot wijst de detectie van enkel IFN- γ -producerende effectorcellen op een immuunrespons van een SARS-CoV-2-infectie [33]. De aanwezigheid van IL-2 of de gelijktijdige detectie van IFN- γ en IL-2 suggereren de aanwezigheid van geheugencellen als bewijs van een **doorgemaakte SARS-CoV-2-infectie** en een vermoedelijk bestaande **cellulaire immuniteit** (zie. Afb. 4 op p. 16).



Indicaties: wanneer is het zinvol om een SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot uit te voeren?

1. Indirect bewijs van een doorgemaakte COVID-19-infectie

In geval van luchtweginfecties met koorts en droge hoest die niet konden worden bevestigd door een positieve SARS-CoV-2-PCR, sluit dit de ziekte van COVID-19 niet uit. Ook IgM- of IgG-antilichamen tegen SARS-CoV-2 zijn niet altijd aantoonbaar [22], zelfs als er een PCR-bevestigde SARS-CoV-2-infectie aanwezig was [34, 35]. Vooral bij asymptomatische patiënten of patiënten met milde symptomen worden vaak geen of slechts lage antilichamen spiegels gevonden, die, indien aanwezig, vaak afnemen tijdens de vroege herstelfase [23, 25]. Recent immunologisch onderzoek suggereert dat serologische antilichaam testen die IgM- en IgG-antilichamen in het bloed meten slechts een deel van eerdere infecties opvangen. Doordat veel mensen het coronavirus al via hun **cellulaire immuunsysteem** vernietigen voordat antilichamen worden geproduceerd [34, 35]. ELISPOT-detectie van SARS-CoV-2-specifieke T-effector- of geheugencellen kan eerder doorgemaakte COVID-19-infecties effectief opsporen [37]. Volgens de huidige studies is dit succesvol bij **75%** [35] en **100%** [38] van de herstellende COVID-19 patiënten, d.w.z. significant vaker dan bij detectie van antilichamen.

2. Bewijs van **cellulaire immuniteit**

Als SARS-CoV-2-specifieke T-celklonen kunnen worden gedetecteerd is dit niet alleen een bewijs van een voorafgaand viraal contact, maar kan dit ook wijzen op een bestaande cellulaire immuniteit. Dit is in het bijzonder wanneer het bewijs van geheugencellen wordt aangetoond door IL-2 of een combinatie van IL-2 en INF- γ . Deze hebben bij hernieuwd SARS-CoV-2 contact de mogelijkheid om op maat gemaakte immunoreacties te initiëren die leiden tot een snelle virusvernietiging [37, 39, 40]. Volgens de eerste studies blijven de SARS-CoV-2-specifieke T-celresponsen lange tijd detecteerbaar in de ELISpot [33, 35]. Dit blijkt ook uit de ervaring met nauw verwante SARS-CoV-1- en MERS-virussen. Relatief kortstondige antilichaamresponsen, maar langdurige T-celimmuniteit [40, 41], wat resulteert in SARS-specifieke geheugen-T-cellen die nog steeds in 2020 worden gevonden bij SARS-patiënten uit 2003 [55].

3. Indicatie van een mogelijke **basisimmunitet**

In de afgelopen maanden is er herhaaldelijk gediscussieerd over de vraag waarom zoveel mensen geen of slechts milde symptomen vertonen na een infectie met SARS-CoV-2 [6, 7]. In deze context werd het bestaan van een basisimmunitet herhaaldelijk als oorzaak ingebracht [36, 38, 42]. Moet het cellulaire immuunsysteem in staat zijn om SARS-CoV-2 effectiever te bestrijden na eerdere infecties met andere humaan pathogene coronavirussen?

Naast SARS-CoV-2 zijn er zes humaan pathogene coronavirussen (HCoV) [43]. Met name de vier wereldwijd endemische “verkoudheids-coronavirussen” (HCoV-NL63, -229E, -OC43 en -HKU1) zijn wijdverspreid onder de menselijke bevolking en zijn ook vaak bij ons de oorzaak van milde luchtweginfecties [44]. Meer dan 90% van de menselijke bevolking is seropositief voor minstens drie van deze HCoV's [45]. Afhankelijk van de patiëntenpopulatie zijn zij verantwoordelijk voor tot 20% van de acute, verworven luchtwegaandoeningen, zowel bij kinderen als bij volwassenen [46 - 48]. Twee coronavirussen zijn zeldzaam maar verantwoordelijk voor ernstige virale longontsteking: de MERS en SARS-CoV. Terwijl SARS-CoV sinds 2004 niet meer bij mensen is aangetroffen, circuleert MERS-CoV sinds 2012 voornamelijk op het Arabisch schiereiland [49, 50].

Op de vraag naar opheldering van de basisimmunitet door het cellulaire immuunsysteem na voorafgaand contact met wereldwijd endemische coronavirussen, worden niet alleen SARS-CoV-2-specifieke antigenen gebruikt in de Fluorescentie-ELISpot om lymfocyten te stimuleren. In een aparte aanpak worden antigenen gebruikt die ook de detectie van de andere humaan pathogene coronavirussen mogelijk maken. We zijn vooral geïnteresseerd in de wereldwijd voorkomende coronavirussen HCoV-NL63, -229E, -OC43 en -HKU1, die net als SARS-CoV-2 deels tot het geslacht van de bèta-coronavirussen en deels tot het geslacht van de alfa-coronavirussen behoren.

Als er bewijs is van PAN-corona-specifieke T-cel reacties in de ELISpot en worden deze patiënten niet ziek of hoogstens met milde symptomen na een SARS CoV-2-infectie, dan lijkt cellulaire basisimmunitet zeer waarschijnlijk [44, 51]. In ieder geval bevestigen de eerste reeks onderzoeken deze hypothese. Een cellulaire basisimmunitet wordt ook ondersteund door de observatie dat patiënten met reagerende PAN-corona-peptiden vaak geen SARS CoV-2 antilichamen vertonen [38]. Virus geïnficeerde cellen worden door T-effectorcellen geëlimineerd voordat er via stimulatie van **plasmacellen antilichamen** worden gevormd.

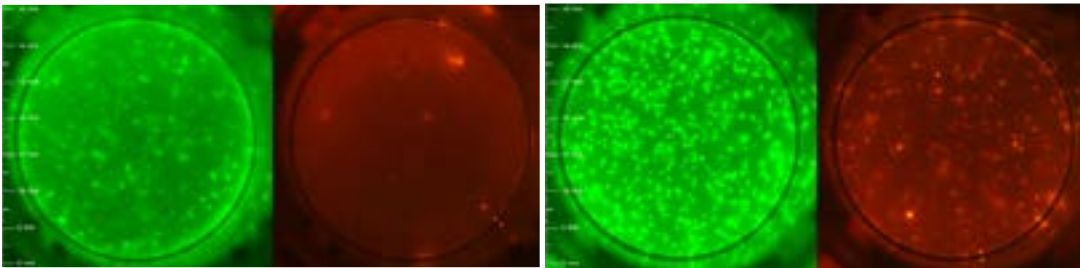
Een cellulaire basisimmunitet door een **kruisreactie van T-lymfocyten**, veroorzaakt door eerdere infecties met wereldwijd endemische coronavirussen, lijkt de meest waarschijnlijke verklaring te zijn voor het feit dat 80 - 90% van de mensen niet of slechts licht ziek wordt na infectie met SARS-CoV-2.

Talrijke studies hebben aangetoond dat een aanzienlijk deel van de tot-nu-toe niet-blootgestelde mensen uit de meest uiteenlopende gebieden al T-cellen hebben die specifiek op SARS-CoV-2 reageren [38, 42, 52 - 54]. Dit duidt op reeds bestaande kruisreactie T-geheugen-cellen.

Dit wordt ook ondersteund door een studie die op 29 juli in het wetenschappelijke tijdschrift Nature is gepubliceerd [53]. In deze studie werd in het bloed van COVID-19 patiënten en gezonde bloeddonoren gezocht naar SARS-CoV-2 reactieve T-cellen. Het is niet verwonderlijk

dat deze werden gedetecteerd in 83% van de COVID-19 patiënten. Ze werden echter ook gevonden bij 35% van de gezonde personen die nooit contact hadden gehad met SARS-CoV-2. Vergelijkbare studies vinden specifieke T-cel reacties tegen SARS-CoV-2 in 20% [52] of zelfs 50% [38] van de niet-blootgestelde bloeddonoren. Al deze studies **tonen de aanwezigheid aan van kruisreactieve T-cellen**, die waarschijnlijk werden gevormd tijdens eerder contact met endemische coronavirussen.

Nog indrukwekkender zijn de resultaten van een andere studie die ook de kwestie van de kruisreactieve T-cellen behandelde [51]. Hier werden bloedmonsters van menselijke donoren gebruikt die werden verkregen tussen 2015 en 2018, toen SARS-CoV-2 nog niet bestond. Een aantal reeds bestaande geheugen CD4+ T cellen met een vergelijkbare affiniteit voor SARS-CoV-2 en voor de verkoudheids-coronavirussen HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 of HCoV-HKU1 zijn in deze monsters te vinden. Nogmaals, **een aanwijzing voor een bestaande cellulaire basisimmunitet**.



Afb. 4

SARS-CoV-2-Fluorescentie-ELISpot Groenfluorescerend: IFN- γ verspreiding. Roodfluorescerend: IL2-verspreiding.
(Bron: eigen Biovis)

Linker afb.

Sterke IFN- γ -respons bij gebrek aan IL2-signalering.
Detectie van T-effectorcellen tegen SARS-CoV-2.

Rechter afb.

Sterke IFN- γ & IL-2 respons die duidt op een SARS-CoV-2 infectie met reeds bestaande geheugencellen.

Biovis heeft een uitgebalanceerde set van instrumenten met de hiervoor gepresenteerde testprocedures om betrouwbaar SARS-CoV-2 te kunnen analyseren alsmede angsten te kunnen wegnemen. Vooral de nieuwe bevindingen over een cellulaire afweerreactie tegen SARS-CoV-2 en een vermoedelijk bestaande basisimmunitet middels kruisreactieve T-cellen geven hoop voor de toekomst. Detectiemethoden hiervoor zijn beschikbaar bij Biovis!

Naast een goede diagnostiek weet u dat met name integratieve geneeskunde tal van mogelijkheden biedt voor een goede en wetenschappelijk onderbouwde preventie. Wilt u meer hierover weten lees dan **deel 2** van onze **SARS-CoV-2-/ COVID-19-serie**.

Bronvermelding:

- [1] F. Balabdaoui and D. Mohr, "Age-stratified model of the COVID-19 epidemic to analyze the impact of relaxing lock-down measures: nowcasting and forecasting for Switzerland," Cold Spring Harbor Laboratory Press, May 2020. doi: 10.1101/2020.05.08.20095059.
- [2] M. Stedman, M. Davies, M. Lunt, A. Verma, S. G. Anderson, and A. H. Heald, "A phased approach to unlocking during the COVID-19 pandemic—Lessons from trend analysis," *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 74, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1111/ijcp.13528.
- [3] H. Salje et al., "Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France," *Science*, vol. 369, no. 6500, pp. 208–211, Jul. 2020, doi: 10.1126/science.abc3517.
- [4] G. Meyerowitz-Katz and L. Merone, "A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection-fatality rates," *medRxiv*, p. 2020.05.03.20089854, Jul. 2020, doi: 10.1101/2020.05.03.20089854.
- [5] C. C. Chow, J. C. Chang, R. C. Gerkin, and S. Vattikuti, "Global prediction of unreported SARS-CoV2 infection from observed COVID-19 cases," *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.*, p. 2020.04.29.20083485, May 2020, doi: 10.1101/2020.04.29.20083485.
- [6] H. Streeck et al., "Infection fatality rate of SARS-CoV-2 infection in a German community with a super-spreading event," *medRxiv*, p. 2020.05.04.20090076, Jun. 2020, doi: 10.1101/2020.05.04.20090076.
- [7] J. Ioannidis, "The infection fatality rate of COVID-19 inferred from seroprevalence data," *medRxiv*, p. 2020.05.13.20101253, Jul. 2020, doi: 10.1101/2020.05.13.20101253.
- [8] E. Bendavid et al., "COVID-19 Antibody Seroprevalence in Santa Clara County, California," *medRxiv*, p. 2020.04.14.20062463, Apr. 2020, doi: 10.1101/2020.04.14.20062463.
- [9] W. E. Wei, Z. Li, C. J. Chiew, S. E. Yong, M. P. Toh, and V. J. Lee, "Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 — Singapore, January 23–March 16, 2020," *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 69, no. 14, pp. 411–415, Apr. 2020, doi: 10.15585/mmwr.mm6914e1.
- [10] X. He et al., "Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19," *Nat. Med.*, vol. 26, no. 5, pp. 672–675, May 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0869-5.
- [11] V. M. Corman et al., "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR," *Eurosurveillance*, vol. 25, no. 3, p. 2000045, Jan. 2020, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- [12] W. Wang et al., "Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 323, no. 18, pp. 1843–1844, May 2020, doi: 10.1001/jama.2020.3786.
- [13] A. N. Cohen and B. Kessel, "False positives in reverse transcription PCR testing for SARS-CoV-2," *medRxiv*, May 2020, doi: 10.1101/2020.04.26.20080911.
- [14] V. Corman et al., "Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR," 2020.
- [15] B. La Scola et al., "Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 39, no. 6, pp. 1059–1061, Jun. 2020, doi: 10.1007/s10096-020-03913-9.
- [16] R. Wölfel et al., "Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019," *Nature*, vol. 581, no. 7809, pp. 465–469, May 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
- [17] M. R. Tom and M. J. Mina, "To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value," *Clin. Infect. Dis.*, May 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa619.
- [18] Robert Koch Institut, "RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - COVID-19: Entlassungskriterien aus der Isolierung," 2020. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Entlassmanagement.html (accessed Aug. 10, 2020).
- [19] S. Woloshin, N. Patel, and A. S. Kesselheim, "False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection — Challenges and Implications," *N. Engl. J. Med.*, Jun. 2020, doi: 10.1056/nejmp2015897.

- [20] Centers for Disease Control and Prevention, "Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing | CDC," 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html> (accessed Aug. 11, 2020).
- [21] Q. X. Long et al., "Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19," *Nat. Med.*, vol. 26, no. 6, pp. 845–848, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
- [22] A. Krüttgen, C. G. Cornelissen, M. Dreher, M. Hornef, M. Imöhl, and M. Kleines, "Comparison of four new commercial serologic assays for determination of SARS-CoV-2 IgG," *J. Clin. Virol.*, vol. 128, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104394.
- [23] Q. X. Long et al., "Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections," *Nat. Med.*, vol. 26, no. 8, pp. 1200–1204, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0965-6.
- [24] N. Kohmer, S. Westhaus, C. Rühl, S. Ciesek, and H. F. Rabenau, "Brief clinical evaluation of six high-throughput SARS-CoV-2 IgG antibody assays," *J. Clin. Virol.*, vol. 129, p. 104480, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104480.
- [25] F. Wu et al., "Neutralizing Antibody Responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 Recovered Patient Cohort and Their Implications," *SSRN Electron. J.*, p. 2020.03.30.20047365, Apr. 2020, doi: 10.1101/2020.03.30.20047365.
- [26] J. Seow et al., "Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection," *medRxiv*, p. 2020.07.09.20148429, Jul. 2020, doi: 10.1101/2020.07.09.20148429.
- [27] S. R. Huber, J. van Beek, J. de Jonge, W. Luytjes, and D. van Baarle, "T cell responses to viral infections - opportunities for peptide vaccination," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. APR, Frontiers Research Foundation, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00171.
- [28] S. L. Swain, K. K. McKinstry, and T. M. Strutt, "Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses," *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 2, Nature Publishing Group, pp. 136–148, Feb. 2012, doi: 10.1038/nri3152.
- [29] J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik, "T Cell-Mediated Immunity," in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.*, 5th ed., Garland Science, 2001.
- [30] H. Zhang, "INF-gamma Release ELISpot Assay," *Bio-Protocol*, vol. 2, no. 6, 2012, doi: 10.21769/bioprotoc.120.
- [31] C. Möbs and T. Schmidt, "Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISpot Assay," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 136, no. 6, pp. e55–e59, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.jid.2016.04.009.
- [32] M. F. Bachmann and A. Oxenius, "Interleukin 2: From immunostimulation to immunoregulation and back again," *EMBO Rep.*, vol. 8, no. 12, pp. 1142–1148, Dec. 2007, doi: 10.1038/sj.embor.7401099.
- [33] S. Thijsen et al., "Elevated nucleoprotein-induced interferon- γ release in COVID-19 patients detected in a SARS-CoV-2 enzyme-linked immunosorbent spot assay," *J. Infect.*, vol. 0, no. 0, 2020, doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.015.
- [34] T. Sekine et al., "Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19," *bioRxiv*, p. 2020.06.29.174888, Jun. 2020, doi: 10.1101/2020.06.29.174888.
- [35] F. Gallais et al., "Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Induces Cellular Immune Response without Seroconversion," *medRxiv*, p. 2020.06.21.20132449, Jun. 2020, doi: 10.1101/2020.06.21.20132449.
- [36] D. M. Altmann and R. J. Boyton, "SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection," *Sci. Immunol.*, vol. 5, no. 49, p. 6160, Jul. 2020, doi: 10.1126/sciimmunol.abd6160.
- [37] R. A. Seder, P. A. Darrah, and M. Roederer, "T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 4, *Nat Rev Immunol*, pp. 247–258, Apr. 2008, doi: 10.1038/nri2274.
- [38] A. Grifoni et al., "Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals," *Cell*, vol. 181, no. 7, pp. 1489–1501.e15, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
- [39] J. Zhao et al., "Airway Memory CD4+ T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses," *Immunity*, vol. 44, no. 6, pp. 1379–1391, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.006.
- [40] R. Channappanavar, C. Fett, J. Zhao, D. K. Meyerholz, and S. Perlman, "Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection," *J. Virol.*, vol. 88, no. 19, pp. 11034–11044, Oct. 2014, doi: 10.1128/jvi.01505-14.

- [41] J. Zhao et al., "Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T cell responses," *Sci. Immunol.*, vol. 2, no. 14, p. 5393, Aug. 2017, doi: 10.1126/sciimmunol.aan5393.
- [42] A. Nelde et al., "SARS-CoV-2 T-cell epitopes define heterologous and COVID-19-induced T-cell recognition," *Res. Sq.*, Jun. 2020, doi: 10.21203/rs.3.rs-35331/v1.
- [43] V. M. Corman, J. Lienau, and M. Witzentrath, "Coronaviruses as the cause of respiratory infections," *Internist*, vol. 60, no. 11, pp. 1136–1145, Nov. 2019, doi: 10.1007/s00108-019-00671-5.
- [44] A. Sette and S. Crotty, "Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 8, pp. 457–458, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0389-z.
- [45] G. J. Gorse, G. B. Patel, J. N. Vitale, and T. Z. O'Connor, "Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 17, no. 12, pp. 1875–1880, Dec. 2010, doi: 10.1128/CVI.00278-10.
- [46] N. Friedman, H. Alter, M. Hindiyeh, E. Mendelson, Y. Shemer Avni, and M. Mandelboim, "Human Coronavirus Infections in Israel: Epidemiology, Clinical Symptoms and Summer Seasonality of HCoV-HKU1," *Viruses*, vol. 10, no. 10, p. 515, Sep. 2018, doi: 10.3390/v10100515.
- [47] I. M. Mackay et al., "Co-circulation of Four Human Coronaviruses (HCoVs) in Queensland Children with Acute Respiratory Tract Illnesses in 2004," *Viruses*, vol. 4, no. 4, pp. 637–653, Apr. 2012, doi: 10.3390/v4040637.
- [48] L. J. R. van Elden et al., "Frequent Detection of Human Coronaviruses in Clinical Specimens from Patients with Respiratory Tract Infection by Use of a Novel Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction," *J. Infect. Dis.*, vol. 189, no. 4, pp. 652–657, Feb. 2004, doi: 10.1086/381207.
- [49] I. M. Mackay and K. E. Arden, "MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission," *Virology*, vol. 12, no. 1, pp. 1–21, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12985-015-0439-5.
- [50] A. Maillies et al., "First cases of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-COV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013," *Eurosurveillance*, vol. 18, no. 24, p. 20502, Jun. 2013, doi: 10.2807/ese.18.24.20502-en.
- [51] J. Mateus et al., "Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans," *Science* (80-.), p. eabd3871, Aug. 2020, doi: 10.1126/science.abd3871.
- [52] D. Weiskopf et al., "Phenotype of SARS-CoV-2-specific T-cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome 2316," *medRxiv*, p. 2020.04.11.20062349, May 2020, doi: 10.1101/2020.04.11.20062349.
- [53] J. Braun et al., "SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19," *Nature*, pp. 1–8, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2598-9.
- [54] N. Le Bert et al., "SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls," doi: 10.1038/s41586-020-2550-z.
- [55] Le Bert, N., Tan, A.T., Kunasegaran, K. et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>

Heeft u nog vragen?

Bel gerust, we staan u graag te woord!

Tel. NL: 088 - 10 10 880

info@biovis.de

Illustratieverantwoording:

© Fabian - stock.adobe.com

© peterschreiber.media - stock.adobe.com

© PerigTemplate - stock.adobe.com

© rcfotostock - stock.adobe.com

© semion - stock.adobe.com

© biovis' Diagnostik MVZ GmbH

biovis'

Diagnostik MVZ GmbH

Justus-Staudt-Straße 2

65555 Limburg

Tel.: +49 6431 21248 0

Fax: +49 6431 21248 66

info@biovis.de

www.biovis.de