

SARS-CoV-2 in rioolwater: Detectie van het virus en de vaccins

Samenvatting

De in Nederland toegepaste vaccins zullen niet in rioolwater worden aangetoond met de huidige detectiemethode. Het is tevens zeer onwaarschijnlijk dat vaccin vectoren, het genetische materiaal van de vaccins en de antistoffen die worden aangemaakt na vaccinatie kunnen worden aangetoond in rioolwater. Van de vaccins die buiten Nederland worden toegepast kunnen de geïnactiveerde virussen wel worden aangetoond als reizigers uit die gebieden, voor zover bekend vooral China, Bahrein, Egypte en Verenigde Arabische Emiraten, naar Nederland komen. Dergelijke toegepaste vaccins zullen naar verwachting het gerapporteerde aantal virusdeeltjes nauwelijks beïnvloeden door beperkte migratie en reizen. De invloed van vaccinatie op het gerapporteerde aantal virusdeeltjes zal naar verwachting wel merkbaar zijn op termijn wanneer steeds meer mensen gevaccineerd zijn en minder virusdeeltjes zullen circuleren. Dit wordt nader onderzocht.

Effect van vaccinatie op SARS-CoV-2 detectie in rioolwater

De vaccins die in Nederland worden ingezet (Pfizer, Janssen, Moderna, Curevac, Sanofi/GSK en Oxford-AstraZeneca) bevatten (elementen van) het SARS-CoV-2 spike eiwit (S) of het bijbehorende gen. Het CDC diagnostische panel¹⁻² dat wordt gebruikt voor detectie van SARS-CoV-2 in rioolwater in Nederland detecteert de aanwezigheid van de genetische code van het SARS-CoV-2 nucleocapside (N). Aangezien de in Nederland toe te dienen vaccins een ander deel van de SARS-CoV-2 genetische code bevat dan dat bij detectie in rioolwater wordt aangetoond, zullen de vaccins niet gedetecteerd worden met de huidige detectiemethode voor SARS-CoV-2 rioolwatersurveillance. Bijlage 2 bevat meer informatie over het SARS-CoV-2 genoom en bijlage 3 bevat informatie over de stoffen die door het RIVM worden gebruikt om corona in rioolwater te detecteren.

Buiten Nederland worden vaccins toegepast die geïnactiveerde virussen bevatten. Aangezien deze ook de genetische code van het SARS-CoV-2 nucleocapside (N) bevatten, zou dit type vaccin in het rioolwater aangetoond kunnen worden als reizigers uit die gebieden, voor zover bekend China, Bahrein, Egypte en Verenigde Arabische Emiraten³, naar Nederland komen. Naar verwachting zullen de aangetoonde vaccinvirussen het gerapporteerde aantal virusdeeltjes niet significant beïnvloeden, gezien beperkte migratie en reizen.

Door vaccinatie zal op termijn het aantal gerapporteerde virusdeeltjes naar verwachting merkbaar dalen door afname van het aantal infecties en verminderde virusuitscheiding in feces. Met behulp van rekenmodellen kan worden onderzocht wat de verwachte impact van vaccinatie op de verspreiding van het coronavirus en het aantal virusdeeltjes in rioolwater is.

Kunnen SARS-CoV-2 vaccins aangetoond worden in rioolwater?

Detectie genetisch materiaal vaccins

Het is onwaarschijnlijk dat het mRNA van vaccins gebaseerd op het Spike proteïen na vaccinatie in uitwerpselen terecht komt en dus in het rioolwater. Dit omdat RNA in vrije vorm in het lichaam niet intact blijft maar wordt afgebroken⁴. Het is dus zeer onwaarschijnlijk dat het mRNA intact in feces en dus rioolwater terecht komt. Daarnaast vervallen mRNA moleculen snel bij kamertemperatuur. Detectie van de mRNA vaccins via deze weg is dus erg onwaarschijnlijk. Bovendien is de genetische modificatie van het Spike proteïen voor vaccins vooralsnog niet openbaar. De werking van mRNA vaccins wordt getest door de immuunrespons te meten⁵.

Detectie antistoffen

Vaccinatie zal een immuunrespons in gang zetten. Als het vaccin voor eenzelfde immuunrespons zorgt als bij een natuurlijke infectie, dan kan een toename van antistoffen in het bloed verwacht worden. Aangezien antistoffen in het lichaam al worden afgebroken, kunnen antistoffen niet worden aangetoond in uitwerpselen. Het is daarom niet mogelijk om antistoffen aan te tonen in rioolwater⁶⁻⁷. Aangezien pre-vaccinatie veel rioolwatersamples opgeslagen zijn, is het mogelijk om pre- en post-vaccinatie rioolwatermonsters met elkaar te vergelijken. Wel is het zo dat er gevalideerd moet worden of de eventuele waarden gelijk blijven bij invriezen.

Detectie vectoren

Het aantonen in rioolwater van de vectoren die het mRNA van het Spike protein dragen is niet aannemelijk. Als we ons beperken tot de bedrijven waar Nederland een contract mee heeft, gaat het om een lipid nanoparticles (LNP)-capsule en een adenovirus vector. BEVS worden buiten beschouwing gelaten vanwege de relevantie van dit vaccin. Deze is namelijk in fase-I/II en fase-IIb is uitgesteld tot februari 2021¹³ vanwege onvoldoende immuunrespons op het vaccin. Verwachting is dat het vaccin zeker tot eind 2021 nog niet beschikbaar is¹³.

De adenovirussen zijn non-replicating^{8,9}. De virussen vermenigvuldigen zich dus niet in het menselijk lichaam wat inhoudt dat het onwaarschijnlijk is dat de oorspronkelijk toegediende aantallen virusvector in de ontlasting terechtkomen. Een uitgebreide inventory naar shedding van virusvectoren laat zien dat bij intramusculaire toediening van replication-deficient adenovirusvectoren deze niet in de ontlasting terecht komen^{32,33}. Bij een aantal studies wordt het virus wel gedetecteerd in de ontlasting/urine, maar hier gaat het om een (zes maal herhaalde) intratumorale injectie van o.a. de prostaat en de slokdarm^{34,35}. Aangezien het bij de SARS-CoV-2 vaccinaties om een intramusculaire injectie gaat lijkt dit niet aan de orde en zal dit geen weg zijn tot aantonen van het vaccin in afvalwater.

De LNP-capsules worden afgebroken in het lichaam¹⁰, waardoor deze niet in feces of rioolwater terechtkomen.

Welke COVID-19 vaccins zijn er?

Toepassing in Nederland

De vaccins van de bedrijven waarmee Nederland een contract heeft¹¹ (zie tabel 1) zijn gebaseerd op het Spike (S) protein van het SARS-CoV-2. Drie hiervan hebben als vector een LNP-capsuled mRNA, twee een non-replicating adenovirusvector welke codeert voor het Spike protein. De laatste is gebaseerd op een baculovirus expression vector system (BEVS) met een DNA sequentie welke codeert voor het Spike protein (Sanofi)^{12,13}. Deze is echter nog in fase-I/II en fase-IIb is uitgesteld tot februari 2021¹⁴ vanwege onvoldoende immuunrespons op het vaccin. Verwachting is dat het vaccin zeker tot eind 2021 nog niet beschikbaar is¹⁵.

Toepassing buiten Nederland

Ook buiten de door Nederland gecontracteerde vaccins, maken de meeste vaccins in ontwikkeling enkel gebruik van het SARS-CoV2 Spike (S) protein. Enkele vaccins maken gebruik van een klassieke vaccinplatforms en maken gebruik van geïnactiveerd virus¹⁶. Ook zijn er studies waaruit blijkt dat het nucleocapside van SARS-CoV-2 een geschikt target voor een vaccin is¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹. Daarmee kan verwacht worden dat er vaccin kandidaten ontwikkeld gaan worden die specifiek de genetische code van het SARS-CoV-2 nucleocapside bevatten.

Bijlage 1 bevat een overzicht van de wereldwijde corona vaccin koplopers, de door Nederland bestelde vaccins en Microbiologische informatie over de vaccins.

Tabel 1: Vaccinontwikkelaars waar Nederland een contract mee heeft (d.d 20-11-2020)

Company	Vaccine name	Target	Vector
CureVac	CVnCoV	SARS-CoV-2 Spike (S) protein	LNP-capsuled (mRNA)
Moderna/NIAID	mRNA-1273	SARS-CoV-2 Spike (S) protein	LNP-capsuled (mRNA)
BioNTech/Pfizer	BNT162b2	SARS-CoV-2 Spike (S) protein	LNP-capsuled (mRNA)
Janssen Pharmaceutical Companies	Ad.26.COVS.S/JNJ-78436735	SARS-CoV-2 Spike (S) protein	Human adenovirus type 26
University of Oxford + AstraZeneca	AZD1222 / ChAdOx1 nCoV-19	SARS-CoV-2 Spike (S) protein	Chimpanzee adenovirus vaccine vector (ChAdOx1)
Sanofi	Not yet revealed	SARS-CoV-2 Spike (S) protein	Baculovirus expression vector system (BEVS)



















Bijlagen

1. Sars-CoV-2 Vaccins

Corona vaccin koplopers (in ontwikkeling)Table 1: Leading vaccines (08/01/2021)³

Developer	Type	Phase	Status
 Pfizer-BioNTech	mRNA	2-3	Approved in Canada, Switzerland, and other countries. Emergency use in E.U., U.S. and other countries.
 Moderna	mRNA	3	Approved in Canada, Emergency use in U.S., E.U., Israel
 CanSino	Adenovirus	3	Limited use in China.
 Gamaleya	Adenovirus	3	Early use in Russia. Emergency use in Belarus, Argentina.
 Johnson & Johnson	Adenovirus	3	
 Oxford-AstraZeneca	Adenovirus	2-3	Emergency use in Britain, India, Argentina.
 Novavax	Protein	3	
 Vector Institute	Protein	3	Early use in Russia.
 Sinopharm-Beijing	Inactivated	3	Approved in China, U.A.E., Bahrain.. Emergency use in Egypt.
 Sinopharm-Wuhan	Inactivated	3	Limited use in China, U.A.E.
 Sinovac	Inactivated	3	Limited use in China.
 Bharat Biotech	Inactivated	3	Emergency use in India.

Door Nederland bestelde vaccins:Tabel 2: Overzicht kandidaat-vaccins ("Strategieën voor COVID-19-vaccinatie" rapport van de gezondheidsraad, dd 30 november)²⁰

Vaccins	Type	Vorwacht	Aantal doses
University of Oxford/ AstraZeneca	Vectorvaccin 	Voorjaar 2021 	± 11,7 miljoen (mogelijk ± 3,9 extra) 
Janssen Pharmaceutical Companies	Vectorvaccin 	Voorjaar 2021 	± 7,8 miljoen (mogelijk 2 keer) 
Sanofi Pasteur/GSK	Eiwitvaccin 	Zomer 2021 	± 11,7 miljoen 
Moderna	RNA-vaccin 	Voorjaar 2021 	± 3,1 miljoen (mogelijk 2 keer) 
CureVac	RNA-vaccin 	Zomer 2021 	± 8,7 miljoen (mogelijk ± 7 extra) 
BioNTech/Pfizer	RNA-vaccin 	Voorjaar 2021 	± 7,8 miljoen (mogelijk ± 3,9 extra) 

Microbiologische informatie over de vaccins

Pfizer

BNT162b2, a lipid nanoparticle– formulated, nucleoside-modified RNA (modRNA) encoding the SARS-CoV-2 full-length spike, modified by two proline mutations to lock it in the prefusion conformation.²¹

Oxford-AstraZeneca

The ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) consists of the replication-deficient simian adenovirus vector ChAdOx1, containing the full-length structural surface glycoprotein (spike protein) of SARS-CoV-2, with a tissue plasminogen activator leader sequence. ChAdOx1 nCoV-19 expresses a codon-optimised coding sequence for the spike protein (GenBank accession number MN908947).²²

Janssen (Johnson&Johnson)

Ad26.COV2.S, a non replicating adenovirus 26 based vector expressing the stabilized pre-fusion spike (S) protein of SARS-CoV-2.²³

Moderna

The mRNA-1273 vaccine candidate, manufactured by Moderna, encodes the S-2P antigen, consisting of the SARS-CoV-2 glycoprotein with a transmembrane anchor and an intact S1–S2 cleavage site. S-2P is stabilized in its prefusion conformation by two consecutive proline substitutions at amino acid positions 986 and 987, at the top of the central helix in the S2 subunit. The lipid nanoparticle capsule composed of four lipids was formulated in a fixed ratio of mRNA and lipid.²⁴

Information on mRNA-1273 COVID-19 VACCINE, including genetic codes can be found. <https://www.modernatx.com/patents>²⁵.

Curevac

For CVnCoV RNAActive® technology platform was applied. CVnCoV consists of nonchemically modified mRNA encoding full-length S protein, encapsulated in LNP. The coded S protein includes two proline mutations (S-2P)^{26,27}

Sanofi Pasteur/GSK

CoVLP-adjuvanted is a recombinant protein adjuvanted vaccine. Virus like particles are coated with SARSCoV2 protein. The virus spike protein antigen is presented as protein particles without genetic materials, adjuvanted to enhance immune response.

Sinovac

CoronaVac (Sinovac Life Sciences, Beijing, China) is an inactivated vaccine candidate against COVID-19 that has shown good immunogenicity in mice, rats, and non-human primates with vaccine-induced neutralising antibodies to SARS-CoV-2, which could neutralise ten representative strains of SARS-CoV-2.²⁸ It is based on 11 samples that contained SARS-CoV-2 strains that are widely scattered on the phylogenetic tree constructed from all available sequences, representing to some extent circulating SARS-CoV-2 populations. Strain CN2 was chosen to develop a purified inactivated SARS-CoV-2 virus vaccine, PiCoVacc, and another 10 strains, CN1, CN3 to CN5, and OS1 to OS6, as preclinical challenge strains. The CN1 and OS1 strains are closely related to 2019-nCoV-BetaCoV Wuhan/ WIV04/2019 and EPI_ISL_412973, respectively, which have been reported to cause severe clinical symptoms, including respiratory failure requiring mechanical ventilation.²⁹

Sinopharm Beijing

The HB02 strain was used for the development of the inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBIBP-CorV)³⁰

Tabel 3: Eigenschappen van door Nederland bestelde vaccins.

COVID-19 Vaccine developer/manufacturer	Vaccine platform	Type of candidate vaccine	Administration
University of Oxford/AstraZeneca	Non-Replicating Viral Vector	ChAdOx1-S	IM
Janssen Pharmaceutical Companies	Non-Replicating Viral Vector	Adenovirus Type 26 vector	IM
Moderna/NIAID	RNA	LNP-encapsulated mRNA	IM
BioNTech/Fosun Pharma/Pfizer	RNA	3 LNP-mRNAs	IM
Curevac	RNA	mRNA	IM
Sanofi Pasteur/GSK	Protein Subunit	S protein (baculovirus production)	IM

2. Publicaties over het SARS-CoV-2 genoom

Afsane Bahrami & Gordon A Ferns et al., Genetic and pathogenic characterization of SARS-CoV-2: a review, <https://doi.org/10.2217/fvl-2020-0129>

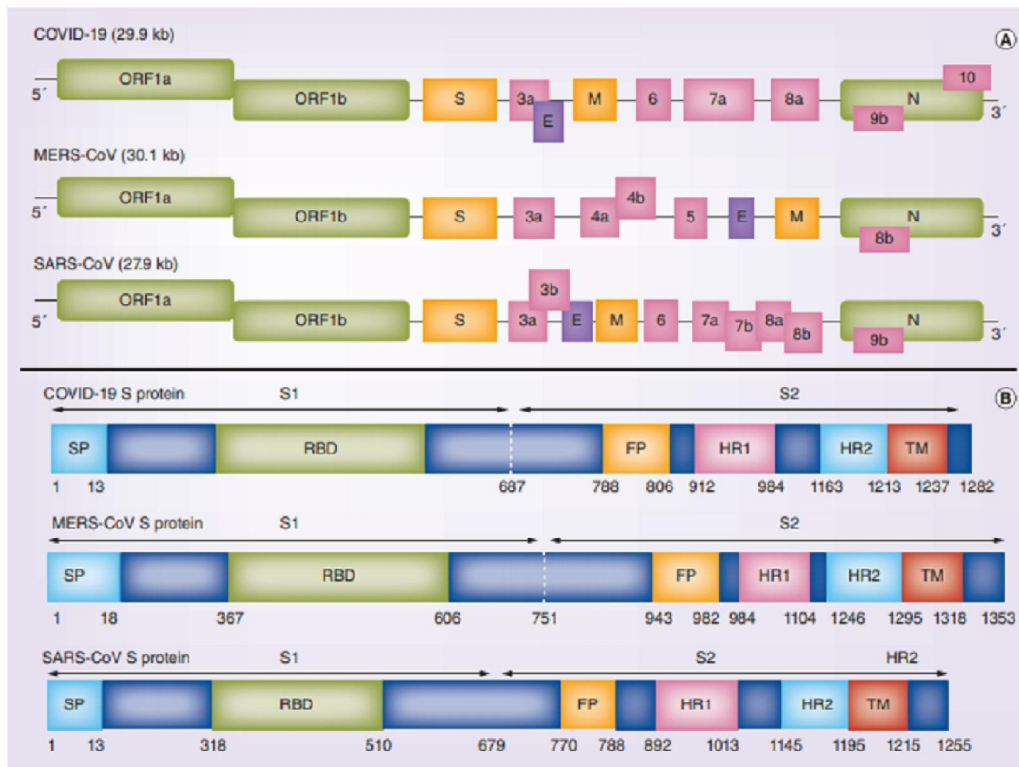


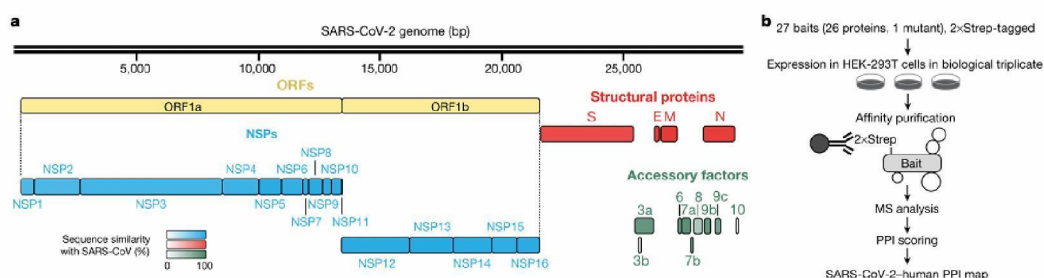
Figure 2. Genome organization of coronaviruses and spike protein.

(A) The coronavirus structure including the 5'-UTR, ORF 1a/b, structural proteins including S, E, membrane (M) and nucleocapsid (N) glycoproteins as well as several accessory proteins (such as orf 3, 6, 7a, 7b, 8 and 9b) and the 3'-UTR. (B) Comparison of the S proteins of SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. SP, receptor-binding domain, FP, HR1/2 and TD.

3'-UTR: 3'-untranslated region; 5'-UTR: 5'-untranslated region; COVID-19: Coronavirus disease 2019; E: Envelope; FP: Fusion peptide; HR1/2: Heptad repeat 1/2 MERS-CoV: Middle East respiratory syndrome-coronavirus; ORF: Open reading frame; S: Spike; SARS-CoV: Severe acute respiratory syndrome-coronavirus; SP: Signal peptide; TD: Transmembrane domain.

Gordon, D.E., Jang, G.M., Bouhaddou, M. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 583, 459–468 (2020).

5.1.2e

5.1.2e³¹

a, SARS-CoV-2 genome annotation. The colour intensity is proportional to the protein sequence similarity with SARS-CoV homologues (when homologues exist). $n = 4$ structural proteins; $n = 16$ NSPs; $n = 9$ accessory factors. **b**, Experimental workflow for AP-MS studies. MS, mass spectrometry; PPI, protein–protein interaction.

Sequence analysis of SARS-CoV-2 isolates suggests that the 30-kb genome encodes as many as 14 open-reading frames (ORFs). ORF1a and ORF1b encode polyproteins, which are auto-proteolytically processed into 16 non-structural proteins (NSP1–NSP16) that form the replicase–transcriptase complex (Fig. 1a). The replicase–transcriptase complex consists of multiple enzymes, including the papain-like protease (NSP3), the main protease (NSP5), the NSP7–NSP8 primase complex, the primary RNA-dependent RNA polymerase (NSP12), a helicase–triphosphatase (NSP13), an exoribonuclease (NSP14), an endonuclease (NSP15) and N7- and 2′O-methyltransferases (NSP10 and NSP16)^{1,12,13}. At the 3′ end of the viral genome, as many as 13 ORFs are expressed from 9 predicted sub-genomic RNAs. These include four structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N)¹³, and nine putative accessory factors^{1,12} (Fig. 1a). The SARS-CoV-2 genome is very similar to SARS-CoV.

3. Genetische informatie over het CDC SARS-CoV-2 detectie panel^{1,2}

Three primer-probe mixes for:

- 2019-nCoV_N1: targets virus nucleocapsid (N) gene for specific detection of SARS-CoV-2
- 2019-nCoV_N2: targets virus nucleocapsid (N) gene for specific detection of SARS-CoV-2
- RP: targets human RNase P gene for detection of human nucleic acids; control for sample integrity

2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time rRT-PCR Panel Primer and Probes				
Label Name	Description	Oligonucleotide Sequence (5'>3')	Label¹	Final Conc.
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 Forward Primer	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	None	500 nM
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	None	500 nM
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1	FAM, BHQ-1	125 nM
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	FAM-ACC CCG CAT /ZEN/ TAC GTT TGG TGG ACC-3IABkFQ	FAM, ZEN, 3IABkFQ	125 nM
2019-nCoV_N2-F	2019-nCoV_N2 Forward Primer	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA	None	500 nM
2019-nCoV_N2-R	2019-nCoV_N2 Reverse Primer	GCG CGA CAT TCC GAA GAA	None	500 nM
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1	FAM, BHQ-1	125 nM
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	FAM-ACA ATT TGC /ZEN/ CCC CAG CGC TTC AG-3IABkFQ	FAM, ZEN, 3IABkFQ	125 nM
RP-F	RNase P Forward Primer	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	None	500 nM
RP-R	RNase P Reverse Primer	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	None	500 nM
RP-P	RNase P Probe	FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1	FAM, BHQ-1	125 nM
RP-P	RNase P Probe	FAM-TTC TGA CCT /ZEN/ GAA GGC TCT GCG CG-3IABkFQ	FAM, ZEN, 3IABkFQ	125 nM

Referenties

- ¹ <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>
- ² <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>
- ³ <https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html>
- ⁴ Pardi, N., Hogan, M., Porter, F. et al. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 17, 261–279 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- ⁵ <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2022483>
- ⁶ Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy*. 1969;13:1-110. doi: 10.1159/000385919. PMID: 4186070.
- ⁷ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613179/>
- ⁸ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673620316044>
- ⁹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04535453?term=Ad26.COV2.S&draw=2>
- ¹⁰ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317300169>
- ¹¹ <https://www.rijksoverheid.nl/actueel/nieuws/2020/11/20/wachten-is-op-vaccin-maar-operatie-vaccinatie-al-in-volle-gang>
- ¹² <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/sanofi-gsk-sars-cov-2-vaccine>
- ¹³ <https://www.pharmaceutical-business-review.com/news/gsk-sanofi-covid-19/>
- ¹⁴ https://www.pmlive.com/pharma_news/sanofi,_gsk_delay_covid-19_vaccine_trial_after_underwhelming_results_in_elderly_participants_1359911
- ¹⁵ <https://www.france24.com/en/europe/20201211-sanofi-gsk-say-covid-19-vaccine-won-t-be-ready-until-late-2021>
- ¹⁶ <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- ¹⁷ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682204006567>
- ¹⁸ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7307180/pdf/JVI.00647-20.pdf>
- ¹⁹ <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-020-10140-5>
- ²⁰ <https://www.gezondheidsraad.nl/documenten/adviezen/2020/11/19/strategieen-voor-covid-19-vaccinatie>
- ²¹ <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa2034577?articleTools=true>
- ²² <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2820%2931604-4>
- ²³ <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.30.227470v1>
- ²⁴ <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2022483>
- ²⁵ <https://www.modernatx.com/patents>
- ²⁶ <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.09.20228551v1>
- ²⁷ <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.23.351775v1>
- ²⁸ [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30843-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30843-4/fulltext)
- ²⁹ <https://science.sciencemag.org/content/369/6499/77>
- ³⁰ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420306954?via%3Dihub>
- ³¹ <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.1096>
- ³² https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2005.16.1202?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft_dat=cr_pub++0pubmed&
- ³³ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10328106/>
- ³⁴ <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1349-7006.2009.01381.x#b5>