تأثیر میدان شعوری فرادرمانی بر سویه جهش یافته ویروس کرونا

محمدعلی طاهری[1]، لاله امانی[2]، سیمین شریفی[3]، احمد خلیلی[4]، علی زمان وزیری[4]، حسین کیوانی[5*]

* نویسنده مسئول: حسین کیوانی
ایمیل: Keyvanlab@yahoo.com

۱. بخش تحقیق و توسعه‌ی ساینسفکت، مرکز تحقیقات کازموانتل ، انتاریو، کانادا
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. مرکز تحقیقات زیست‌پزشکی سرطان، تهران، ایران
۵. گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

DOI:https://doi.org/10.61450/joci.FA.v1i1.77

چکیده

همه‌گیری کووید-۱۹ همچنان تهدیدی برای سلامت جهانی است. در اواخر سال ۲۰۲۰، ظهور سریع سویه‌های جهش‌یافته‌ی ویروس کرونا گزارش شد که نگرانی‌هایی را در پیشگیری و درمان بیماری کرونا ایجاد کرد. ویروس کرونا که جهش D614G را در پروتئین ویروس اسپایک رمزگذاری می کند در سراسر جهان غلبه پیدا کرد و این تغییر باعث افزایش انتقال ویروس شد. علاوه بر این، نتایج منفی کاذب از نمونه‌های تنفسی یکی از مشکلات تشخیص بیماری کرونا است. میدان‌های شعوری (TCFs) را محمدعلی طاهری معرفی کرده است. این میدان‌های جدید، انرژی یا ماده نیستند و نمی‌توانند به‌طور مستقیم مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گیرند. با این حال، می‌توان اثرات آن‌ها را به وسیله‌ی آزمایش‌های علمی استاندارد به‌طور غیرمستقیم ارزیابی کرد. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تاثیر میدان شعوری فرادرمانی به عنوان یکی از میدان های شعوری بر تیتر و تعداد نسخه‌ی RNA ویروس جهش‌یافته D614G و همچنین، کیفیت قطعات تکثیریافته‌ی ژنوم کروناویروس انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد میدان شعوری فرادرمانی تکثیر ویروس‌های غیرجهش‌یافته و جهش‌یافته و همچنین، replication fitness را در مقایسه با کنترل افزایش داد. میدان شعوری فرادرمانی سرعت تکثیر سویه‌ی جهش‌یافته را نزدیک به سویه‌ی غیرجهش‌یافته در سلول‌ها افزایش می‌داد و در واقع، سویه‌ی غیرجهش‌یافته را به تعادل و سازگاری بیولوژیکی مشابه سویه‌ی ووهان با سلول رسانید. این مطالعه نشان می‌دهد فرادرمانی به عنوان تعدیل‌کننده عمل کرده و نرخ تکثیر بین سویه‌های جهش‌یافته و غیرجهش‌یافته را برابر کرده و در نتیجه به تعادل بیولوژیکی مشابه سویه‌ی ووهان دست یافته است. از نظر علمی، این موضوع بحث‌برانگیز است و زیست‌شناسی مولکولی مرسوم را به چالش می‌کشد و نیازمند مطالعات دقیق است. علاوه بر این، قطعات ژنوم کروناویروس در محصولات PCR تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی باندهای مشخص‌تر و با کیفیت‌تری در الکتروفورز ژل در مقایسه با شاهد داشتند. این نتیجه نشان می‌دهد میدان شعوری فرادرمانی می‌تواند در سنجش‌های تشخیصی استفاده شود تا تعداد نتایج منفی کاذب به حداقل برسد و حساسیت آزمایش‌های تشخیصی افزایش یابد. براساس نتایج به دست آمده توصیه می شود اثرات میدان‌های شعوری بر جهش‌یافته‌های دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: کووید-۱۹، T-Consciousness، میدان‌های شعوری طاهری، میدان شعوری فرادرمانی، سویه‌ی جهش‌یافته، RT-PCR

مقدمه

ویـروس کرونـا (SARS-CoV-2) نوعـی ویـروس RNAدار اسـت و فرآینـد تکثیـر ایـن ویروس‌هـا بـه دلیـل عـدم وجـود سـازوکار ترمیـم عدم تطابـق، بـا میـزان جهـش بالایـی همـراه اسـت. از ایـن رو، جهش‌هـای ویـروس کرونـا کامـلا قابـل پیش‌بینـی و منطقـی اسـت. ویـروس ممکـن اسـت بـه دلیـل جهش‌هـا مسـری‌تر و از بیـن بـردن آن دشـوار شـود [۱]. کوربـر و همکارانـش نـوع D614G (اسـید آمینـه در موقعیـت ۶۱۴ از اسـید آسـپارتیک بـه گلیسـین جهـش یافتـه اسـت) ویـروس کرونـا را شناسـایی کردنـد کـه مسـری‌تر بـوده، بـر سراسـر جهـان غلبـه یافتـه اسـت [۲، ۳]. در حـال حاضـر، سـایر سـویه‌های جدیـد در سراسـر جهـان به‌سـرعت در حـال گسـترش‌اند و نگرانـی هایـی در مـورد پیشـگیری و درمـان بیمـاری کرونـا ایجـاد کرده‌انـد. تحقیقـات اخیـر نشـان داده‌انـد صرفـا آن جهش‌هایـی کـه عملکردهـای مهـم بیولوژیکـی دارنـد، قابلیـت انتقـال بـالا را از خـود نشـان می‌دهنـد کـه ایـن امـر حاکـی از آن اسـت کـه ایـن جهش‌هـای کلیـدی ممکـن اسـت بـر شـدت بیمـاری کرونـا، انتشـار ویـروس و فـرار از سیسـتم ایمنـی طبیعـی یـا القاشـده بـه وسـیله‌ی واکسـن تاثیـر بگـذارد [۴]. ویـروس کرونـا بـا اتصـال بـه آنزیـم تبدیل‌کننـده‌ی آنژیوتانسـین (ACE2) بـه وسـیله‌ی گیرنـده RBD پروتئیـن اسـپایک، سـلول‌های انسـانی را آلـوده می‌کنـد. بـه نظـر می‌رسـد ایـن جهش‌هـای کلیـدی بـر توانایـی اتصـال بـه ACE2 تاثیـر می‌گـذارد [۵].

واکسیناسـیون در سراسـر جهـان بـه عنـوان اسـتراتژی‌ای اساسـی بـرای مبـارزه بـا بیمـاری کرونـا انجـام می‌شـود. بـا ایـن حـال، بـا ظهـور انـواع جهش‌یافتـه‌ی ویـروس کرونـا، اثربخشـی واکسـن‌ها بـه موضـوع اصلـی بحث‌هـای جهانـی تبدیـل شـده اسـت. مطالعـات اخیـر نشـان داد انـواع جهش‌یافتـه‌ی ویـروس کرونـا به‌طـور قابـل توجهـی بـر اثرگـذاری واکسـن‌ها تاثیـر می‌گـذارد [۴].

تشـخیص بیمـاری کرونـا بـا ردیابـی RNA ویـروس از طریـق real-time RT PCR انجـام می‌شـود. بـر نتایـج منفـی کاذب از نمونه‌هـای تنفسـی ویـروس کرونـا مطالعـات متنوعـی انجـام شـده اسـت و میـزان نتایـج منفـی کاذب را بیـن ۱ تـا ۳۰ درصـد گـزارش کرده‌انـد [۶، ۷]. نتایـج منفـی کاذب می‌توانـد بـه دلایـل گوناگونـی ماننـد جمع‌آوری غیربهینـه‌ی نمونه‌هـا، حساسـیت تحلیلـی پاییـن، تسـت زودهنـگام بیمـاری، نـوع نامناسـب نمونـه، تغییرپذیـری در میـزان رهاسـازی ویـروس یـا لـود ویروسـی پاییـن رخ دهـد [۸– ۱۱]. بـا توجـه بـه فوریـت کنتـرل بیمـاری کرونـا، یافتـن راه جدیـد بـرای کنتـرل جهـش و عفونـت و کاهـش مـوارد منفـی کاذب در تشـخیص آن ضـروری اسـت.

ایـن مطالعـه بـه بررسـی اثـرات میدان‌هـای شـعوری(ط) پرداختـه اسـت. بـر اسـاس نظریـه‌ی طاهـری، ایـن میدان‌هـا ماهیتـی غیرفرکانسـی دارنـد و زیرمجموعـه‌ی شـبکه‌ی شـعور کیهانـی هسـتند و امـکان این‌کـه اثـرات آن‌هـا را بـر موضوعـات متنوعـی اعـم از موجـودات زنـده و مـواد بررسـی کنیـم، وجـود دارد [۱۲]. مـا در تحقیقـات پیشـین، شـاهد تاثیـرات میدان‌هـای شـعوری بـر سـلول سـرطانی MCF7 [۱۳]، حافظـه ی فضایـی و رفتـار اجتنابـی مـدل مـوش صحرایـی بـا بیمـاری آلزایمـر [۱۴]، گیـاه گنـدم [۱۵]، رشـد جمعیـت باکتریایـی [۱۶] و فعالیـت الکتریکـی مغـز در طـول مـدت انجـام فرادرمانـی در میـان جمعیـت فرادرمانگرهـا [۱۷] بودیـم. در مطالعـه‌ی حاضـر، اثـر میـدان شـعوری فرادرمانـی بـه عنـوان یکـی از میدان‌هـای شـعوری(ط) بـر تکثیـر، تیتـر و تعـداد نسـخه‌های RNA ویـروس کرونـای D614G ارزیابـی شـد. همچنیـن، تاثیـر میـدان شـعوری فرادرمانـی بـر میـزان و کیفیـت تکثیـر قطعـات ژنـوم کروناویـروس در قطعـات ژنـوم کروناویـروس مـورد بررسـی قـرار گرفـت.

مواد و روش‌ها

روش استفاده از میدان شعوری فرادرمانی

نمونه‌هـای مـورد مطالعـه بـر اسـاس دسـتورالعمل ارائه‌شـده در وب‌سـایت مدیریـت تحقیقـات در حـوزه‌ی میدان‌هـای شـعوری تحـت تاثیـر میدان‌هـای شـعوری قـرار گرفتنـد. جزییـات بیش‌تـر در بخـش ملاحظـات مشـترک ایـن شـماره ارائـه شـده اسـت. در مطالعـه‌ی حاضـر، فرادرمانـی هم‌زمـان بـا تلقیـح ویـروس در فلاسـک‌های کشـت سـلولی در گروه‌هـای تیمـار اعـلام شـد.

آماده‌سازی سویه‌های جهش‌یافته و غیرجهش‌یافته

بـرای مطالعـه‌ی فعلـی، سـویه‌های غیرجهش‌یافتـه مشـابه سـویه‌ی اصلـی ووهـان و سـویه‌ی جهش‌یافتـه بـا جهـش D614G در پروتئیـن اسـپایک ویـروس مـورد اسـتفاده قـرار گرفتنـد. سـویه‌های ذکرشـده از نمونه‌هـای بیمارسـتانی نازوفارنکـس و حلق‌وبینـی بیمـاران بسـتری در بخـش مراقبت‌هـای ویـژه در مرحلـه‌ی حـاد بیمـاری بـا نتایـج مثبـت RT-PCR real-time بـا مقادیـر Ct ۱۳و ۱۲ جـدا شـدند.

کشت سلولی و تیتراسیون ویروس

فلاسـک‌های T-25 بـا سـلول‌های Vero بـه تعـداد ۵ ×۱۰^{۶} در محیـط کشـت DMEM گلوکـز بـالا (Gibco) بـا ۱۰٪ سـرم جنیـن گاوی (Gibco) و در ۵٪ CO_2 در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سـانتی‌گراد و تـا رسـیدن بـه کانفلونسـی ۸۰٪ کشـت داده شـدند. سـپس بـه پنـج گـروه بـا شـش فلاسـک بـرای ارزیابـی ویـروس جهش‌یافتـه و ویـروس غیرجهش‌یافتـه بـا و بـدون تیمـار بـا میـدان شـعوری فرادرمانـی و کنتـرل منفـی (بـدون ویـروس) تقسـیم شـدند. کشـت‌های سـلولی بـرای تلقیـح ویـروس پـس از رسـیدن بـه کانفلونسـی ۷۰٪ آمـاده شـد. بـرای همـه‌ی بررسـی‌های مربـوط بـه ویـروس از آزمایشـگاه سـطح ایمنـی ۳ (BSL-3) اسـتفاده شـد [۱۸]. کشـت ویـروس بـا TCID50/ml~log 6 بـرای تلقیـح بـه فلاسـک‌ها انتخـاب شـد. TCID50/ml در پلیت‌هـای ۹۶ خانـه ارزیابـی شـد و همـه‌ی پلیت‌هـا هـر ۲۴ سـاعت از نظـر CPE (اثـر سـیتوپاتیک) تحـت نظـر قـرار گرفتنـد و نتایـج پـس از چهارروز گـزارش و محاسـبه‌ی تیتـر ویـروس بـا روش Read & Munch انجـام شـد [۱۹].

real-time RT-PCR برای ارزیابی تعداد کپی RNA ویروس کرونا

از کیـت LabPrep ™ Viral DNA/RNA Mini بـر اسـاس دسـتورالعمل شـرکت سـازنده بـرای اسـتخراج RNA اسـتفاده شـد. از کیـت SinaClone بـرای سـنتز cDNA اسـتفاده شـد. همـه‌ی مراحـل بـا ابزارهـا و محلول‌هـای بـدون RNase انجـام شـد. همچنیـن، بـرای سـاخت cDNA بـا غلظـت یکسـان در هـر نمونـه بـا توجـه بـه

1. Pyramidal cells

2. Alternating current

غلظـت RNA، حجمـی در نظـر گرفتـه شـد کـه مقـدار ۱۰۰۰ نانوگـرم RNA در آن وجـود داشـت و بـا آب و مسـتر میکـس، حجـم نهایـی بـه ۲۰ میکرولیتـر رسـانیده شـد. بـرای انجـام real time PCR از کیـت Biotechrabbit GmbH اسـتفاده شـد. بـا توجـه بـه دسـتورالعمل و مـواد، تعـداد کپـی RNA بـا اسـتفاده از پرایمرهـای ژن نوکلئوکپسـید N مـورد ارزیابـی قـرار گرفـت. از ترموسـیکلر Rotor-Gene-Q 6000 (Corbett ، اسـترالیا) بـرای انجـام کلیـه‌ی واکنش‌هـای real-time RT-PCR اسـتفاده شـد.

RT-PCR و الکتروفـورز محصـولات PCR قطعـات پروتئینـی S ویـروس جهش‌یافتـه‌ی کرونـا

بـرای شـش نمونـه‌ی مثبـت انتخاب‌شـده بـه وسـیله‌ی real-time PCR و بـا Ct ۱۳ کـه RNA آن‌هـا اسـتخراج و cDNA آن‌هـا قبـلا سـاخته شـده بـود، سـه جفـت آغازگـر بـه نـام B27 ، B26 و B28 بـرای قسـمت‌های مختلـف پروتئیـن اسـپایک S1، آزمایـش PCR انجـام شـد (جـدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای PCR پروتئین اسپایک S1

Primer number	Sequence of primer (5' to 3')	Length	Annealing temp (°C)	Target protein	Ref
B26	F: TATCTTGGCAAACCACGCGA R: ACCAGCTGTCCAACCTGAAG	1057	58	Spike	(20)
B27	F: CCCTCAGGGTTTTTCGGCTT R: CTGTGGATCACGGACAGCAT	1093	60	Spike	(20)
B28	F: CCAGCAACTGTTTGTGGACC R: GTGGCAAAACAGTAAGGCCG	1027	60	Spike	(20)

محصـولات PCR روی ژل الکتروفـورز آگارز ۱٪ در بافـر TBE حـاوی تریس‌بیـس، اسـید بوریـک، EDTA و اتیدیـوم بروماید بـا pH = 8 ران شـدند. بـرای الکتروفـورز، محصـولات بـا ولتـاژ ۹۰ ولـت بـه مـدت ۵۵ دقیقـه بـا اسـتفاده از DNA 100 bp (آلمـان ، Fermentas) بـه عنـوان نشـان‌گر مـورد ارزیابـی قـرار گرفتنـد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌هـا بـا اسـتفاده از نرم‌افـزار SPSS (نسـخه‌ی ۲۶) تجزیه‌وتحلیـل شـدند. سـطح معنـاداری آمـاری $p>0.05$ در نظـر گرفتـه شـد کـه معـادل سـطح اطمینـان ۹۵% اسـت. داده‌هـای ارزیابـی تیتـر ویـروس و real-time RT-PCR بـا آنالیـز واریانـس دوطرفـه بـرای ارزیابـی تجزیه‌وتحلیـل شـدند.

نتایج

میـدان شـعوری فرادرمانـی تکثیـر ویروس‌هـای غیرجهش‌یافتـه و جهش‌یافتـه را در مقایسـه بـا کنتـرل افزایـش داد ($p<0.05$). عـلاوه بـر ایـن، میـدان شـعوری فرادرمانـی میـزان تکثیـر سـویه‌ی جهش‌یافتـه را نزدیـک بـه سـویه‌ی غیرجهش‌یافتـه در سـلول‌ها افزایـش داد. تیتـر ویـروس از ۳×۱۰^{۷} در گـروه کنتـرل ویـروس جهش‌یافتـه بـه $۲\times۱۰^{۷/۲}$ (تقریبـا $۳/۱۷\times۱۰^{۷}$) در گـروه ویـروس جهش‌یافتـه تحـت تیمـار بـا میـدان شـعوری فرادرمانـی افزایـش یافـت. امـا ایـن افزایـش از نظـر آمـاری معنـادار نبـود ($p>0.05$). همچنیـن، میـدان شـعوری فرادرمانـی زمـان لازم بـرای تخریـب و مـرگ سـلولی را افزایـش داد (جـدول ۲).

جـدول ۲. تیتـر ویـروس جهش‌یافتـه و غیرجهش‌یافتـه‌ی کرونـا تحـت تاثیـر میـدان شـعوری فرادرمانـی (FCF) و گروه‌هـای کنتـرل. همـه‌ی شـرایط بـه جـز سـویه‌های ویـروس، بـرای هـر دو گـروه میـدان شـعوری فرادرمانـی یکسـان بـود.

	Inoculum (Seed)	Non-mutated control	Mutated control	Non-mutated virus+ FCF	Mutated Virus+ FCF	Cell culture (Cell control)
TCID50/mL	1×10^{6}	$2\times10^{6.5}$	3×10^{7}	$2\times10^{7.2}$	$2\times10^{7.2}$	-
Ct Value in real-time RT-PCR	14	11	9	8	8	-

در نتایج real-time PCR ، تعداد نسخه‌ی RNA گروه کنترل غیرجهش‌یافته نسبت به گروه غیرجهش‌یافته تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی با تفاوت سه Ct تغییر یافت ($p<0.05$). همچنین در گروه جهش یافته، این تفاوت بین کنترل جهش‌یافته و جهش‌یافته تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی با اختلاف یک Ct تغییر یافت که از نظر اماری معنادار نبود ($p>0.05$).

برای بررسی تاثیر میدان شعوری فرادرمانی بر کیفیت و میزان تکثیر قطعات ژنوم کروناویروس، PCR بر سه قطعه‌ی مهم ژن اسپایک ویروس کرونا که مسئول اتصال به سلول است، انجام شد. سپس ژل الکتروفورز بر محصولات PCR انجام شد. نمونه‌های تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با کنترل باندهای مشخص‌تری داشتند که ممکن است نشان‌دهنده‌ی تاثیر فرادرمانی بر کیفیت تکثیر در PCR باشد. برای اثبات این فرض نیاز به انجام آزمایش‌های تکمیلی است.

بحث

جایگزینی D614G روی گلیکوپروتئین اسپایک در سویه‌ی اولیه‌ی ووهان، تکثیر ویروس را افزایش داد [۲۱]. پلانت و همکارانش (۲۰۲۱) اهمیت سویه‌ی G614 را در انتشار ویروس و پیامدهای آن در اثربخشی واکسن‌ها و درمان با آنتی‌بادی‌ها نشان دادند. ویروس G614 بیش از ویروس اصلی D614 در بافت‌های تنفسی فوقانی انسان و در رده‌ی سلولی اپیتلیال مسیر تنفسی انسان (Calu-3) تکثیر شد. افزایش تناسب تکثیر با افزایش پایداری و عفونی‌بودن ویروس G614 همراه بود [۲۱]. مقدار بیش‌تری از RNA ویروسی در بیماران آلوده به سویه‌ی جهش‌یافته‌ی D614G وجود دارد و این جهش‌یافته نسبت به سویه‌ی اصلی ووهان عفونی‌تر است [۳]. اوزونو و همکاران نشان دادند جهش D614G باعث افزایش ورود ویروس ناشی از افزایش میل اتصال به ACE2 بدون تاثیر بر اثر آنتی‌ژنی پروتئین S می‌شود [۲۲].

این مطالعه نشان داد میدان شعوری فرادرمانی، تکثیر ویروس‌های غیرجهش‌یافته و جهش‌یافته در مقایسه با گروه بدون تیمار با فرادرمانی و تناسب تکثیر آن‌ها را افزایش داده و ویروسْ کنترل بیش‌تری بر ماشین تکثیر سلولی به دست آورده است. به نظر می‌رسد میدان شعوری فرادرمانی سرعت تکثیر سویه‌ی جهش‌یافته را نزدیک به سویه‌ی غیرجهش‌یافته در سلول‌ها افزایش می‌دهد و در واقع مشابه سویه‌ی ووهان آن را به تعادل بیولوژیکی سازگاری با سلول می‌رساند. به منظور روشن‌شدن اثرات این تیمار، توصیه می‌کنیم تاثیر میدان‌های شعوری بر مدل‌های حیوانی با عفونت ویروسی جهش‌یافته و غیرجهش‌یافته ارزیابی شود.

نتایج منفی کاذب، پیامدهای حیاتی‌ای برای تشخیص و خطر انتقال و مدیریت بیماری کرونا دارد [۲۳]. با توجه به نتایج تاثیر میدان شعوری فرادرمانی بر RT-PCR ژنوم جهش‌یافته‌ی کروناویروس، ممکن است این میدان مراحل مختلف PCR را (مانند اتصال پرایمر، تکثیر و حرکت در الکتروفورز) بهبود بخشد. بر اساس نتایج، ممکن است میدان شعوری فرادرمانی نقش موثری در فرآیندهای PCR قطعات ویروس داشته باشد و می‌تواند در افزایش دقت تست‌های آزمایشگاهی و کاهش نتایج منفی کاذب مفید باشد.

همان‌طور که گفته شد، میدان‌های شعوری(ط) قابل اندازه‌گیری نیستند اما می‌توان اثرات آن‌ها را به‌طور غیرمستقیم به وسیله‌ی آزمایش‌های گوناگون بررسی کرد. پیشنهاد می‌کنیم جهش‌های دیگر ویروس بیماری کرونا برای مطالعه‌ی تاثیر میدان شعوری فرادرمانی بر موفقیت ایمن‌سازی و واکسیناسیون به‌صورت *in vivo* بررسی شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در آزمایشگاه تخصصی ویروس‌شناسی کیوان (KVSL) در تهران انجام شده است. ما از اعضای این آزمایشگاه برای کمک در انجام آزمایش‌ها تشکر می‌کنیم.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی اعلام نکردند.

منابع

1. Domingo, E., & Holland, J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology, 51*(1), 151–178. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151

2. Hou, Y. J., Chiba, S., Halfmann, P., Ehre, C., Kuroda, M., Dinnon, K. H., Leist, S. R., Schäfer, A., Nakajima, N., Takahashi, K., ... Baric, R. S. (2020). SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. *Science, 370*(6523), 1464–1468. https://doi.org/10.1126/science.abe8499

3. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., ... COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium. (2020). Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: Evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell, 182*(4), 812–827.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043

4. Zhou, W., & Wang, W. (2021). Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: Challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines. *Signal Transduction and Targeted Therapy, 6*(1), 1–6. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00644-x

5. Starr, T. N., Greaney, A. J., Hilton, S. K., Ellis, D., Crawford, K. H. D., Dingens, A. S., Navarro, M. J., Bowen, J. E., Tortorici, M. A., Walls, A. C., ... Bloom, J. D. (2020). Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell, 182*(5), 1295–1310. e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012

6. Long, D. R., Gombar, S., Hogan, C. A., Greninger, A. L., Shah, V. O. R., Bryson-Cahn, C., Stevens, B., Rustagi, A., Jerome, K. R., & Kong, C. S. (2020). Occurrence and timing of subsequent SARS-CoV-2 RT-PCR positivity among initially negative patients. *medRxiv, 2020-05. https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089151*

7. Arevalo-Rodriguez, I., Buitrago-Garcia, D., Simancas-Racines, D., Zambrano-Achig, P., Del Campo, R., Ciapponi, A., Sued, O., Martinez-Garcia, L., Rutjes, A. W., & Low, N. (2020). False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One, 15*(12), e0242958. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242958

8. Kinloch, N. N., Ritchie, G., Brumme, C. J., Dong, W., Lawson, T., Jones, R. B., Montaner, J. S., Leung, V., & Romney, M. G. (2020). Suboptimal biological sampling as a probable cause of false-negative COVID-19 diagnostic test results. *The Journal of Infectious Diseases, 222*(6), 899–902. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa370

9. Kucirka, L. M., Lauer, S. A., Laeyendecker, O., Boon, D., & Lessler, J. (2020). Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction–based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *Annals of Internal Medicine, 173*(4), 262–267. https://doi.org/10.7326/M20-1495

10. Kanji, J. N., Zelyas, N., MacDonald, C., Pabbaraju, K., Khan, M. N., Prasad, A., Hu, J., Diggle, M., Berenger, B. M., & Tipples, G. (2021). False negative rate of COVID-19 PCR testing: A discordant testing analysis. *Virology Journal, 18*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/s12985-021-01489-0

11. Pan, Y., Long, L., Zhang, D., Yuan, T., Cui, S., Yang, P., Wang, Q., & Ren, S. (2020). Potential false-negative nucleic acid testing results for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads. *Clinical Chemistry, 66*(6), 794–801. https://doi.org/10.1186/s12985-021-01489-0

12. Taheri, M. A. (2013). *Human from another outlook* (2nd ed.). Interuniversal Press. ISBN: 9781939507006

13. Taheri, M. A., Semsarha, F., Mahdavi, M., Afsartala, Z., & Amani, L. (2020). The influence of the Faradarmani Consciousness Field on the survival and death of MCF-7 breast cancer cells: An optimization perspective. *SSRN Electronic Journal.* https://doi.org/10.2139/ssrn.3705537

14. Taheri, M. A., Torabi, S., Nabavi, N., & Semsarha, F. (2021). Influence of Faradarmani consciousness field (FCF) on spatial memory and passive avoidance behavior of scopolamine model of Alzheimer disease in male Wistar rats. SSRN Electronic Journal. https://doi.org/10.2139/ssrn.3761188.

15. Torabi, S., Taheri, M. A., & Semsarha, F. (2020). Alleviative effects of Faradarmani Consciousness Field on *Triticum aestivum* L. under salinity stress. *F1000Research, 9*, 1089. https://doi.org/10.12688/f1000research.25247.4.

16. Taheri, M. A., Zarrini, G., Torabi, S., Nabavi, N., & Semsarha, F. (2021). Influence of Faradarmani Consciousness Field on bacterial population growth. *bioRxiv.* https://doi.org/10.1101/2021.01.08.426007

17. Taheri, M. A., Semsarha, F., & Modarresi-Asem, F. (2020). An investigation on the electrical activity of the brain during Faradarmani connection in the Fara-therapist population. *SSRN Electronic Journal. https://doi.org/10.20944/preprints202009.0679.v1.*

18. World Health Organization. (2020, February 12). *Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): Interim guidance.* WHO. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2020.1

19. Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology, 27*(3), 493–497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

20. Ren, L.-L., Wang, Y.-M., Wu, Z.-Q., Xiang, Z.-C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y.-Z., Xiong, Y., Li, Y.-J., Li, X.-W., ... Chen, H. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in humans: A descriptive study. *Chinese Medical Journal, 133*(9), 1015–1024. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722

21. Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., Lokugamage, K. G., Zhang, X., Muruato, A. E., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., ... Shi, P. Y. (2021). Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature, 592*(7852), 116–121. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3

22. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T. S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., & Iwatani, Y. (2021). SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nature Communications, 12*(1), 848. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21118-2

23. West, C. P., Montori, V. M., & Sampathkumar, P. (2020). COVID-19 testing: The threat of false-negative results. *Mayo Clinic Proceedings, 95*(6), 1127–1129. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.04.004