

Omicron SARS-CoV-2 Variant

- ▶ The constant need to rapidly identify new and emerging SARS-CoV-2 variants for clinical, epidemiological and research purposes necessitates vigilant and continuous development of new tools.
- ▶ Using wastewater to track community health has the advantage of providing information on an entire community without relying on individual clinical testing. Wastewater may be a leading indicator of community health when shedding by infectious individuals precedes symptom onset.

今回も、オミクロン関連の論文2つをご紹介します。

▶ NOVEL RT-qPCR ASSAYS ENABLE RAPID DETECTION AND DIFFERENTIATION BETWEEN SARS-COV-2 OMICRON (BA.1) AND BA.2 VARIANTS

SARS-COV-2 オミクロン (BA.1) と BA.2 変異体の迅速な検出と識別を可能にする新しい RT-qPCR アッセイの開発

筆者らは、SARS-CoV-2 オミクロンに対する特異的な反応を開発・検証しており、BA.1 と BA.2 変異体を同定することができたと報告しています。ここで示されているのは、BA.1 と BA.2 の両方に共通する変異、片方のみに存在する変異、それぞれに対応する定量 PCR 反応であり、反応を多重に組み合わせることで、BA.1、BA.2、または非オミクロン SARS-CoV-2 であることを 1 回の反応で同定できるとしています。

SARS-CoV-2 初期株と比べて感染性や病原性が増大していることから、新しく出現した亜種の拡散が公衆衛生に及ぼす影響は極めて重大であり、亜種を迅速に同定する必要性が常にあります。このアッセイは、臨床および環境サンプルの両方について BA.1 / BA.2 の 2 つの変異体を区別して識別でき、診断・疫学・研究という様々な観点における有用なツールとなり得ることを示唆しています。

Primers and probes used in this study.

Bold, underlined letters represent deliberate mismatch nucleotides that were inserted to increase specificity and minimize secondary structure formation.

Primer name	Sequence 5'→3'	Reference
SC-2 inclusive detection (E-sarbeco reaction)		
E_Sarbeco_F1b	GTTAATAGCGTACTTCTTTTCTTGC	Corman <i>et al.</i> ^a
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Corman <i>et al.</i>
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG	Corman <i>et al.</i>
BA.1 + BA.2 detection (N _{del} detection)		
28322 Fwd	TTTGGTGGACCCTCAGATTC	Erster <i>et al.</i> ^b
28424 Rev	CGCAGTATTATTGGGTAAACCTTG	Erster <i>et al.</i> ^b
28354 probe	FAM-CCAGAATGGTGGCGCGATC-BHQ1	Erster <i>et al.</i> ^b
BA.1 specific detection (S _{211del} reaction)		
22174 Fwd	GTTATTTAAAATATATTCTAAGCACACG	Erster <i>et al.</i> ^b
22248 Rev	TAAAGCCGAAAACCTTGAG	Erster <i>et al.</i> ^b
22206 probe	ATTATAGTGGTGAGCCAGAAGATCTCC	Erster <i>et al.</i> ^b
BA.2 specific detection 1 (S _{242del} reaction)		
21611Fwd	CTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTAT	This study
21699 Rev	GTCAGGCTAATAAACACCACGTG	This study
21637 probe	FAM-CCAGAACTCAATCATACACTAATCTTTC-BHQ1	This study
BA.2 specific detection 2 (Orf6 _{D61G} reaction)		
27345 Fwd	ATATTCTCAATTAGATGAAGAGC	This study
27370 Probe	FAM-CCAATGGAGATTCTCGAAACGAACATG-BHQ1	This study
27422 Rev	TCAGTGCCAAGAAAAGAATAAT	This study
Endogenous control (Human RNase P)		
Rnase P-Fwd	AGATTGGACCTGCGAGCG	CDC ^c
Rnase P-Rev	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	CDC ^c
Rnase P-P	Cy5-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ2	CDC ^c

^a The F1b primer was modified for better compatibility with multiplexing.

^bReference: doi.org/10.1101/2021.12.07.21267293

^chttps://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html.

Compositions of the multiplex assays used in this study.

The volume (μl) of each component and the stock and final concentrations of the primers and probes are indicated. For each probe, the fluorophore used is indicated. Conc. / Rxn: concentration per reaction. μl/ Rxn: μl per reaction.

E-sarbeco + N121del + S221del + RNaseP	Conc. / Rxn	μl/ Rxn	E-sarbeco + Orf6del	Conc. / Rxn	μl/ Rxn
SensiFast Probe One-Step		10	SensiFast Probe One-step		10
H ₂ O		1.55	H ₂ O		3.1
E-Sarbeco-F1b 40μM	500nM	0.25	E-Sarbeco-F1b 40μM	400nM	0.2
E-Sarbeco-R 40μM	500nM	0.25	E-Sarbeco-R 40μM	400nM	0.2
E-Sarbeco-P TexasRed 20μM	250nM	0.25	E-Sarbeco-P TXred 20μM	200nM	0.2
COV19_28322Fwd_F 40uM	600nM	0.3	CoV19_21611Fwd 40uM	600nM	0.3
COV19_28412 Rev 40uM	600nM	0.3	Cov19_21699 Rev 40uM	600nM	0.3
COV19_28354_P 20uM HEX	300nM	0.3	21637 Probe FAM 20uM	300nM	0.3
CoV19_21611Fwd 40uM	600nM	0.3	RNase inhibitor		0.2
Cov19_21699 Rev 40uM	600nM	0.3	RT-Enzyme SensiFast		0.2
21637 Probe FAM 20uM	300nM	0.3	RNA		5
RNasP-F	300nM	0.15	Total		20
RNasP-R	300nM	0.15			
RNasP-P / Cy-5	200nM	0.15			
RT-Enzyme SensiFast		0.25	E-sarbeco + S221del	Conc. / Rxn	μl/ Rxn
RNase inhibitor		0.2	SensiFast Probe One-step		10
RNA		5	H ₂ O		3.1
Total		20	E-Sarbeco-F1b 40μM	400nM	0.2
			E-Sarbeco-R 40μM	400nM	0.2
			E-Sarbeco-P TXred 20μM	200nM	0.2
			COV19_22174Fwd_F 40uM	600nM	0.3
			COV19_22248 Rev 40uM	600nM	0.3
			COV19_22206_P 20uM FAM	300nM	0.3
			RNase inhibitor		0.2
			RT-Enzyme SensiFast		0.2
			RNA		5
			Total		20

Erster, Oran, et al. "NOVEL RT-qPCR ASSAYS ENABLE RAPID DETECTION AND DIFFERENTIATION BETWEEN SARS-COV-2OMICRON (BA. 1) AND BA. 2 VARIANTS." medRxiv (2022).

(この論文は、22.4.20 現在、まだ査読が完了していません。)

▶ Detection of SARS-CoV-2 variant Mu, Beta, Gamma, Lambda, Delta, Alpha, and Omicron in wastewater settled solids using mutation-specific assays is associated with regional detection of variants in clinical samples

変異に特異的なアッセイを用いた下水沈殿物中の SARS-CoV-2 変異体ミュー、ベータ、ガンマ、ラムダ、デルタ、アルファおよびオミクロンの検出は、臨床サンプル中の変異体の地域検出と関連している

SARS-CoV-2 の VOC に特徴的な変異に対応するドロップレットデジタル RT-PCR アッセイを開発したという論文です。ここでは、下水試料中の変異を定量化しています。ここで行われた検証ではいくつかの制約があったとしていますが、下水中のバリエーション変異の測定値は、臨床データとよく相関しており、また、地域感染の割合とも関連していたことを報告しています。

感染症が発生した場合、患者の迅速な発見、発生範囲と時期の推定、感染拡大抑制に向けた介入が非常に重要であるため、下水のモニタリングが有用であるとしています。この手段により、個別の臨床検査に頼ることなく、地域社会全体に関する情報を得ることができます。SARS-CoV-2 の VOC は特に感染力が強く、ワクチンや薬剤の介入を回避する可能性があることから、公衆衛生対応が極めて重要であることを、筆者らは強調しています。

Target	Primer/Probe	Sequence
N Gene	Forward	CATTACGTTTGGTGGACCCT
	Reverse	CCTTGCCATGTTGAGTGAGA
	Probe	C CGCATCAAAACAACGTCGG (5' FAM/ZEN/3' IBFQ)
BcCoV	Forward	CTGGAAGTTGGTGGAGTT
	Reverse	ATTATCGGCCCTAACATACATC
	Probe	CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT (5' FAM/ZEN/3' IBFQ)
PMMoV	Forward	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA
	Reverse	TTGTCGGTTGCAATGCAAGT
	Probe	CCTACCGAAGCAAATG (5' HEX/ZEN/3' IBFQ)
HV69-70 (Alpha)	Forward	ACTCAGGACTTGTCTTACCT
	Reverse	TGGTAGGACAGGGTTATCAAAC
	Probe	ATGCTATCTCTGGGACCAAT (5' FAM or HEX/ZEN/3' IBFQ)
E484K/N501Y (Beta and Gamma)	Forward	CTGAAATCTATCAGCCCGGT
	Reverse	GTTGTAACCAACACCATAAG
	Probe	CACACCTTGAATGGTGTAAAGGTT (5' FAM or HEX/ZEN/3' IBFQ)
del156-157/R158G (Delta)	Forward	ATTCGAAGACCCAGTCCCTA
	Reverse	AGGTCCATAAGAAAAGGCTGA
	Probe	TGGATGGAAGTGGAGTTTATTCTAG (5' FAM or HEX/ZEN/3' IBFQ)
del256/257 (Mu)	Forward	CAAATTCACACAATCGACGGT
	Reverse	GTCGTCGTCGGTTCATCATA
	Probe	TCATCCGGAGTTATCCAGTAATGG(5' FAM or HEX/ZEN/3' IBFQ)
del247-253 (Lambda)	Forward	TCGGCTTTAGAACCATTGGT
	Reverse	TCAAGTGCACAGTCTACAGC
	Probe	TGCTTTACATAATTCTTCTCAGGTTGGAC(5' FAM or HEX/ZEN/3' IBFQ)
del143-145 (Omicron)	Forward	ATTCGAAGACCCAGTCCCTA
	Reverse	ACTCTGAACACTTTCCATCC
	Probe	TTGTAATGATCCATTTTGGACCACAA(5' FAM or HEX/ZEN/3' IBFQ)

Wolfe, Marlene, et al. "Detection of SARS-CoV-2 variant Mu, Beta, Gamma, Lambda, Delta, Alpha, and Omicron in wastewater settled solids using mutation-specific assays is associated with regional detection of variants in clinical samples." ASM Journals.