යුරෝසර්වේලන්ස් -2020 කෝර්මන් - ඩ්‍රෝස්ටන් පත්‍රිකාව පිළිබඳ බාහිර විමර්ශන වාර්තාවේ සම්පූර්ණ සිංහල පරිවර්තනය

SARS-CoV-2 හඳුනාගැනීම සඳහා වන RT-PCR පරීක්ෂණයේ සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල ලැබීමට හේතුවන මොලිකියුල සහ පරීක්ෂණාත්මක විධික්‍රමයට අදාළ ප්‍රධාන දෝෂ 10 ක්

පීටර් බෝර්ගර්
බොබී රාජේෂ් මල්හෝත්‍රා
මයිකල් යීඩන්
ක්ලෙයාර් ක්‍රේග්
කෙවින් මැක්කර්නන්
ක්ලාවුස් ස්ටෙගර්
පෝල් මැක්ෂී
ලිදියා ඇන්ගලෝවා
ෆේබියෝ ෆ්රැන්කි
තෝමස් බින්ඩර්
හෙන්රික් උල්රිච්
මකෝටෝ ඔහාෂි
ස්ටෙෆාන් ෂෝග්ලියෝ
මයොලයින් ෆ්‍රුස්බර්ග් -වැන් ක්ලේෆන්ස්
ඩොරතියා ගිල්බර්ට්
රයිනර් ක්ලෙමන්ට්
රූත් ෂ්රූෆර්
බෙයර්බර් ඩබ්ලිව්. පීක්ස්මා
යාන් බොන්ටේ
බෲනෝ එච්. ඩැල් කාබෝර්න
කෙවින් පී. කෝර්බර්ට්
උල්රික කේමරර්

පරිවර්තනය-අජිත් සී හේරත්

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව පිළිබඳ මෙම විමර්ශනයට සහභාගි වූ විශේෂඥයෝ

1) Dr. Pieter Borger (MSc, PhD), Molecular Genetics, W+W Research Associate, Lörrach, Germany

2) Rajesh Kumar Malhotra Former 3D Artist / Scientific Visualizations at CeMM – Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences (2019-2020), University for Applied Arts – Department for Digital Arts Vienna, Austria

3) Dr. Michael Yeadon BSs(Hons) Biochem Tox U Surrey, PhD Pharmacology U Surrey. Managing Director, Yeadon Consulting Ltd, former Pfizer Chief Scientist, United Kingdom

4) Dr. Clare Craig MA, (Cantab) BM, BCh (Oxon), FRCPath, United Kingdom

5) Kevin McKernan, BS Emory University, Chief Scientific Officer, founder Medical Genomics, engineered the sequencing pipeline at WIBR/MIT for the Human Genome Project, Invented and developed the SOLiD sequencer, awarded patents related to PCR, DNA Isolation and Sequencing, USA

6) Prof. Dr. Klaus Steger, Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Molecular Andrology, Biomedical Research Center of the Justus Liebig University, Giessen, Germany

7) Dr. Paul McSheehy (BSc, PhD), Biochemist & Industry Pharmacologist, Loerrach, Germany

8) Dr. Lidiya Angelova, MSc in Biology, PhD in Microbiology, Former researcher at the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Maryland, USA

9) Dr. Fabio Franchi, Former Dirigente Medico (M.D) in an Infectious Disease Ward, specialized in “Infectious Diseases” and “Hygiene and Preventive Medicine”, Società Scientifica per il Principio di Precauzione (SSPP), Italy

10) Dr. med. Thomas Binder, Internist and Cardiologist (FMH), Switzerland

11) Prof. Dr. med. Henrik Ullrich, specialist Diagnostic Radiology, Chief Medical Doctor at the Center for Radiology of Collm Oschatz-Hospital, Germany

12) Prof. Dr. Makoto Ohashi, Professor emeritus, PhD in Microbiology and Immunology, Tokushima University, Japan

13) Dr. Stefano Scoglio, B.Sc. Ph.D., Microbiologist, Nutritionist, Italy

14) Dr. Marjolein Doesburg-van Kleffens (MSc, PhD), specialist in Laboratory Medicine (clinical chemistry), Maasziekenhuis Pantein, Beugen, The Netherlands

15) Dr. Dorothea Gilbert (MSc, PhD), PhD Environmental Chemistry and Toxicology. DGI Consulting Services, Oslo, Norway

16) Dr. Rainer J. Klement, PhD. Department of Radiation Oncology, Leopoldina Hospital Schweinfurt, Germany

17) Dr. Ruth Schruefer, PhD, human genetics/ immunology, Munich, Germany,

18) Dra. Berber W. Pieksma, General Practitioner, The Netherlands

19) Drs. Jan Bonte (GJ), Consultant Neurologist, The Netherlands

20) Dr. Bruno H. Dalle Carbonare (Molecular biologist), IP specialist, BDC Basel, Switzerland

21) Dr. Kevin P. Corbett, MSc Nursing (Kings College London) PhD (London South Bank) Social Sciences (Science & Technology Studies) London, England, United Kingdom

22) Prof. Dr. Ulrike Kämmerer, specialist in Virology / Immunology / Human Biology / Cell Biology, University Hospital Würzburg, Germany

පටුන

හැඳින්වීම...1
සංක්ෂිප්ත විමර්ශන වාර්තාව..2
1. ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ
2. සියලු ප්‍රතික්‍රියාවන් සිදුවන්නා වූ උෂ්ණත්ව :
3. බහුගුණන චක්‍ර සංඛ්‍යාව
4. මොලිකියුල ජෛව විද්‍යාත්මක වලංගුකරණය ;
5. වෛරසයක් නිර්ණය කිරීමේදී යොදාගනු ලබන පොසිටිව් සහ නෙගටිව් පාලක
6. ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් ක්‍රියාපරිපාටිය

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ සැළකිල්ලට ගත යුතු වෙනත් සුළු දෝෂ....................................4

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ ප්‍රධාන දෝෂ..5

A) පසුබිම...5
B) විධික්‍රම සහ ප්‍රතිඵල...5
1. ප්‍රයිමර් සහ ප්‍රෝබ සැලසුම (Primer & Probe)..5
1a) සාවද්‍ය ප්‍රයිමර් සාන්ද්‍රණ...5
1b) නිශ්චය නොකරන ලද අස්ථායි ප්‍රයිමර් සහ ප්‍රෝබ අනුක්‍රම.............................5
1c) දෝෂ සහගත GC-අන්තර්ගතය 8
1d) වෛරස ජාන හඳුනාගැනීම 8

2. ප්‍රතික්‍රියාවන්ට අදාල උෂ්ණත්ව...10
2a) DNA ද්‍රවක උෂ්ණත්වය (melting temperature) (>92°)...........................10
2b) DNA සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය..10
2c) දෝෂ සහගත GC-අන්තර්ගතය සහ Tm...10

3. බහුගුණක චක්‍ර සංඛ්‍යාව (The number of amplification cycles)..............................12

4. ජීව මොලිකියුල වලංගුකරණය (Biomolecular validations)....................................15

5. පොසිටිව් සහ නෙගටිව් පාලක පරීක්ෂණ (Positive and negative controls)...............15

6. ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් නොපැවතීම (Standard Operational Procedure-SOP)......16

7. 1 සිට 5 දක්වා සිරස්තල යටතේ විස්තර කරන ලද
දෝෂවල විපාක : සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල..17

8. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව ප්‍රතිවිමර්ශනයකට ලක් කර නැත.................................18
The Corman-Drosten paper was not peer-reviewed

9. කර්තෘවරුන්ම සංස්කාරකයන් බවට පත්වීම...18

10.පත්‍රිකාව තුළ හමු වූ දෝෂ පිළිබඳ සංක්ෂිප්ත විස්තරය...19

නිගමනය...20

උපකාරක සටහන්...21
පාරිභාෂික ශබ්දමාලාව..28

හැඳින්වීම

"යථාකාලීන RT-PCR පරීක්ෂණය මගින් 2019 කොරෝනා වෛරසය හඳුනා ගැනීම ("Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR)" යන තේමාව යටතේ Eurosurveillance - 25 (8) 2020 විසින් ප්‍රසිද්ධ කරන ලද වාර්තාවක් මගින් 2019-nCoV (දැන් SARS-CoV-2 හැඳින්වෙන) හඳුනාගැනීම ගැනීම සහ නිර්ණය කිරීම සඳහා එම පත්‍රිකාවේ කතුවරුන් විසින් නිර්ණ ක්‍රියා දාමය සහ RT-qPCR ප්‍රොටොකෝලය ඉදිරිපත් කරනු ලැබේ. මෙය එම කටයුත්තේදී අදාළ පොදු සෞඛ්‍ය පිළිබඳ විද්‍යාගාර සැකසුම් සඳහා ඉතා යෝග්‍ය සහ නිවැරදි ක්‍රමවේදයක් බව ඔවුහු පවසා සිටිති.

මෙම පත්‍රිකාවේ බලපෑම ලෝකය පුරා සියලු සමාජ මත එල්ලවී ඇති වාතාවරණය තුළ ස්වාධීන පර්යේෂකයන් කණ්ඩායමක් විසින් එහි කරුණු එකින් එක නැවත විමර්ශනය කර ඇත.
මෙම ස්වාධීන පර්යේෂ කයන් විසින්
1). ඉදිරිපත් කර ඇති මෙම පර්යේෂණ සැළසුමේ සියළු සංරචකයන් නැවත විමර්ශනයකට ලක් කර ඇත.
2). මනා පරීක්ෂණාගාර භාවිතයකට අදාළව RT-qPCR ප්‍රොටෝකෝලය ඇගයීමකට ලක් කර ඇත.
3). මෙම ක්ෂේත්‍රයට අදාළ විද්‍යාත්මක ලේඛන මගින් එහි පරාමිතීන් පරීක්ෂා කර ඇත.

2019-nCoV හඳුනාගැනීම සහ නිශ්චය කිරීම සඳහා යැයි කියන RT-qPCR ප්‍රොටෝකෝලයේ එළිදක්වා ඇති පිටපතේ මෙන් ම අත්පිටපතේද තාක්ෂණික සහ විද්‍යාත්මක දෝෂයන් ගණනාවක් පවතී. ප්‍රයිමර් සැලසුමේ අප්‍රමාණවත් බව, ගැටළු සහගත සහ අප්‍රමාණවත් RT-qPCR ප්‍රොටෝකෝලය, පරීක්ෂණය පිළිබඳ නිරවද්‍ය ඇගයීමක් නොවීම, පරීක්ෂණය පිළිබඳ ප්‍රකාශයට පත්කළ ලේඛනය හෝ එහි අත්පිටපත් පිළිගත හැකි විද්‍යාත්මක ලේඛනයක් විසින් සම්පූර්ණ කළයුතු අවශ්‍යතා සම්පූර්ණ කිරීමට අසමත්වීම ආදිය මෙන්ම ඉතා බැරෑරුම් ලෙස සැළකිල්ලට ගත යුතු කරුණක් වන කතුවරුන් සම්බන්ධයෙන් මතුවන " අවශ්‍යතා පිළිබඳ ගැටුම්" පිළිබඳ කිසිදු සඳහනක් නොවීම, අවසාන වශයෙන් ලේඛනය ඉදිරිපත් කර පැය 24 ක් වැනි ඉතා කෙටිකලක් තුළ එයට අනුමැතිය හිමිවීම විසින් පෙන්නුම් කරන්නේ විධිමත් ඇගයීමක් සහ ප්‍රතිවිමර්ශනයක් එය සම්බන්ධයෙන් සිදු නොවීම හෝ එවැන්නක් සිදුව ඇත්නම් එය ඉතා පහල මට්ටමක පැවතීම ආදියයි. මෙම විද්‍යාත්මක අසම්පූර්ණතාවන්, දෝෂ සහ අඩුපාඩු පිළිබඳ බරපතල සාක්ෂි අපි ඉදිරිපත් කරමු.

අප විසින් මෙහිලා ඉදිරිපත් කරනු ලබන විද්‍යාත්මක සහ විධික්‍රම දෝෂයන් සැළකිල්ලට ගන්නා විට Eurosurveillance සංස්කාරක මණ්ඩලයට මෙම පත්‍රිකාව ඉවත්කරගැනීම හැරෙන්නට වෙනත් විකල්පයක් නැති බව අප තුළ දැඩි විශ්වාසයක් පවතී.

පීටර් බෝර්ගර්, බොබී රාජේෂ් මල්හෝත්‍රා, මයිකල් යීඩන්, ක්ලෙයාර් ක්‍රේග්, කෙවින් මැක්කර්නන්, ක්ලාවුස් ස්ටෙගර් පෝල් මැක්ෂීහයි, ලිදියා ඇන්ගලෝවා, ෆේබියෝ ෆ්‍රැන්කි, තෝමස් බින්ඩර්, හෙන්රික් උල්රිච්, මකෝටෝ ඔහාෂි, ස්ටෙෆාන් ෂෝග්ලියෝ, මයොලයින් ඩූස්බර්ග්- වැන් ක්ලේෆන්ස්, ඩොරතියා ගිල්බර්ට්, රයිනර් ක්ලෙමන්ට්, රූත් ෂ්‍රූෆර්, බෙයර්බර් ඩබ්ලිව්. පීක්ස්මා, යාන් බොන්ටේ, බෘනෝ එච්. ඩැල් කාබෝර්න, කෙවින් පී. කෝර්බර්ට්, උල්රික කේමරර්

සංක්ෂිප්ත විමර්ශන වාර්තාව

මෙම පත්‍රිකාව විසින් ලෝකය පුරා SARS-CoV-2 වෛරසය හා සම්බන්ධ ආසාදනයන් හා ඒ මගින් ඇති කරන COVID-19 රෝගය පිළිබඳව සාවද්‍ය රෝග විනිශ්චයයන්ට හේතු වූ කෝර්මන්-ඩ්‍රෝස්ටන් පත්‍රිකාව (Corman-Drosten paper) තුළ පවතින බරපතල දෝෂ විශාල සංඛ්‍යාවක් පෙන්නුම් කරනු ලැබේ. බොහෝ ජනතාවන්ගේ ජීවනෝපායයන් විනාශ කරමින් සිටින, අධ්‍යාපන අවස්ථා සීමා කරමින් සිටින, දැඩි "ලොක් ඩවුන් " වලට අපි මුහුණ දෙමින් සිටිමු. එමෙන්ම ආණ්ඩු විසින් පනවා ඇති සීමාවන් ජනතාවගේ මූලික අයිතීන්ට සහ පුද්ගල නිදහසට එල්ල කර ඇති සෘජු ලෙස ප්‍රහාර එල්ල කරමින් සිටින අතර එම සීමා පැනවීම්වල ප්‍රතිඵලයක් ලෙස ගෝලීය පරිමාණයෙන් ආර්ථිකයන්ට හානි සිදුවෙමින් පවතී.

කොර්මන්- ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ ඇති බරපතල ගැටළු 10 ක් පිළිබඳව අපි පහත පරිච්ඡේදයන් තුළ සවිස්තාරාත්මකව පැහැදිලි කරමු.

පළමු සහ ප්‍රධානතම ගැටළුව වන්නේ SARS-CoV-2 නව කොරෝනා වෛරසය (පත්‍රිකාවේ සඳහන් වනුයේ 2019-nCoV ලෙසින් වන අතර 2020 පෙබරවාරි මාසයේදී වෛරස් පිළිබඳ විශේෂඥයන්ගේ ජාත්‍යන්තර සාමූහිකයක් විසින් SARS-CoV-2 නම් කරන ලද වෛරසය) පදනම් වනුයේ චීන විද්‍යාගාරයක් විසින් (1) සපයන ලද පරිගණක ඇසුරෙන් නිපදවන ලද (in silico) සෛද්ධාන්තික ජානමය අනුක්‍රමය මතය. මක්නිසාදයත් යත් ඒ වනවිට පාලක නිදර්ශක අමුද්‍රව්‍ය (ආසාදනයට ලක් ජීවමාන පුද්ගලයෙකු) හෝ අක්‍රිය SARS-CoV-2 වෛරසයක් හෝ වෙන්කරගන්නා ලද SARS-CoV-2 වෛරසයේ ගෙනෝම RNA හෝ කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ කතුවරුන් සතුව නොපැවති හෙයිනි. වෙන් කර හඳුනාගත් SARS-CoV-2 වෛරසයේ සම්පූර්ණ RNA දාමය ඉදිරිපත් කිරීම මගින් සිය පත්‍රිකාවට වලංගුබවක් ලබාදීමට මේ දක්වාම කෝර්මන්-ඩ්‍රෝස්ටන් පත්‍රිකාවේ නිර්මාතෘවරුන් විසින් අසමත්ව ඇත.

කෝර්මන් සහ අනෙකුත් කතුවරුන්ට අනුව,

> *"වෛරසයේ අන්තර්ගත ද්‍රව්‍ය නොමැතිවම මහජන සෞඛ්‍ය විද්‍යාගාර සැකසුම් තුළ ඉතා නිරවද්‍ය නිශ්චය ක්‍රමවේදයක් සංවර්ධනය කර භාවිතයේ යෙදවීම අපගේ අරමුණ විය."*

ඉහත ප්‍රකාශකරන ලද අරමුණු දෙක පිළිබඳව මෙහි ලා කේන්ද්‍රීය අවධානය යොමු විය යුතුය.
එනම් මහජන සෞඛ්‍ය සැකසුම් තුළ භාවිතාවේ යෙදිය හැකි රෝග නිශ්චය පරීක්ෂණයක්
a) සංවර්ධනය සහ
b) භාවිතයේ යෙදවීම යන අරමුණු පිළිබඳවය.
සැබෑ වෛරසයේ අන්තර්ගතය නොමැතිව මෙම අරමුණු සාක්ෂාත් කරගත නොහැකිය.(උදාහරණයක් ලෙස ආසාදකාරක වෛරස් භාරය- viral load තීරණය කිරීම).

මෙම පරිමාණයේ සිදුවීම්වලදී, කවර තත්ත්වයක් මත වුව,අනිවාර්ය සහ මූලික ඉලක්කය විය යුත්තේ උපරිම නිරවද්‍යතාවකින් යුතු ප්‍රොටෝකෝලයක් පමණි. අවධි වෛරස් භාරය (Critical viral load) නිර්ණය කිරීම අනිවාර්ය තොරතුරක් වන අතර ඊට අදාළ පරීක්ෂණ සිදු කිරීම සහ තීරණාත්මක වැදගත් දත්ත සැපයීම ක්‍රිස්ටියන් ඩ්‍රොස්ටන් සහ කණ්ඩායමේ වගකීමකි.

කෙසේ වුවද මෙම පරිගණක ආශ්‍රයෙන් නිර්මිත ජාන අනුක්‍රම කලින් සඳහන් කළ වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා වන RT-PCR පරීක්ෂණ ක්‍රමවේදය සංවර්ධනය කිරීම සඳහා යොදාගෙන ඇත. මෙම පරීක්ෂණ ආකෘතිය පදනම් වී ඇත්තේ මෙම නව වෛරසය 2003 වසරේ SARS-CoV වෛරසයට බොහෝ සෙයින් සමානය යන අනුමානය මතය. මක් නිසාදයත් මෙම වෛරස් දෙකම බීටා - කොරෝනා වෛරස් (beta-coronavirus) ලෙස සළකන බැවිනි. ඒ අනුව PCR පරීක්ෂණය සැලසුම් කර ඇත්තේ, Sarbeco සංරචක සඳහා 2003- SARS-CoV වෛරසයේ ජාන ගෙනෝමය පාලක පරීක්ෂණ ද්‍රව්‍ය (control material) ලෙස යොදාගනිමිනි. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ සම කර්තෘවරුන්ගෙන් එක් අයෙකු සමග අප විසින් සිදු කළ පුද්ගලික ඊ-මේල් සන්නිවේදනයක් මගින් අපි මේ බව දනිමු. SARS-CoV-2 ආකෘතිය ගොඩ නැංවීමේ මෙම විධික්‍රමය කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ විස්තර වනුයේ මෙලෙසය.

> ***"2019-nCoV** නිවාරක පිරික්සුම් **(screening)** සහ විශේෂිත තහවුරු කිරීම සඳහා වන නිර්ණ ක්‍රියාදාමයක් ස්ථාපනය කිරීම සහ වලංගුකරණය සැලසුම් කරන ලද්දේ රෝගීන් වෙතින් ඒකලනය **(isolate)** කරන ලද සැබෑ වෛරස් නිදර්ශකවලින් තොරවය. සැලසුම සහ වලංගුකරණය සිදුකිරීමේ හැකියාව ලැබුණේ **2003-SARS-CoV** වෛරසය සමග වන ඉතා සමීප ජානමය සම්බන්ධය නිසා වන අතර, කෘත්‍රිම නියුක්ලික් අම්ල තාක්ෂණය ඊට ආධාර පිණිස යොදා ගන්නා ලදී."*

ප්‍රතිවර්ත පිටපත් පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction - RT-PCR) කලින් දන්නා විරල RNA කොටස් ක්ෂණිකව හඳුනාගැනීමට භාවිතා කෙරෙන ඉතා වැදගත් ජීව මොලිකියුල තාක්ෂණයකි. පළමු පියවරේදී නියැදිය තුළ ඇති RNA මොලිකියුල වල ප්‍රතිවර්ත පිටපත් නිර්මාණය කරනු ලැබේ. ඒ එමගින් cDNA (අනුපූරක ඩිඔක්සිරයිබෝනියුක්ලික් අම්ල හෙවත් complementary DNA) නිර්මාණය කරනු සඳහාය. අනතුරුව පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව තුළ දී විශේෂිත ප්‍රයිමර් යුගලයක් (primer) සහ තාපස්ථායී DNA පොලිමරේස් එන්සයිමයක් මගින් cDNA බහුගුණනය කරනු ලැබේ. මෙම තාක්ෂණය අධි සංවේදී එකක් වන අතර එහි නිර්ණ සීමාව සෛද්ධාන්තිකව ගත් කළ එක් cDNA මොලිකියුලයකි. PCR ප්‍රතික්‍රියාවේ විශේෂිතතාව වනුයේ ජීව මොලිකියුල සැලසුම් දෝෂ විසින් එය මත සිදු කරනු ලබන ඉහල බලපෑමයි.

කෝර්මන්-ඩ්‍රෝස්ටන් ප්‍රකාශිත පත්‍රිකාව මගින් විස්තර කරන RT-PCR පරීක්ෂණය සහ quantitative RT-qPCR පරීක්ෂණය සැලසුම් කිරීමේදී වැදගත් වන්නේ කුමක් ද?

1. ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ

a) ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබවල සාන්ද්‍රණය ප්‍රශස්ත සීමාවේ පැවතිය යුතුය.(100-200 nM)

b) ප්‍රයිමර සහ සුපරීක්ෂක ඔබට බහුගුණනය කිරීමට අවශ්‍ය ඉලක්ක-ජානය සඳහා විශේෂිත ඒවා විය යුතුය

c) GC (ග්වානින් සහ සයිටෝසීන්) අන්තර්ගතය සමස්ත නයිට්‍රෝජනික භස්ම අනුපාතයට සාපේක්ෂව ප්‍රශස්ත මට්ටමක පැවතිය යුතුය.(අවමය 40% සිට උපරිමය 60% අතර)

d) වෛරසය නිර්ණය කිරීම සඳහා අවම වශයෙන් ප්‍රයිමර් යුගල 3 ක් විසින් වෛරස ජාන 3 ක් හඳුනාගත යුතුය (මෙම වෛරස් ජාන 3 වෛරස් ගෙනෝමය තුළ හැකිතාක් එකිනෙකින් ඈත්ව පිහිටි ඒවා විය යුතුය)

2. සියලු ප්‍රතික්‍රියාවන් සිදුවන්නා වූ උෂ්ණත්ව :

a) DNA ද්‍රවක උෂ්ණත්වය (>92°)

b) DNA බහුගුණක උෂ්ණත්වය (TaqPol සඳහා විශේෂිත)

c) Tm; සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය (ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ විසින් සිය ඉලක්කය සමග බන්ධනය සිදු කෙරෙන උෂ්ණත්වය, ප්‍රයිමර යුගල සඳහා 2 °C නොඉක්මවිය යුතුය.). ප්‍රයිමර වල GC අන්තර්ගතය මත Tm දැඩිව රඳා පවතී.

3. බහුගුණන චක්‍ර සංඛ්‍යාව (35 ට අඩු ; 25-30 අතර වඩාත් සුදුසුය) ;

වෛරස නිර්ණයේදී 35 ට වැඩි චක්‍ර සංඛ්‍යාවක් විසින් හඳුනාගනු ලබන්නේ, සෛල රෝපිතය (cell culture) තුළ ඒකලනය කිරීම මගින් වෙන්කර හඳුනාගත් ආසාදක වෛරසය හා සම්බන්ධයක් නැති සංඥාවන් පමණි.[2 හිදී විමර්ශනය කරන ලද] ; බහුගුණන චක්‍ර සංඛ්‍යාව 35 හෝ ඊට වැඩි PCR පරීක්ෂණයක් (යුරෝපයේ සහ එක්සත් ජනපදයේ බොහෝ විද්‍යාගාරවල සිදුවන පරිදි) මගින් පොසිටිව් ලෙස නම් කරන ලද පුද්ගලයෙකු සැබැවින්ම ආසාදනය වූ පුද්ගලයෙකු වීමට ඇත්තේ 3%ක ඉඩකි. ඉහත සඳහන් කරන ලද පරීක්ෂණයේ පුද්ගලයා සාවද්‍ය ලෙස පොසිටිව් ලෙස නම් කිරීමට ඇති ඉඩ 97%කට වැඩිය. [3 හිදී විමර්ශනය කරන ලද]

4. මොලිකියුල ජෛව විද්‍යාත්මක වලංගුකරණය ;

බහුගුණනය කරන ලද PCR නිෂ්පාදන ජෙලි සහිත DNA පාලක තුළ හෝ ඍජුවම DNA දාම සමග ප්‍රතික්‍රියා සිදුවීමට සැළැස්වීම මගින් වලංගුකරණයට ලක් කළයුතුය.

5. නිශ්චිත වෛරසයක් නිර්ණය කිරීමේදී එය තහවුරු කිරීම හෝ ප්‍රතික්ෂේප කිරීම සඳහා යොදාගනු ලබන පොසිටිව් සහ නෙගටිව් පාලක නිශ්චිත විය යුතුය.

6. ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් ක්‍රියාපරිපාටියක් (Standard Operational Procedure-SOP) පැවතිය යුතුය.

ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් ක්‍රියාපරිපාටියක් විසින් ඉහත පරාමිතීන් නිශ්චිත ලෙස අර්ථකතනය කරයි. එමගින් සියළු විද්‍යාගාරවලදී එක් හා සමාන පරීක්ෂණ තත්ත්වයන් සැලසුම් කිරීමට හැකියාව ලැබේ. වලංගු විශ්වීය ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් ක්‍රියා පරිපාටියක් අනිවාර්‍ය සාධකයකි. මක් නිසාද යත් එමගින් එක් එක් රටවලින් ලැබෙන දත්ත සන්සන්දනයට හැකියාව ලැබෙන බැවිනි.

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ සැළකිල්ලට ගත යුතු වෙනත් සුළු දෝෂ

1.කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ අංක **වගුව 1** දී වෙනස් කෙටි යෙදුම් භාවිතා කර ඇත. “nM” යන්න අර්ථ දක්වා ඇති අතර “nm” යන්න අර්ථ දක්වා නැත. නිවැරදි නාමකරණයේදී nm යන්නෙන් අදහස්වනුයේ “nanometer” යන්නය. එහෙයින් මෙහිදී nm යන්න nM ලෙස කියැවිය යුතු වේ.

2. ජාන දාම ලිවීමේදී සෑම විටෙකම 5’-3’ දිශාවට ලිවීම පිළිගත් ක්‍රමයයි. ප්‍රතිවර්තා ප්‍රයිමරවලට ද එය අදාළ වේ. ප්‍රයිමර් දාමවල ප්‍රතිවර්ත අනුපූරක පෙළගැස්ම කතුවරුන් විසින් කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ **2 වැනි රූපයේ** දී ලියා ඇති අන්දමට ලිවීම ඉතා අසාමාන්‍ය දෙයකි. මෙයට අමතරව අස්ථායි හස්ම “y” යනුවෙන් සළකුණු කර ඇත්තේ Y යන්න අර්ථකතනය කිරීමකින් තොරවය.

3. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ ඇති තවත් නොමග යවන සුළු වැරදි දෙකක් නම් ඔවුන්ගේ පළමු වගුවේ Tm අගයන් (annealing-temperature values- Tm-values) සහ GC අගයන් ඇතුළු කර නොතිබීමය. (දාමවල ග්වානින්-G සහ සයිටෝසීන්- C සංඛ්‍යාව සමස්ත හස්මවල ප්‍රතිශතයක් ලෙස දැක්වීම).

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ ප්‍රධාන දෝෂ

A) පසුබිම

කතුවරුන් විසින් සිය විද්‍යාත්මක කෘතියේ පසුබිම හඳුන්වා දී ඇත්තේ මෙලෙසය :

" මෑතකදී මතුව පැතිර යන නව කොරෝනා වෛරසය (2019-nCoV) පොදු සෞඛ්‍ය විද්‍යාගාරවලට අභියෝගයක් එල්ල කර ඇත්තේ වෛරස ඒකලන (virus isolates) නොපවතින අතරතුර ආරම්භයේදී සිතුවාට වඩා බොහෝසෙයින් වෛරසය ව්‍යාප්තව ඇති බවට සාක්ෂි විශාල වශයෙන් ලැබෙමින් පැවතීමද සංචාරකයන් මගින් ජාත්‍යන්තරව සිදුවන ව්‍යාප්තියද හේතුවෙනි"

BBC News සේවයට [4] සහ ගූගල් සංඛ්‍යා ලේඛනවලට [5] අනුව 2020 ජනවාරි 21 වනවිට ලෝකය පුරා පුද්ගලයන් 6 දෙනෙකු පමණක් මරණයට පත් වී තිබිණි. එම දිනය වනාහි මෙම පත්‍රිකාව මුල් පිටපත් භාරදුන් දිනයයි. ඒ වනවිට මෙම වසංගතය ආරම්භයේදී සිතුවාට වඩා බෙහෙවින් ව්‍යාප්ත වී ඇති බවට හඳුනාගැනීම සඳහා කිසිදු ද්‍රව්‍යමය සාක්ෂියක් නොපැවති තත්ත්වය තුළ එය පොදු සෞඛ්‍ය විද්‍යාගාරවලට අභියෝගයක් බවට කතුවරුන් විසින් අනුමාන කරනු ලැබුවේ මන්ද?

පත්‍රිකාවේ අරමුණ ලෙස කතුවරුන් විසින් ප්‍රකාශ කර ඇත්තේ වෛරස් (සාම්පල) නොමැති තත්ත්වයක් තුළ පොදු සෞඛ්‍ය විද්‍යාගාර සැකසුම් සඳහා නිරවද්‍ය සහ කාර්යක්ෂම නිර්ණ ක්‍රමවේදයක් සංවර්ධනය කිරීම සහ භාවිතයේ යෙදවීමයි.
"ඉදිරිපත් කර ඇති අධ්‍යයනය විසින් පෙන්නුම් කරනු ලබන්නේ ජාතික සහ යුරෝපීය පර්යේෂණ ජාලයන් තුළ ශාස්ත්‍රාලීය සහ පොදු විද්‍යාගාරවල සම්බන්ධීකරණය මගින් පෙන්නුම් කරන ලද අසීමාන්තික ප්‍රතිචාර ශක්‍යතාව යි " යනුවෙන් ඔවුහු වැඩිදුරටත් සඳහන් කර ඇත.

B) විධික්‍රම සහ ප්‍රතිඵල

1. ප්‍රයිමර් සහ ප්‍රෝබ සැලසුම (Primer & Probe)

1a) සාවද්‍ය ප්‍රයිමර් සාන්ද්‍රණ

විශ්වාසනීය සහ නිරවද්‍ය PCR පරීක්ෂණ ප්‍රොටෝකෝල සාමාන්‍යයෙන් සැලසුම් කරන්නේ ප්‍රයිමර් සඳහා 100 nM සහ 200 nM අතර සාන්ද්‍රණ අගයන් යොදාගනිමිනි. [7]. කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ අපට නිරීක්ෂණය කළ හැකි වූයේ අසාමාන්‍ය ලෙස ඉහළ අගයන් සහිත සහ සමහර ප්‍රයිමර සඳහා වෙනස් ප්‍රයිමර් සාන්ද්‍රණයන්ය. **(වගුව 1)**

RdRp_SARSr-F සහ RdRp_SARSr-R ප්‍රයිමර යුගල සඳහා පිළිවෙළින් 600 nM සහ 800 nM යොදා ඇත. ඒ හා සමානවම N_Sarbeco_F සහ N_Sarbeco_R primer ප්‍රයිමර සඳහා ඔවුහු පිළිවෙළින් 600 nM සහ 800nM නිර්දේශ කර ඇත. [1].

ඉලක්ක කරන ලද ජානවල නිශ්චිත බහුගුණනයන් සඳහා අවශ්‍ය ප්‍රශස්ත මට්ටමට වඩා මෙම සාන්ද්‍රණයන් ඉතා ඉහළ අගයක් ගන්නා බව පැහැදිලි විය යුතුය. මෙම ප්‍රොටෝකෝලය තුළ ප්‍රයිමර් සඳහා මෙම අධි සාන්ද්‍රණයන් යොදාගැනීම ගැන කිසිදු විශේෂිත හේතුවක් ඉදිරිපත් කර නැත. එහෙත් මෙම අධි සාන්ද්‍රණයන් විසින් නිශ්චය කළ නොහැකි PCR නිෂ්පාදන බහුගුණනයටද බන්ධන ඇති කිරීමට ද හේතු වනු ඇත.

1b) නිශ්චය නොකරන ලද අස්ථායි ප්‍රයිමර් සහ ප්‍රෝබ අනුක්‍රම

නැවත නිෂ්පාදනය කළ හැකි සහ සන්සන්දනය කළ හැකි ප්‍රතිඵල ලබාගනු සඳහා ප්‍රයිමර යුගල ඉතා පැහැදිලිව සහ නිශ්චිතව අර්ථකතනය කිරීම අනිවාර්යය. කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ   R, W, M සහ S යන අකුරුවලින් සඳහන් **(වගුව 2)** නිශ්චය නොකරන ලද ස්ථාන 6 ක් ඇති බව අපි නිරීක්ෂණය කළෙමු. W අකුරෙන් අදහස් වන්නේ එම ස්ථානයේ A හෝ T තිබිය හැකි බවද ; R අකුරෙන් සංකේතවත් වන්නේ එම ස්ථානයේ එක්කෝ G හෝ A තිබිය හැකි බවද ; M අකුරෙන් සංකේතවත් වන්නේ එම ස්ථානයේ එක්කෝ A හෝ C තිබිය හැකි බවද ; S අකුරෙන් අදහස් වන්නේ එම ස්ථානයේ G හෝ G තිබිය හැකි බවද ආදි වශයෙනි.

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence[a]	Concentration[b]
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRP_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

[a] W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.
[b] Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

වගුව 1: ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ - (කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවෙන් උපුටා ගැනුණි.)
සාවද්‍ය ප්‍රයිමර් සාන්ද්‍රණ සළකුණු කර ඇත.

ප්‍රභේද වල මෙම ඉහළ සංඛ්‍යාවන් අසාමාන්‍ය වනවා පමණක් නොව විද්‍යාගාර තුළ භාවිතයේදී අපැහැදිලි ගැටළුකාරී තත්ත්වයන් මතු කිරීමට ද හේතු වේ. මෙහි දක්වා ඇති නිශ්චය නොකරන ලද ස්ථාන 6 විසින්, SARS-CoV-2 (විශේෂිත RdRp_SARSr_F ප්‍රයිමර 2 + විශේෂිත RdRp_SARS_P1 ප්‍රෝබ 8 + විශේෂිත RdRp_SARSr_R 4) වලට කිසිදු සම්බන්ධයක් නැති වෙනස් විකල්ප ප්‍රයිමර් දාමයන් සැකසීමට හේතු විය හැකිය. මෙම සැලසුම් විචල්‍යයන් විසින් SARS CoV-2 වෛරසයට කිසිදු සම්බන්ධයක් නැති ප්‍රතිඵල ලබාදීම වැලැක්විය නොහැකි දෙයක් බවට පත්වනු ඇත. කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ මෙම අපැහැදිලි අවිනිශ්චිත විස්තරකිරීම් ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් ප්‍රොටෝකෝලයක් සඳහා නොගැලපෙයි. මෙම අවිනිශ්චිත ස්ථාන නිරවුල් ලෙස දැක්විය යුතුව තිබිණි. මෙම අස්ථායි ජාන අනුක්‍රම විසින් දැනටමත් ක්ෂේත්‍රය තුළ සැළකිල්ලට ලක් වූ කරුණක් වී ඇති අතර විස්තර කර ඇති දාම වල පවතින මේ ඉතා පැහැදිලි වැරදි පිළිබඳව සංස්කාරකවරයා වෙත පිලොනෙල් සහ කණ්ඩායම [8] විසින් ලිපියක් යවා ඇත. මෙම දෝෂ කෝර්මන් සහ කණ්ඩායම විසින් ඉදිරිපත් කර ඇති අතිරේකයේද අන්තර්ගත වේ.

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence[a]	Concentration[b]
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRP_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

[a] W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.
[b] Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

වගුව 2: ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ- (කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවෙන් උපුටා ගැනුණි.)
ප්‍රයිමර් වල ඇති නිශ්චය නොකරන ලද අස්ථායි නියුක්ලියෝටයිඩ සළකුණු කර ඇත

කෝර්මන්-ඩ්‍රෝස්ටන් පත්‍රිකාව ඇසුරෙන් නිර්මාණය කරන ලද ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානයේ ප්‍රොටෝකෝලය (රූපය 1) විසින් , SARS-CoV-2 පවත්නා බවට තහවුරු කිරීම සඳහා පාලක ජාන (control genes)දෙකක් එනම් එනම් E සහ RdRp යන ජාන දෙක පරීක්ෂණය තුළදී හඳුනාගත යුතුයැයි නිගමනය කර තිබේ.

මෙහිදී අවධානයට යොමු විය යුත්තේ RdRd ජානයේ පූර්වගාමී ප්‍රයිමරයේ (forward-primer)නිශ්චය නොකරන ලද ස්ථාන 1 ක්ද ("අස්ථායි") එනම් (R=G/A) ද, අපරගාමී ප්‍රයිමරයේ (reverse-primer) නිශ්චය නොකරන ලද ස්ථාන 2 ක් ද එනම් R=G/A; සහ S=G/C ද පවතින අතර RdRp ප්‍රෝබයේ නිශ්චය නොකරන ලද ස්ථාන 3 ක්ද එනම් W=A/T; R=G/A; සහ M=A/C යනාදි වශයෙන් පවතින බවය. මේ අනුව එකිනෙකට වෙනස් පූර්වගාමී-ප්‍රයිමර 2 ක් ද, එකිනෙකට වෙනස් අපරගාමී ප්‍රයිමර 4 ක්ද සහ වෙනස් ප්‍රෝබ 8 ක්ද RdRd ජානය සඳහා සංශ්ලේෂණය වීමේ හැකියාව පවතී. මෙහි සමස්තයක් ලෙස ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ වල සංයෝග 64 ක් නිර්මාණය වීමේ සම්භාවිතාවක් පවතී.

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් වැඩිදුරටත් තුන්වන ජානයක්ද හඳුන්වා දෙයි. ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානයේ ප්‍රොටෝකෝලයට අනුව මෙම ජානය වැඩිදුර ඇගයීමට ලක් කර නැති අතර අනවශ්‍ය එකක් ලෙසින් සලකා ඇති බව පෙනී යයි.

"N ජාන පරීක්ෂණයද හොඳින් ක්‍රියාත්මක වූ නමුත් එහි සංවේදීතාව අඩු හෙයින් එය වැඩිදුර ඇගයීමට භාජනය නොවිණි."

මෙය අවාසානාවන්ත ඉවත් කිරීමක් වන්නේ තහවුරුකාරක පරීක්ෂණ සඳහා සමස්ත ජාන ත්‍රිත්වයෙහිම පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාවන් (PCR) යොදාගැනීම වඩාත් යහපත් වන්නට ඉඩ තිබූ බැවිනි. එසේ වූයේ නම් වෛරසයේ RNA හඳුනාගැනීම සඳහා පූර්ණ වශයෙන් යෝග්‍ය නිශ්චය මෙවලම් ප්‍රොටොකෝලයක් එහි ප්‍රතිඵලය ලෙස ලැබෙන්නට ඉඩ තිබිණි. ත්‍රිත්ව-අවධි තහවුරුකාරක පරීක්ෂණ විසින් අඩු තරමින් "අස්ථායි ස්ථාන"("Wobbly"-spots) වලට අදාළව දෝෂ සහ අවිනිශ්චිතතාවන් අවම කරන්නට ඉඩ තිබිණි.(කෙසේ වුවද අනෙකුත් සියලු සැලසුම් දෝෂ සැළකිල්ලට ගෙන බලන කල මෙම ප්‍රොටොකෝලය තවමත් නිවැරදි විද්‍යාගාර භාවිතය (good laboratory practice) සඳහා කිසිදු සුදුසුකමක් සපුරා නැති බව පෙනී යයි.)

එහි දැක්වෙන අන්දමට N ජානය සඳහා වන පරීක්ෂණය අනිවාර්ය සහ තීරණාත්මක තුන්වන තහවුරුකාරක-පියවරක් ලෙස ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානයේ නිර්දේශ තුළ යෝජනා කර නැතිවාක් මෙන්ම කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් එය " "විධිමත් ක්‍රියාදාමයක් සඳහා" වැදගත්වන විකල්ප පුනර්-ආරක්ෂණයක් ලෙස අවධාරණය ද කර නැත. **(වගුව 2)**

මෙහි ප්‍රතිඵලයක් ලෙස ආසන්න වශයෙන් සමස්ත ලෝකයේම පරීක්ෂණ ක්‍රියාදාමයන් විසින් ප්‍රයිමර ගැළපුම් 3 ක් වෙනුවට හුදෙක් ප්‍රයිමර ගැලපුම් දෙකක් පමණක් යොදාගෙන ඇත. මෙම දෝෂය විසින් මුළු පරීක්ෂණ- ප්‍රොටොකෝලයම දැනට පවතින වසංගතයට අදාළව වැදගත්වන නිවැරදි පරීක්ෂණ ප්‍රතිඵල ලබා ගැනීමේ දී කිසිදු ප්‍රයෝජනයක් නැති තත්ත්වයකට පිරිහෙළා ඇත.

Background
We used known SARS- and SARS-related coronaviruses (bat viruses from our own studies as well as literature sources) to generate a non-redundant alignment (excerpts shown in Annex). We designed candidate diagnostic RT-PCR assays before release of the first sequence of 2019-nCoV. Upon sequence release, the following assays were selected based on their matching to 2019-nCoV as per inspection of the sequence alignment and initial evaluation (Figures 1 and 2).

All assays can use SARS-CoV genomic RNA as positive control. Synthetic control RNA for 2019-nCoV E gene assay is available via EVAg. Synthetic control for 2019-nCoV RdRp is expected to be available via EVAg from Jan 21st onward.

First line screening assay: E gene assay
Confirmatory assay: RdRp gene assay

රූපය **1:** **N**-ජානය සඳහා තහවුරුකාරක පරීක්ෂණය අත්‍යවශ්‍ය තුන්වන පියවරක් ලෙස ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානය විසින් නිර්දේශිත කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් ප්‍රොටොකෝලය [පහත 8 බලන්න] තුළ හෝ , එය උසස් පරීක්ෂණ නිරවද්‍යතාවක් සඳහා අත්‍යවශ්‍ය තීරණාත්මක පියවරක් ලෙස යුරෝසර්වේලන්ස් ප්‍රකාශනය තුළ හෝ අවධාරණය කර නැත.

<u>රූපය 1 අන්තර්ගත කොටසේ පරිවර්තනය</u>

"අපි දැනට දන්නා SARS-සහ SARS සම්බන්ධිත කොරෝනා වෛරස (වවුල් වෛරස පිළිබඳ අපගේම අධ්‍යයන තුළින් මෙන්ම විෂයට අදාළ සෙසු මූලාශ්‍ර තුළින්ද) non-redundant alignment ජනනය කිරීම සඳහා යොදාගතිමු. (උපුටාගැනීම් සංඥාපනයේ අන්තර්ගත වේ.) යෝජිත RT-PCR නිශ්චය පරීක්ෂණ අප විසින් සැලසුම් කරන ලද්දේ 2019-nCoV වෛරසයේ ජානදාමයේ පිළිබඳ දත්ත පළමුවරට නිකුත් කිරීමට පෙරය. එම ජාන දාම පිළිබඳ දත්ත නිකුත් කළ පසුව සිදු කරන ද පහත දැක්වෙන පරීක්ෂණ තෝරා ගැනීම ඒවා සමග 2019-nCoV අදාළව සිදුකළ ජාන දාම පෙළ පිළිබඳ පරීක්ෂණ සහ ප්‍රාරම්භක ඇගයීම් සමග වන ගැලපීම් මත පදනම්ව ඇත."

"සියලු පරීක්ෂණ සඳහා SARS-CoV ජානමය RNA පොසිටිව් පාලක ලෙස යොදාගත හැකිය. 2019-nCoV E ජානය සඳහා සංශ්ලේෂක පාලක RNA (synthetic control RNA) EVAg මගින් ලබාගෙන ඇත. 2019-nCoV RdRp සඳහා සංශ්ලේෂක පාලක EVAg මගින් ජනවාරි 21 වන දිනට පසුව ලබාගනු ඇත.

පළමු පෙළ නිවාරණ පරීක්ෂණය : E ජාන පරීක්ෂණය(First line screening assay :E gene assay)- තහවුරුකාරක පරීක්ෂණය: RdRp ජාන පරීක්ෂණය(Confirmatory assay :RdRp assay)"

1c) දෝෂ සහගත GC-අන්තර්ගතය

(මේ පිළිබඳව සංශ්ලේෂණ උෂ්ණත්වය - annealing temperature-Tm)යටතේ 2c හිදී සාකච්ඡා කරනු ලැබේ,

1d) වෛරස ජාන හඳුනාගැනීම

RT-PCR පරීක්ෂණය ආසාදනයන් පූර්ව නිශ්චය කිරීම් සඳහා නිර්දේශ කර නැත. COVID-19 හඳුනාගැනීම සඳහා RT-PCR පරීක්ෂණය සායනික පිළිවෙත් තුළ භාවිතා කිරීම COVID-19 හඳුනාගැනීමේ නියාමක දර්ශකයක් ලෙස නොසැළකෙන්නේ එබැවිනි.

"ආසාදන නිර්ණය සඳහා මොලිකියුල නිර්ණ තාක්ෂණයේ ඉහළ නිරවද්‍යතාව සහ ක්ෂණික බව සායනික වෛද්‍යවරුන් විසින් පිළිගැනීම අවශ්‍යවන්නාක් මෙන් ම එහි සීමාවන් හඳුනාගැනීමද අවශ්‍ය වේ. විද්‍යාගාර ප්‍රතිඵල සෑම විටෙකම රෝගියා විසින් පෙන්වනු ලබන සායනික ලක්ෂණවල සංදර්භය තුළ අර්ථකතනය කළ යුතුය. එමෙන්ම නියැදි ලබාගත් ස්ථානය, පිළිගත් ප්‍රමිතීන්ට අනුකූල වීම, ගුණාත්මක බව, සහ එය ලබා ගත් අවස්ථාව ද පරීක්ෂණ ප්‍රතිඵලවල විශ්වාසනීයත්වය සඳහා අවශ්‍යය".[9]

කෙසේ වුව ද විවිධ පෙණහලු ආසාදන වෙන් කර හඳුනාගැනීම වෛද්‍යවරයා හට අවශ්‍ය වන අවස්ථාවලදී (උණ, Covid-19 සහ SARS වැනි ඉතා සමාන රෝග ලක්ෂණ පෙන්වන රෝගවල සම්බන්ධයෙන්) එය (මොලිකියුල නිර්ණ තාක්ෂණය) රෝග විනිර්ණයේදී උදව් විය හැකිය. නිශ්චිත වෛරසයකට අදාළ තහවුරුකාරක නිර්ණයක් සඳහා අවම වශයෙන් වෛරසයේ නිශ්චිත ජාන 3 ක් හඳුනාගැනීම සඳහා නිශ්චිත ප්‍රයිමර යුගල 3 ක් භාවිතා කළ යුතුය. මෙම ඉලක්ක කරනු ලබන ජාන, වෛරසයේ ගෙනෝමය තුළ හැකිතාක් දුරින් පිහිටා ඇති ඒවා වන්නේ නම් (ප්‍රතිවිරුද්ධ අන්තයන්ද ඇතුළුව) එය වඩාත් යෝග්‍ය වේ.

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් ප්‍රයිමර 3 ක් ගැන විස්තර කර තිබුණද එම ප්‍රයිමරවලින් ආවරණය වන්නේ දළ වශයෙන් වෛරස් ගෙනෝමයේ අර්ධයක් පමණි. මෙම සාධකය විසින් COVID-19 වෛරසයේ RNA නිවැරදිව හඳුනාගැනීම සඳහා වන සුවිශේෂී බව අඩු කරනවාක් මෙන්ම පරීක්ෂණ ප්‍රතිඵලවල සාවද්‍ය පොසිටිව් අනුපාතය වැඩිකරනු ද ලබයි.

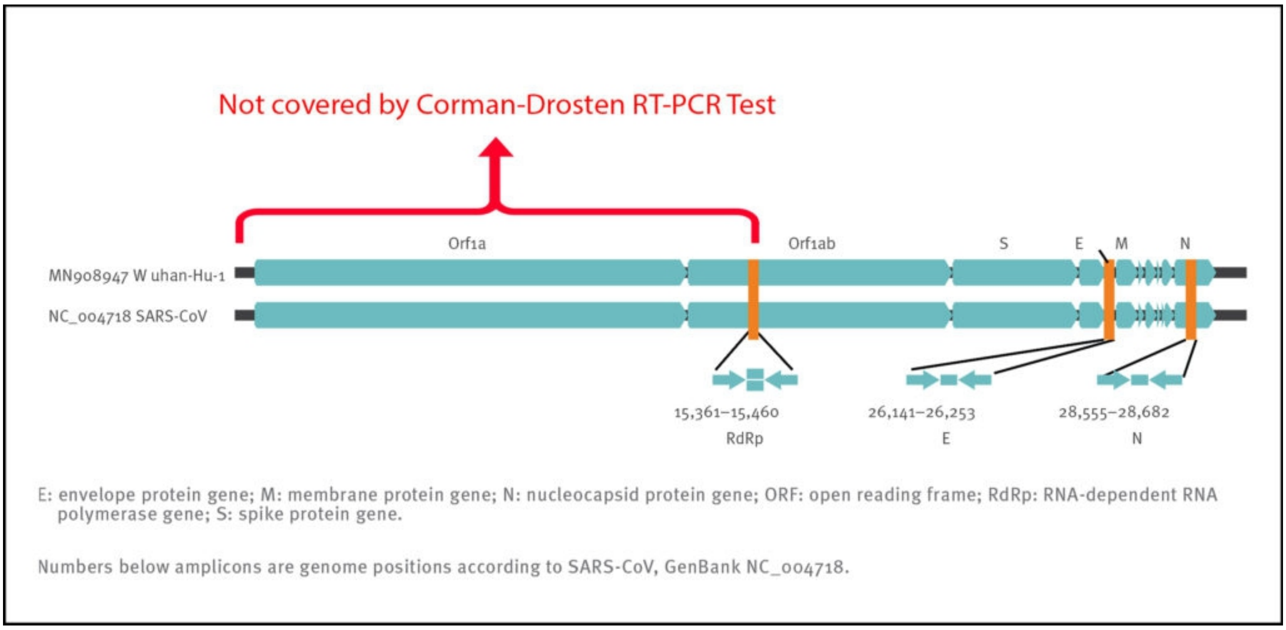
එහෙයින්, අප විසින් සාම්පලයක් තුළ දී පොසිටිව් සංඥා 3 ක් ලබාගත්ත ද (උදා - ප්‍රයිමර් යුගල 3 විසින් වෙනස් පිටපත් නිෂ්පාදන තුනක් ලබා දෙයි) එය විසින් වෛරසය එය තුළ පවතින බව ඔප්පු නොකරයි. වඩාත් නිවැරදි ප්‍රයිමර් සැලසුමකදී වෛරස් ගෙනෝමයේ දෙකෙළවර සඳහා ආන්තික ප්‍රයිමර් (terminal primers) සැලසුම් කෙරෙනු ඇත. මක් නිසාද යත්පොසිටිව් සංඥා 3 ක් විසින් සමස්ත වෛරස් ගොනෝමයම ආවරණය කෙරෙන බැවින් සහ ආසාදනයට හේතුව වීමට ඉඩ ඇති සම්පූර්ණ වෛරසයම, වෛරස් ගෙනෝම කැබැලිති (ආසාදනයක් ඇති කිරීමෙහිලා අසමත් අක්‍රිය

වෛරස් ජානමය කැබැලිති) වලින් වඩාත් හොඳින් වෙන්කර හඳුනාගැනීමට හැකියාව ලැබෙන බැවිනි. වෛරසයේ ආසාදක බව ගැන කිසියම් වැදගත් තීරණයකට එළැඹීමට නම් SARS-CoV වෛරසයේ ප්‍රතිවලිතකාරක එන්සයිමය (replicase enzyme) සඳහා කේත අඩංගු Orf1 ජානය ඉලක්කයක් ලෙස ඇතුළත් කළ යුතුය **(රූපය 4)**.
ප්‍රොටොකෝලයේ අඩංගු තවත් දුර්වලතාවක් වන්නේ වෛරස් ගෙනෝමය තුළ ඉලක්කගත කරන ලද කලාප ඉතා බරපතලව සහ විචල්‍ය ලෙස පිටපත්වීමය.

කිම් සහ කණ්ඩායම විසින් Sars-CoV-2 වෛරසයේ උප-ගෙනෝමික RNA වල අධි විචල්‍යතාවකින් යුතු 3’ ජාන ප්‍රකාශනය ආදර්ශනය කරනු ලබයි [23]. මෙම RNA රෝග ලක්ෂණ නොපෙන්වන සහ රෝගවාහක නොවන රෝගීන් තුළ ඇති විශේෂ ලක්ෂණයක් ලෙස සක්‍රිය ලෙස නිරීක්ෂණය කරන ලදි. [10]
ප්‍රයිමරයක ප්‍රයිම් 3’ අන්තයේ හස්ම යුගල 6 කින් යුතු ප්‍රයිමර්-ඩයිමර් සහිත qPCR ප්‍රයිමර් මගින් රෝග ලක්ෂණ නොපෙන්වන ජනකායක් පරීක්ෂණයට ලක් කිරීම බරපතල ගැටළු මතුකරන ක්‍රියාවකි **(රූපය 3).** පෙනී යන පරිදි ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානය විසින් මෙම ප්‍රයිමර නිර්දේශ කර ඇත.
අප විසින් කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ ඇති සියලු අස්ථායි ව්‍යුත්පන්න **“තර්මෝෆිෂර්ස් ප්‍රයිමර් ඩයිමර් වෙබ් ටූල්ස්“** (Thermofisher’s primer dimer web tool) භාවිතා කරමින් පරීක්ෂා කරන ලදි [11]. RdRp පූර්වගාමී ප්‍රයිමරයේ 6bp ආයාමයක් සහිත ප්‍රයිම්3 සමග ප්‍රතිවර්ත්‍ය Sarbeco E සමප්‍රභවතාවක් දක්වයි. ප්‍රයිමර්වල අධිසාන්ද්‍රණයකදී සාවද්‍යතා බිහිකිරීමට මෙය ප්‍රමාණවත්ය.

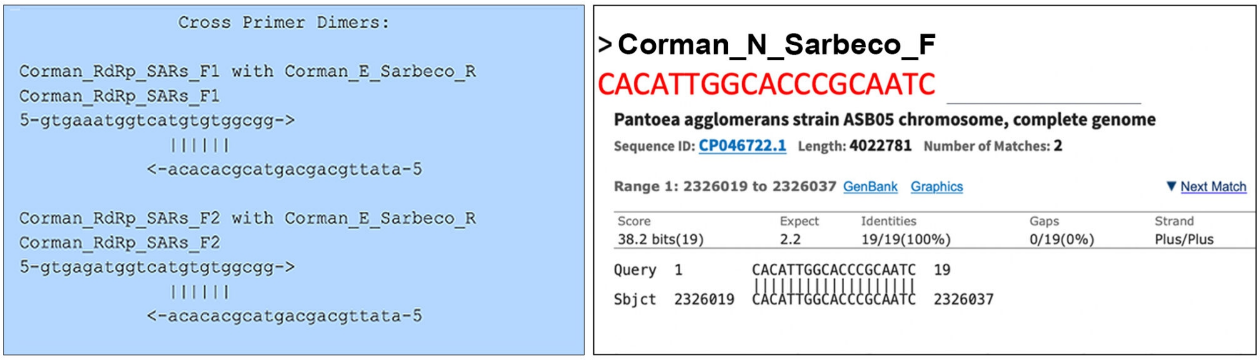
සටහන: ප්‍රතිශක්තිය දුර්වල වූ රොගීන් තුල හමු වූ සායනික විෂබීජයක් වන පන්ටෝයා (Pantoea) බැක්ටීරියාව, N ප්‍රයිමර වලින් එකක් සමග සම්පූර්ණ ගැලපීමකින් යුතුය. ප්‍රත්‍යවර්ත ප්‍රයිමරය පන්ටෝයා ද සමග සම්බන්ධවන වන නමුත් ඒ එකම කලාපයක් තුළ නොවේ. (රූපය 3).

මේවා ඉතා බරපතල සැලසුම් දෝෂ වේ. මෙම පරීක්ෂණයට සම්පූර්ණ වෛරසය හා වෛරස කැබැලිති වෙන්කර හඳුනාගැනීමට නොහැකිය. මෙම පරීක්ෂණය වෛරස නිර්ණය කිරීමට භාවිතා කළ නොහැකිය.



රූපය **2 : SARS** කොරෝනා වෛරසයේ සහ **2019** නව කොරෝනා වෛරසයේ ගෙනෝම සඳහා විස්තාරිත **DNA** ඉලක්ක **(amplicon targets)** වලට සම්බන්ධතාවක් දක්වන ස්ථාන

ORF: open reading frame;
RdRp: RNA-dependent RNA polymerase.
බහුගුණකවලට පහතින් ඇති සංඛ්‍යාවන් ගොනෝමය තුළ පිහිටීම් වලට අදාළ ස්ථාන වේ. **(SARS-CoV, NC_004718 [1];** ට අනුව)



රූපය 3: තර්මෝෆිෂර්ස් ප්‍රයිමර් ඩයිමර් වෙබ්ටූල්ස් මගින් කරන ලද පරීක්ෂණය විසින් RdRp පූර්වගාමී ප්‍රයිමරයේ ඇති 6bp ආයාමයකින් යුතු 3`ප්‍රයිම සමග ප්‍රතිවර්ත Sarbeco E සමප්‍රභවතාවක් දක්වන බව පෙන්නුම් කරන ලදි (වම්පස රාමුව). මෙමගින් සිදු කරන ලද තවත් පරීක්ෂණයකට අනුව N-ප්‍රයිමර්වලින් එකක් සමග ප්‍රතිශක්තිය විරල රොගීන් තුළ හමුවූ සායනික විෂබීජයක් වන පන්ටෝයා බැක්ටීරියාව පූර්ණ වශයෙන්ම සමානකම් දක්වන බව හෙළිවිය.

2. ප්‍රතික්‍රියාවන්ට අදාල උෂ්ණත්ව

2a) DNA ද්‍රවක උෂ්ණත්වය (melting temperature) (>92°)

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ ප්‍රමාණවත් පරිදි විස්තර වේ

2b) DNA සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය.

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ ප්‍රමාණවත් පරිදි විස්තර වේ

2c) දෝෂ සහගත GC-අන්තර්ගතය සහ Tm

සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය (annealing-temperature) වූකලී ප්‍රයිමර සිය ඉලක්කගත ජාන සමග සම්බන්ධවීම හෝ වෙන්වීම කවර උෂ්ණත්වයක් මත වන්නේදැයි තීරණය කරන උෂ්ණත්වයයි. කාර්යක්ෂම සහ නිශ්චිත බහුගුණනයක් සඳහා, ප්‍රයිමර්වල GC අන්තර්ගතය අවමය 40%ත් උපරිමය 60%ත් අතර බහුගුණනයක් විය යුතුය.
3 වන වගුවේ සඳහන් වන අන්දමට කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ සඳහන් ප්‍රයිමර 3 GC අන්තර්ගතයක සාමාන්‍ය සීමාවේ නොපවතී. පැවතිය හැකි සියලු අස්ථායි හස්ම ප්‍රභේද සඳහා ප්‍රයිමර් දෙකක (RdRp_SARSr_F ප්‍රයිමරය සහ RdRp_SARSr_R ප්‍රයිමරය) ඇත්තේ ඉතා අසාමාන්‍ය සහ පහළ GC අගයන් වන අතර E_Sarbeco_F ප්‍රයිමරයේ GC අගය 34.6% කි.
GC අන්තර්ගතය, එහි විශේෂිත ඉලක්කයන් සමග සිදුකරන බන්ධනයන් තීරණය වන්නේ එහි හස්ම යුගල තුළ ඇති හයිඩ්‍රජන් බන්ධන 3 මත බව අවධානයට ගත යුතුය. ප්‍රයිමරයේ GC අන්තර්ගතය පහළ අගයක් ගන්නේ නම් එය විසින් එහි විශේෂිත ඉලක්කගත ජාන දාම සමග බන්ධන සිදුකිරීමේ හැකියාවද පහළ මට්ටමක පවතී. මෙහි තේරුම, ඉලක්ක කරන ලද ජාන දාමයක් හඳුනාගැනීම සඳහා, එකම අවස්ථාවකදී විශේෂිත ජානදාමය තෝරාගන්නා අතරතුරම ප්‍රයිමරය නැවත විසටනය නොවීම සඳහා, අපට සැබෑ සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වයට (annealing-temperature) හැකිතාක් ආසන්න උෂ්ණත්වයක් (සුදුසුම ප්‍රායෝගික අගය-best-practise value) තෝරාගැනීමට සිදුවනු ඇත.

නිරීක්ෂණය කළ පරිදි RdRp අපරගාමී ප්‍රයිමරවල සියලු අස්ථායි ප්‍රභේද සඳහා Tm අගය ඉතා අඩුනම් ප්‍රයිමර විසින් නියමිත නොවන ඉලක්ක කීපයක් සමග ද බන්ධන ඇති කරගනුලබයි. එමගින් නිශ්චිතභාවය අඩුවන අතර සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල ලැබීට ඇති ඉඩ වැඩිකරනු ඇත.

qPCR ක්‍රියාදාමයේ නිශ්චිත බව සහ නිරවද්‍යතාව තීරණය කිරීමෙහි ලා සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය (annealing temperature) ඉතා වැදගත් සාධකයක්වන අතර qPCR ප්‍රොටොකෝලයේ නිවැරදිබව ඇගයීමේ දී ද බලපාන අනිවාර්ය සාධකයකි.

සුදුසුතම ප්‍රායෝගික නිර්දේශ :
ප්‍රයිමර දෙකම සඳහා (පූර්වගාමී සහ අපරගාමී) මුළුමණින්ම පාහේ සමාන අගයන් ගත යුතුය- එකම අගයක් ගන්නේ නම් වඩාත් සුදුසුය.

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ භාවිතා කරන ලද සියලු ප්‍රයිමරවල සුදුසුතම ප්‍රායෝගික අගයන් ඇගයීමකට ලක්කිරීමට අපි Primer-BLAST [12, 25] නම් මෘදුකාංගය භාවිතා කළෙමු. සියලු ප්‍රයිමර් සඳහා යෙදිය හැකි ඉහළතම GC % අගය සොයන අතර ම අපි 60° C හි Tm අගය සෙවීමට වෑයම් කළෙමු. ප්‍රයිමර් යුගලක් සඳහා පිළිගත හැකි උපරිම Tm වෙනස 2° C යැයි සැළකේ. කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ විශේෂයෙන් තෝරාගෙන ඇති ප්‍රයිමර් යුගල පරීක්ෂණයට ලක් කිරීමේදී 1-ප්‍රයිමර් යුගල (RdRp_SARSr_F සහ RdRp_SARSr_R) සඳහා සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වවලට අදාළ වෙනස 10° C ක් බව අප නිරීක්ෂණය කළෙමු. මෙය ඉතා බරපතල දෝෂයක් වන අතර එම දෝෂය විසින් මෙම ප්‍රොටෝකෝලය විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතා කළ නොහැකි අප්‍රයෝජනවත් දෙයක් බවට පත් කර තිබේ.
වැඩිදුරටත් සිදු කරන ලද පරීක්ෂණ විසින් පෙන්නුම් කරන ලද්දේ N-ජානය පිටපත් කිරීම සඳහා සැලසුම් කරන ලද ප්‍රයිමර් යුගල (N_Sarbeco_F සහ N_Sarbeco_R) පමණක් නිර්ණය පරීක්ෂණයක් සඳහා අවශ්‍ය පිළිගත් මට්ටමක පවතින බවයි. ඒ එය සතුව ප්‍රමාණවත් GC- අන්තර්ගතයක් පැවැති හෙයින් සහ ප්‍රයිමර් (N_Sarbeco_F සහ N_Sarbeco_R)අතර Tm වෙනස 1.85° C (උෂ්ණත්ව වෙනසේ ඉතා තීරණාත්මක උපරිම අගය වන 2° C ට අඩු) වීම නිසාය.

මෙහිදී සැළකිල්ලට ගත යුතු වැදගත් කරුණක් වන්නේ වෛරස් සාම්පල තුළ පරීක්ෂණයට ලක් නොකළ සහ තහවුරු කාරක පරීක්ෂණයක් ලෙස අවධාරණය නොකළ ජානය මෙම N-ජානය බවයි. **(වගුව 3)** මෙම ප්‍රයිමර් සඳහා සැලසුම් කර ඇති ඉතා ඉහළ වෙනස්කම් සහිත ද්‍රවක උෂ්ණත්ව (melting temperatures)වලට සහ ඒවායේ අවරූපිත ජාන අනුක්‍රම (degenerate sequences) වලට අමතරව, පරීක්ෂණ ක්‍රියාදාමයේ නිශ්චිතතාවයට බවට අයහපත් ලෙස බලපාන අනෙකුත් කරුණ නම් එහි dNTPs (0.4uM) අගය ඉහළ නිශ්චිත බවකින් යුත් බහුගුණනයක් සඳහා නිර්දේශිත මට්ටමට වඩා දෙගුණයක් වීමයි. එමෙන්ම ප්‍රතික්‍රියාව සඳහා අමතර මැග්නීසියම් සල්ෆේට් ද එක්කර තිබේ. මෙම ක්‍රියාදාමය පහල සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වයක් සමග සම්බන්ධ වූ විට නිශ්චිත නොවන බහුගුණන සඳහා හේතුවක් විය හැකිය. පරීක්ෂණයේ qPCR සඳහා අමතර මැග්නීසියම් සල්ෆේට් අවශ්‍ය වන්නේ නම් පරීක්ෂණයේ නිශ්චිත බව වැඩි දුර විමර්ශනයට ලක් කළ යුතු වේ.

මෙහි සඳහන් කරන ලද සැලසුම් දෝෂ ඉතා බරපතල වන අතර මෙම කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ ප්‍රොටොකෝලය උපයෝගී කරගනිමින් SARS-CoV-2 වෛරසයේ ජානමය ද්‍රව්‍යවල නිශ්චිත බහුගුණනයක් සිදුවීමට ඇති ඉඩ ඉතා අවමය.

Normal ranges for GC%: 40 - 60%; normal ranges for TM: 55-65°; Best-practise for qPCR in our case: 60° for both primers (reverse & forward)

GC% 59,09 TM 63,74°

Difference of almost 10°

GC% 28,00 TM 53,56°

GC% 34,62 TM 58,29°

GC% 45,45 TM 60,93°

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence[a]	Concentration[b]
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRP_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

[a] W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.

[b] Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 μL of a 10 μM primer stock solution per 25 μL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.

		GC	TM		Search in **MN908947** (first full genome from Wuihan, 12.01.2020)					
Primer pairs	**Sequence (5´-3´)**	**Template strand**	**Length**	**Start**	**Stop**	**Tm**	**GC%**	**Self 5' complementarity**	**Self 3' complementarity**	**Product length (bp)**
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Plus	26	26269	26294	58.29	34.62	8.00	8.00	**113**
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Minus	22	26381	26360	60.93	45.45	7.00	1.00	
N-Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Plus	19	28706	28724	60.15	57.89	4.00	0.00	**128**
N-Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Minus	20	28833	28814	58.00	55.00	3.00	1.00	
RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00	to be added in next version	
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA		25			53.56	28.00	7.00		
If R= G and S= G	GTGAGATGGTCATGTGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00	1.00	
	CAGATGTTAAAGACACTATTAGCATA		26			55.22	30.77	7.00	5.00	not found in the Sequence
If R= G and S= C	GTGAGATGGTCATGTGTGGCGG		22			63.74	59.09	4.00	1.00	
	CAGATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			55.68	30.77	7.00	2.00	
If R= A and S= G	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG		22			62.58	54.55	4.00	1.00	
	CAAATGTTAAAGACACTATTAGCATA		26			54.23	26.92	7.00	5.00	
If R= A and S= C	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG		22			62.58	54.55	4.00	1.00	
	CAAATGTTAAACACACTATTAGCATA		26			54.69	26.92	7.00	2.00	
Probes:										
RdRp-SARSr-P2	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC		25			64.89	56.00	6.00	5.00	
RdRp-SARSr-P1	CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC									
E-Sarbeco-P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG		26			66.78	53.85	4.00	2.00	
N-Sarbeco-P	ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA		25			63.15	44.00	8.00	3.00	

වගුව 3: ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ වල GC- අන්තර්ගතය (කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවෙන් උපුටාගන්නා ලදි; තෝරාගන්නා ලද GC- අන්තර්ගතවල අපේරණ සළකුණු කොට ඇත.
දෙවැනි පැනලයෙන් පෙන්නුම් කරන්නේ කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් භාවිතා කරන ලද සියලු ප්‍රයිමර සහ ප්‍රෝබ සඳහා මහාචාර්ය උල්රික් කේමරර් සහ ඇගේ කණ්ඩායම විසින් Primer-BLAST මෘදුකාංගය ඇසුරෙන් ලබාගන්නා ලද සියලු සුදුසුතම ප්‍රායෝගික අගයන් (best practices values) වේ.

3. බහුගුණන චක්‍ර සංඛ්‍යාව (The number of amplification cycles)

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ කොතැනකවත් පරීක්ෂණයක් පොසිටිව් හෝ නෙගටිව් වන්නේ කෙසේදැයි යන්න හෝ පරීක්ෂණ ප්‍රතිඵල පොසිටිව් හෝ නෙගටිව් වීම අර්ථකතනය කරන්නේ කුමක් විසින්දැයි යන්න ගැන සඳහන් නොවන බව අවධානයට ගත යුතුය. මෙම වර්ගයේ වෛරස්වේදී රෝග නිශ්චය කිරීමේ පරීක්ෂණ ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් (standard operating procedure-SOP) මත පදනම් විය යුතුය. කුමන සාම්පලයක් පොසිටිව් හෝ නෙගටිව් වන්නේ ද යන්න තීරණය කරනු ලබන වලංගු සහ ස්ථිර PCR චක්‍ර සංඛ්‍යාව (Ct value/threshold cycle) ද එයට අන්තර්ගත විය යුතුය. සහේතුක ලෙස විශ්වාසය තැබිය හැකි උපරිම බහුගුණන චක්‍රසංඛ්‍යාව (Ct value) චක්‍ර 30 කි. චක්‍ර 35 කට වැඩි වන විට ලැබෙන සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල සංඛ්‍යාව ශීඝ්‍රයෙන් ඉහළ යාම අපේක්ෂා කළ යුතුය.

චක්‍ර 35 කට වැඩියෙන් සිදුකර ලබා ගන්නා PCR දත්ත මගින් පොසිටිව් ලෙස සිදුකරන නිශ්චය කිරීම මුළුමණින්ම සැක සහිතය.

ජාෆාර් සහ කණ්ඩායම සිය පිළිබඳ සිය පරීක්ෂණ ප්‍රතිඵල 2020 [3] වල මෙසේ සඳහන් කරයි
.

> " Ct = 35 යොදගනිමින් සිදු කරන ලද පරීක්ෂණ ප්‍රතිඵලවලින් පොසිටිව් යැයි නිගමනය කරන ලද සාම්පල නැවත රෝපණ පරීක්ෂණය (culture) ට ලක්කිරීම මගින් අපට වාර්තා වූයේ ඉන් 3%ක් පමණක් පොසිටිව් වන බවය"

වෙනත් වචනවලින් පවසතොත් ඉහල චක්‍ර සංඛ්‍යාවන් යොදාගනිමින් සිදුකරන පරීක්ෂණවලදී SARS-CoV-2 වෛරසය සාර්ථකව වෙන්කර හඳුනාගත නොහැකිය.

විද්‍යාත්මක අධ්‍යයනයන් විසින් වැඩිදුරටත් පෙන්වනු ලබන්නේ ආසාදකාරක නොවන මියගිය වෛරස් පමණක් බහුගුණන චක්‍ර 35 (Ct = values35) දී නිරීක්ෂණය වන බවය [22].

චක්‍ර 30 සහ 35 අතර ඇත්තේ අපැහැදිලි කලාපයකි. එම කලාපය තුළ පොසිටිව් පරීක්ෂණ විශ්වාසනීයත්වයකින් යුතුව තහවුරු කළ නොහැකිය. මෙම කලාපය ඉවත් කළ යුතුය. සත්තකින්ම යමෙකුට කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන්- ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධාන ප්‍රොටොකෝලය **(රූපය 4)** විසින් නිර්දේශ කර ඇති අන්දමට බහුගුණන චක්‍ර 45 ක් ක්‍රියාත්මක කළ හැකිය. නමුත් එවිට සහේතුක චක්‍ර සංඛ්‍යාව (reasonable Ct value-එය චක්‍ර 30 නොඉක්මවිය යුතුය යන්න දැනට පිළිගෙන ඇති ස්ථාවරයයි). නිර්වචනය කිරීමට ඔබට සිදුවනු ඇත. නමුත් චක්‍ර 45 ක් යොදාගනිමින් ලබාගන්නා විශ්ලේෂණාත්මක ප්‍රතිඵල විද්‍යාත්මකව සහ නිර්ණයාත්මකව මුළුමණින්ම අරුත් විරහිතය (සහේතුක චක්‍ර සංඛ්‍යාව 30 නොඉක්මවිය යුතුය) .

මේ සියල්ල පැහැදිලි ලෙස සන්නිවේදනය කළ යුතුය. සැකයකින් තොරව නිශ්චිත ලෙස පිළිගත හැකි පොසිටිව් හෝ නෙගටිව් පරීක්ෂණාත්මක ප්‍රතිඵල ලබාගත හැකි උපරිම චක්‍ර සංඛ්‍යාව කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් සඳහන් නොකරයි. මෙම අතිශය වැදගත් උපරිම චක්‍ර සංඛ්‍යා සීමාව පසුව ඉදිරිපත් කරන ලද ඉදිරිපත් කිරීම් තුළ හෝ මේ වනතුරු නිශ්චය කර නැත.

3. Discrimatory assay

RdRp assay:

MasterMix:	**Per reaction**	
H_2O (RNAse free)	1.1 µl	
2x Reaction mix*	12.5 µl	
$MgSO_4$(50mM)	0.4 µl	
BSA (1 mg/ml)**	1 µl	
Primer RdRP_SARSr-F2 (10 µM stock solution)	1.5 µl	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
Primer RdRP_SARSr-R1 (10 µM stock solution)	2 µl	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
Probe RdRP_SARSr-P2 (10 µM stock solution)	0.5 µl	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ
SSIII/Taq EnzymeMix*	1 µl	
Total reaction mix	20 µl	
Template RNA, add	5 µl	
Total volume	25 µl	

* Thermo Fischer/Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase
** MgSO4 (50 mM) [Sigma], This component is not provided with the OneStep RT-PCR kit
*** non-acetylated [Roche].

Cycler:

55°C 10'
94°C 3'
94°C 15"
58°C 30" | 45x

රූපය 4: RT-PCR පරීක්ෂණ කට්ටල සඳහා වන නිල කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් - ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධාන ප්‍රොටොකෝලයේ සඳහන් නිර්දේශ [8]. මෙහි “Cycler”-value (චක්‍ර) යන්න පමණක් සඳහන්වන්නේ විද්‍යාත්මකව සහේතුක චක්‍ර සංඛ්‍යාවට අනුරූප නොකරමිනි. වර්තමාන කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ මෙම චක්‍ර සංඛ්‍යා අගය හෝ වෙනත් කිසිදු චක්‍ර සංඛ්‍යා අගයක් ගැන කිසිදු තැනක දැකිය නොහැකිය.

4. ජීව මොලිකියුල වලංගුකරණය (Biomolecular validations)

බහුගුණනය කරන ලද ජානමය නිෂ්පාදන සැබෑ ලෙසම SARS-CoV-2 ජාන දැයි නිර්ණය කරනු සඳහා බහුගුණනය කරන ලද PCR නිෂ්පාදන ජීව මොලිකියුල වලංගුකරණයකට ලක්කිරීම අත්‍යාවශ්‍ය වේ. රෝග නිශ්චය පරීක්ෂණයක් සඳහා මෙම වලංගුකරණය පරම අනිවාර්යයකි.

PCR නිෂ්පාදන වලංගුකරණය සිදු කළ යුත්තේ ඒවා , නිෂ්පාදනයේ ප්‍රමාණය ඇස්තමේන්තු කිරීම සඳහා ප්‍රමාණ දර්ශකයක් (size indicator -DNA ruler or DNA ladder)) සමග 1% agarose-EtBr ජෙලි තුළ තුළ යෙදවීම මගිනි. මෙම ප්‍රමාණය බහුගුණනය කරන ලද නිෂ්පාදනය සඳහා ගණනය කරන ලද ප්‍රමාණයට අනුරූප විය යුතුය. බහුගුණනය කරන ලද නිෂ්පාදනය අනුක්‍රමණයට (sequence) සැලැස්වීම වඩාත් සුදුසුය. පසුව සඳහන් කළ ක්‍රියා මාර්ගය විසින් බහුගුණනය කරන ලද නිෂ්පාදන වල අනන්‍යතාව 100%ක නිශ්චිත බවකින් ලබා දෙනු ඇත. යමෙකුට මොලිකියුල වලංගුකරණයකින් තොරව බහුගුණනය කරන ලද PCR නිෂ්පාදනවල අනන්‍යතාව තහවුරු කළ නොහැකිය. මෙයට පෙර විස්තර කරන ලද බරපතල සැලසුම් දෝෂ සැළකිල්ලට ගන්නා විට බහුගුණනය කරන ලද PCR නිෂ්පාදන ඕනෑ දෙයක් විය හැකිය.

qPCR හි 100bp ට ආසන්න විශාලත්වයක් සහිත කුඩා කැබැලිති (small fragments) පිළිබඳ කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ කිසිදු සඳහනක් නැත. එය එක්කො 1,5% agarose ජෙලි හෝ acrylamide ජෙලි විය හැකිය **මෙම නිෂ්පාදන මොලිකියුල මට්ටමේ වලංගුකරණයට ලක් නොකිරීම ප්‍රොටෝකෝලයේ තවත් බරපතල දෝෂයක් වන අතර එම ප්‍රොටොකෝලය මත පදනම් වන කිසිදු පරීක්ෂණයක් නිශ්චය මෙවලමක් ලෙස SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීමේදී අප්‍රයෝජනවත්ය**

5. විශේෂිත වෛරසයක් හඳුනාගැනීමේදී එය සහතික කිරීම හෝ ප්‍රතික්ෂේප කිරීම සඳහා වන පොසිටිව් සහ නෙගටිව් පාලක පරීක්ෂණ (Positive and negative controls)

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ විස්තර වන තහවුරු නොකරන ලද අනුමානය වන්නේ වර්තමානයේ දී මිනිසුන් ආසාදනය කරන SARS වැනි බීටා කොරෝනා වෛරස් කාණ්ඩයට අයත් එකම වෛරසය SARS-CoV-2 බවයි. ඔවුන්ගේ PCR විධික්‍රමය පදනම්ව ඇති ජාන අනුක්‍රමය චීනයේ විද්‍යාගාරයක් විසින් සපයන ලද in silico ජාන අනුක්‍රම මත පදනම් වී ඇත [23]. මක් නිසාද යත් ඔවුන් විසින් මෙම පරීක්ෂණය සංවර්ධනය කරන අවස්ථාව වනවිට පාලක ආසාදකාරක අමුද්‍රව්‍ය (එනම් වෙන්කර හඳුනාගන්නා ලද ආසාදකාරක සජීවී වෛරසයක්) නැතහොත් අක්‍රිය SARS-CoV-2 වෛරසයක් ඔවුන් සතුව නොපැවතීමයි. එහෙයින් පරීක්ෂණය සැලසුම් කර ඇත්තේ Sarbeco සංරචක සඳහා පාලක අමුද්‍රව්‍ය ලෙස දැනට දන්නා SARS-CoV යොදාගනිමිනි.
(කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ සම කර්තෘවරයෙකු වන Dr. Meijer විසින් Dr. Peter Borger සමග කරන ලද ඊමේල් ලිපි හුවමාරුවකදී දක්වා ඇති අන්දමට) [2]

කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් විස්තර කරන අන්දමට ඔවුන්ගේ RT-PCR පරීක්ෂණය මගින් පොසිටිව් ලෙස හඳුනා ගනු ලබන සියලු පුද්ගලයන් SARS-CoV-2 ආසාදනය සඳහා පොසිටිව් පුද්ගලයන් ලෙස අනුමාන කරනු ලබයි. මෙම අනුමානයේ ඉතා බරපතල දෝෂ 3 ක් ඇත.

පළමුවැන්න, කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් විස්තර කරන RNA මොලිකියුල සඳහා වන පරීක්ෂණයක පොසිටිව් ප්‍රතිඵල " වෛරසයක් මගින් සිදුව ඇති ආසාදනයක" පොසිටිව් ප්‍රතිඵලවලට සමාන කිරීමට නොහැකිවීමයි. මක් නිසාද යත් RT-PCR පරීක්ෂණයක පොසිටිව් ප්‍රතිඵල විසින් පෙන්නුම් කරන්නේ හුදෙක් වෛරස් RNA මොලිකියුලවල පැවැත්ම පමණක් වන හෙයිනි. **1d අනු සිරස්තල අංකය (ඉහත)** යටතේ අප විසින් පෙන්වා දී ඇති අන්දමට, කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පරීක්ෂණය සැලසුම් කර ඇත්තේ සම්පූර්ණ වෛරසය හඳුනාගැනීම පිණිස නොව වෛරසයේ එක් කොටසක් (fragment) හඳුනාගැනීම සඳහා පමණක් වන හෙයිනි. මේ හේතුවෙන් මෙම RT-PCR පරීක්ෂණය SARS වෛරස් ආසාදන සඳහා නිශ්චයකාරක මෙවලමක් ලෙස අයෝග්‍ය බව අපි දැනටමත් නිගමනය කර ඇත්තෙමු.
අතිශයින් අදාළ වන දෙවන කරුණ නම්, ප්‍රකාශිත RT-PCR පරීක්ෂණයේ ක්‍රියාකාරිත්වය පොසිටිව් පාලක පරීක්ෂණ තත්ත්වයක් (වෙන්කර හඳුනාගත් නැතහොත් ඒකලනය කරන ලද SARS-CoV-2 වෛරසයේ RNA සමග) යටතේ පෙන්වා දී නැත. එය ඉහළ විද්‍යාත්මක ප්‍රමිතියක් (gold standard) සඳහා අත්‍යවශ්‍ය කරුණකි.

තුන්වෙනුව, කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව මෙසේ විස්තර කරයි.

*“ අනෙකුත් වවුලන් ආශ්‍රිත **SARS** සම්බන්ධ වෛරස් හඳුනාගැනීම සඳහා පරීක්ෂණය සමත් බව පෙන්වීමට, ඩ්‍රෙක්ස්ලර් සහ කණ්ඩායම [...] සහ මුත් සහ කණ්ඩායම [...] සතුව පැවැති වවුල් මලපහ මගින් ලබාගත් සාම්පල 6 ක් පරීක්ෂා කිරීමට අපි E gene පරීක්ෂණය උපයෝගී කොටගතිමු. මෙම වෛරස්- පොසිටිව් සාම්පලවල ප්‍රභවය යුරෝපීය රයිනෝෆිඩ් වවුලන්ය. **SARS** සම්බන්ධ **CoV** කාණ්ඩය තුල මෙම වංශප්‍රවේණික බාහිරස්ථ (phylogenetic outliers) හඳුනාගැනීම විසින් සියලු ආසියානු වෛරස හඳුනාගැනීමට ඇති හැකියාව යෝජනා කරනු ලබයි. සත්ව සමූහයක් වෙතින් වෙන්ව වෙන්ව ස්වාධීනව සිදු කෙරෙන බහුවිධ සාම්පල ලබාගැනීම් වලට අදාළව වුව ද පුළුල් සංවේදීතාවක් දක්වන බව මෙමගින් සෛද්ධාන්තිකව තහවුරු කෙරෙයි.“*

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් විස්තර කරන අන්දමට RT-PCR පරීක්ෂණය තුළ භාවිතා කළ E ජානය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත වූවක් නොවන බව මෙම ප්‍රකාශනය මගින් පෙන්නුම් කරයි. E ජානය සඳහා වන ප්‍රයිමර විසින් විශාල පරාසයකින් යුතු අනෙකුත් SARS වෛරස් ද හඳුනාගැනේ.

මනුෂ්‍යයන් ආසාදනය කරන සියලු RNA වෛරස් අතරින් විශාලතම ජාන ගෙනෝමය සහිතවන්නේ කොරෝනා වර්ගයේ වෛරස්වල වන අතර ඒවා සියල්ලන් සතුව ඇත්තේ ඉතා සමාන මොලිකියුල ව්‍යුහයකි. එසේ වුවද SARS-CoV1 සහ SARS-CoV2 සතුව ඒවා සෙසු කොරෝනා වෛරස්වලින් වෙන් කෙරෙන අධි විශේෂිත ජානමය “ඇඟිලි සළකුණු“ ඇත. පළමුව ඉතා පැහැදිලි අනන්‍ය ජානදාම අනුක්‍රම සළකුණක් වන (KTFPPTEPKKDKKKK) නම් ජානදාම අනුක්‍රමය SARS-CoV වෛරසය සහ SARS-CoV-2 වෛරසය තුළ පවතින N-ප්‍රෝටීනයේ පවතී [13,14,15]. දෙවනුව SARS-CoV1 වෛරසය සහ SARS-CoV2 වෛරසය යන දෙකෙහිම HE ප්‍රෝටීනය අඩංගු නොවන අතර සෙසු සියලු කොරෝනා වෛරස්වල එම ප්‍රෝටීනය අන්තර්ගතය [13,14]. එහෙයින් SARS-CoV1 සහ SARS-CoV2 වල PCR නිෂ්පාදන විශේෂයෙන් හඳුනාගැනීම සඳහා ඉහත N ජානය සහිත කලාපය බහුගුණනය සඳහා විශේෂිත ඉලක්කයක් ලෙස තෝරාගත යුතුව තිබිණි. නිශ්චය කිරීම් සඳහා වන විශ්වාසනීය පරීක්ෂණයකදී මෙම N ජානය සහිත විශේෂිත කලාපය තහවුරුකාරක පරීක්ෂණයක් ලෙස අවධානයට ගත යුතුය.

SARS-CoV1 සහ SARS-CoV-2 යන වෛරස් දෙක තුළම HE ජානය අන්තර්ගත නොවීම හේතුවෙන් එම ජානය අනෙකුත් කොරෝනා වෛරස්වලින් ඒවා වෙන්කර හඳුනාගැනීමට සුදුසු පරමාදර්ශී නෙගටිව් පාලක පරීක්ෂණයක් වේ. **කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ මෙම නෙගටිව් පාලක පරීක්ෂණය අඩංගු කර නැතිවා පමණක් නොව වෙනත් කිසිදු නෙගටිව් පාලක පරීක්ෂණයක්ද එහි අඩංගු කර නැත. අනෙකුත් වෛරස සාම්පලය තුළ අඩංගු නොවන බවට සහතික කිරීම සඳහා කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව මගින් ඉදිරිපත් කරන PCR පරීක්ෂණය තුළ පැහැදිලි පොසිටිව් පාලක පරීක්ෂණයක් හෝ නෙගටිව් පාලක පරීක්ෂණයක් අඩංගු නොවේ. මෙම කරුණ මෙම RT-PCR පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 සඳහා නිශ්චයකාරකයක් ලෙස නුසුදුසු යැයි නිගමනය කිරීමට බලපාන තවත් මූලික දෝෂයකි.**

6. ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් නොපැවතීම (Standard Operational Procedure-SOP)

සියලු විද්‍යාගාර තුළ එක හා සමාන පරීක්ෂණ තත්ත්වයන් සකස් කිරීමට හැකි වන ලෙස ඉහත පරාමිතීන් පැහැදිලි ලෙස නිශ්චය කරන ලද ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක පැවැත්ම අත්‍යවශ්‍ය වේ. වලංගු විශ්වීය ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් අනිවාර්ය වන්නේ එය විසින් රටවල් අතර දත්ත සන්සන්දනයට පහසුකම් සපයන බැවිනි.

ප්‍රයිමර්වල සියලු පරාමිතීන් පැහැදිලිව සහ නිශ්චිතව දැක්වීම ඉතා වැදගත්ය. මෙය සිදු කර නැති බව අප විසින් දක්නා ලදි. සාම්පලයක් පොසිටිව් හෝ නෙගටිව් ලෙස සළකනු ලබන්නේ කවර චක්‍ර සංඛ්‍යාව (Ct value) මත දැයි යන්න නිශ්චිතව අර්ථ දක්වා නැත. එමෙන්ම සාම්පලයක් SARS-CoV වෛරස්වලින් ආසාදනය වී ඇතැයි සළකනු ලබන්නේ කවර විටෙකදැයි යන්නද විශ්ලේෂණය කොට නැත. ඉහත පෙන්වා දෙන ලද පරිදි, මෙම පරීක්ෂණයට වෛරස් හෝ වෛරස් කොටස් වෙන් කර හඳුනාගැනීමට හැකියාවක් නැත, එහෙයින් පොසිටිව් බව නිර්ණය කරන චක්‍ර සංඛ්‍යාව (Ct value)තීරණාත්මක වැදගත්කමකින් යුක්තය. මෙම චක්‍ර සංඛ්‍යාව ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටිය (SOP) තුළ විශ්ලේෂණය කළ යුතුව තිබූ අතර සියලු විද්‍යාගාරවලට නියත ලෙසම එක හා සමාන සීමා කොන්දේසින් යටතේ පරීක්ෂණ පැවැත්වීමට හැකිවන පරිදි එය අන්තර්ජාලයට එක් කළ යුතුව තිබිණි.

ප්‍රමිතිගත ක්‍රියාපරිපාටියක් නොමැතිවීම විසින් සාවද්‍ය විද්‍යාවකට යොමු කරනු ලබයි. එමගින් තමන්ට සුදුසු යැයි සිතෙන පරිදි පරීක්ෂණ පැවැත්වීමට විද්‍යාගාරවලට නිදහස ලැබිණ. එහි ප්‍රතිඵලය වූයේ අසීමාන්තික වෙනස්කම් සිදුවීමයි. යුරෝපය පුරා විද්‍යාගාර බහුවිධ ප්‍රශ්න ජාලාවක් මැද අතරමං කෙරිණි. ඇණවුම් කළ යුතු ප්‍රයිමර් මොනවාද?

නිශ්චය නොකරන ලද ස්ථාන පිරවිය යුත්තේ කවර නියුක්ලියෝටයිඩවලින්ද? කුමන Tm අගයක් තෝරාගත යුතුද? ක්‍රියා කරවිය යුතු PCR චක්‍ර සංඛ්‍යාව කුමක්ද? සාම්පලයක් පොසිටිව් වන්නේ කවර චක්‍ර සංඛ්‍යාවක දී ද? එය නෙගටිව් වන්නේ කවර අවස්ථාවකදී ද? කොපමණ ජාන සංඛ්‍යාවක් පරීක්ෂණයට ලක් කළ යුතු ද? සියලු ජාන පරීක්ෂණයට ලක් කළ යුතු ද නැතහොත් කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ දෙවන වගුවේ දැක්වෙන අන්දමට E සහ RpRd ජාන පමණක් පරීක්ෂණයට ලක් කළ යුතු ද? N ජානය ද පරීක්ෂණයට ලක් කළ යුතු ද? ඒවායේ නෙගටිව් පාලක මොනවාද? ඒවායේ පොසිටිව් පාලක මොනවාද?

අප විසින් විස්තර කරන ලද පරිදි මෙම ප්‍රොටොකෝලයේ සැලසුම ඉතා අවාසනාවත් ලෙස නොපැහැදිලි සහ දෝෂ සහගතය. එමගින් යමෙකු දුසිම් ගණන් වෙනස් දිශාවන්ට යොමුකළ හැකිය. එහි කිසිදු ප්‍රමිතියක් හෝ ප්‍රමිතිගත ක්‍රියාපරිපාටියක් දක්නට නැත. එහෙයින් මෙම පරීක්ෂණය ක්‍රියාත්මක කළ යුත්තේ කෙසේදැයි පැහැදිලි නැත.

7. 1 සිට 5 දක්වා සිරස්තල යටතේ විස්තර කරන ලද දෝෂවල විපාක : සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල

කොර්මන්- ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් විස්තර කරන RT-PCR පරීක්ෂණය තුළ, එමගින් පැහැදිලි පරීක්ෂණාත්මක ප්‍රතිඵලයක් ලබාගත නොහැකි වීමට බලපාන, මොලිකියුල ජීව විද්‍යාත්මක දෝෂ විශාල සංඛ්‍යාවක් පවතී. (1 සිට 5 දක්වා බලන්න) මෙම පරීක්ෂණය විසින් ඊනියා “සාවද්‍ය පොසිටිව්“ අති විශාල සංඛ්‍යාවක් ලැබීම වැළැක්විය නොහැකිය.

සාවද්‍ය ප්‍රතිඵල යන්නෙහි අර්ථකතනය වන්නේ පළමුවෙන් පොසිටිව් ලෙස නම් කරන ලද නෙගටිව් සාම්පලයක් එම පරීක්ෂණය යටතේ ම නැවත පරීක්ෂණයට ලක් කළ විට නෙගටිව් ප්‍රතිඵල ලැබීමයි. සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල යනු දෝෂ සහගත පොසිටිව් ප්‍රතිඵල වේ. එනම් පොසිටිව් ලෙස හඳුනාගනු ලබන නෙගටිව් සාම්පල් ය. සත්තකින්ම කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ හමුවන්නේ මෙයයි. ඔවුන්ගේ පත්‍රිකාවේ මුල් PDF පිටපතේ 6 වැනි පිටුව තුළ කතුවරුන් විසින් පවසනු ලබන්නේ ඉතා හොඳින් පාලනය කරන ලද විද්‍යාගාර තත්ත්වයන් යටතේ පවා මෙම පරීක්ෂණය විසින් සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල සැළකිය යුතු සංඛ්‍යාවක් ජනනය කරනු ඇති බවයි:

> ***“තනි තනි පරීක්ෂණ ප්‍රතික්‍රියාවන් 4 ක් තුළ දුර්වල ප්‍රාරම්භක ප්‍රතික්‍රියාකාරිත්වය දක්නට ලැබුණ ද එම පරීක්ෂණය යටතේම ඒවා නැවත පරීක්ෂණයට ලක් කළ විට ඒවා නෙගටිව් විය. මෙම සංඥාවන් හා කිසිදු නිශ්චිත වෛරසයක් අතර සම්බන්ධතාවක් නැත. එමෙන්ම ප්‍රාරම්භක පොසිටිව් ප්‍රතික්‍රියාකාරිත්වය දක්නට ලද සෑම වෛරසයක් සඳහාම, එම වෛරස්ම ඉහළ සාන්ද්‍රණවලින් යොදන ලද සාම්පලවලින් පොසිටිව් ප්‍රතිඵල නොලැබුණි. ඉහත විස්තර කරන ලද පුළුල් තාක්ෂණික සුදුසුකම් යටතේ එම ප්‍රතිඵල සැළකිල්ලට ගැනීමේදී මෙම ප්‍රාරම්භක ප්‍රතික්‍රියාකාරිත්වය යථා-කාලීන PCR ප්‍රෝබවල රසායනික අස්ථායිතාවක් නිසා නොව බොහෝ විට මෙම ඇගයීම් අධ්‍යයනයේදී නව නිර්ණ පරීක්ෂණ සහ පාලක පරීක්ෂණ (diagnostic tests and controls) ක්ෂණිකව හඳුන්වා දීම හේතුවෙන් සිදු වූ අත්වැරදීම් නිසා බවට නිගමනය කෙරිණි ”. [1]***

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් විස්තර කරන පරීක්ෂණය සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල ජනනය කරන බවට මෙම උද්ධෘතයේ පළමු වාක්‍ය පැහැදිලි සාක්ෂියකි. සුපිරි විද්‍යාගාරයක් වන Charité හිදී මනා ලෙස පාලනය කරන ලද තත්ත්වයන් යටතේ වුව ද මූලික පරීක්ෂණ 310 කින් 4 ක් සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල (අර්ථකතනයට අනුව) විය. නෙගටිව් සාම්පල 4 ක් ආරම්භයේදී පොසිටිව් වූ අතර පසුව නැවත පරීක්ෂණයට ලක් කිරීමේ දී ඒවා නෙගටිව් විය. සාවද්‍ය පොසිටිව් පිළිබඳ මෙය සම්භාව්‍ය උදාහරණයකි. නමුත් මෙහිදී කතුවරුන් විසින් ඒවා සාවද්‍ය පොසිටිව් ප්‍රතිඵල ලෙස හඳුන්වා දෙන්නේ නැත. එය බුද්ධිමය වංචාවකි.

ඉහත උද්ධෘතය තුල ඇති අනෙකුත් වැල්වටාරම් නිරීක්ෂණ නම් මෙම සාවද්‍ය ප්‍රතිඵල කතුවරුන් විසින් ***“ නව නිර්ණ පරීක්ෂණ ක්ෂණිකව හඳුන්වා දීම හේතුවෙන් සිදු වූ අත්වැරදීම් ”*** බවට කෙරෙන පැහැදිලි කිරීමය. පරීක්ෂණයේ කතුවරුන්ගේ තත්ත්වය එබඳු නම්, අවශ්‍යවන සියලු විස්තර සාමාන්‍යයෙන් අඩංගු ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් (SOP) පවා නොමැති ව මෙම පරීක්ෂණය හඳුන්වා දීමට සිදුවන සෙසු විද්‍යාගාර පත්වන තත්ත්වය මොහොතකට සිතේ මවාගන්න.

8. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව ප්‍රතිවිමර්ශනයකට ලක් කර නැත
The Corman-Drosten paper was not peer-reviewed

විද්‍යාත්මක සහ වෛද්‍ය විද්‍යාත්මක ලිපි ශාස්ත්‍රීය ජර්නලයක් තුළ විධිමත් ලෙස ප්‍රකාශයට පත් කිරීමට පෙර සම්ප්‍රදායිකව සහතික කරනු ලබන්නේ “ප්‍රතිවිමර්ශන”(peer review) ක්‍රියාවලියක් මගිනි. මෙම ක්‍රියාදාමයේදී ජර්නලයේ සංස්කාරකවරුන් විසින් අදාළ පත්‍රිකාව හෝ ලිපිය ඇගයීමට ලක් කරමින් එහි අනුමාන, විධික්‍රම, සහ නිගමන තුළ දුර්වලතා හඳුනාගැනීමට කටයුතු කළ විවිධ විශේෂඥයන්ගෙන් හෙවත් “විමර්ශකයන්ගෙන්“ උපදෙස් ලබාගනිති. සාමාන්‍යයෙන් ජර්නලයක් විසින් යම් ලිපියක් පළ කරනු ලබන්නේ ලිපියේ කර්තෘ වරුන් විසින් එහි ඉහත සඳහන් විමර්ශකයන් විසින් පෙන්වා දෙන ලද කරුණුවලට ප්‍රතිචාර දක්වා ඇතැයි යන්න ජර්නලයේ සංස්කාරකවරුන් සෑහීමකට පත්වන්නේ නම් සහ පත්‍රිකාව තුළ ඉදිරිපත් කර ඇති දත්ත මගින් එය විසින් එළැඹී ඇති නිගමනයන් තහවුරු කිරීමට ආධාරවන්නේ නම් පමණි. මෙම ක්‍රියාදාමය යුරෝසර්වේලන්ස් සඳහා ද විස්තර කර ඇත [16].

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව යුරෝසර්වේලන්ස් වෙත ඉදිරිපත්කර ඇත්තේ 2020 ජනවාරි 21 වැනිදා ය. එය ප්‍රසිද්ධ කිරීම සඳහා අනුමැතිය දී ඇත්තේ 2020 ජනවාරි 22 වැනිදා ය. ජනවාරි 23 වැනි දින එය අන්තර් ජාලයට එක් කර තිබිණි. 2020 ජනවාරි 13 වැනි දින ප්‍රොටොකෝලයේ 1-0 සංස්කරණය ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානයේ වෙබ් අඩවිය තුළ ප්‍රසිද්ධ කර තිබිණි [17]. එය පසුව 2020 ජනවාරි 17 වැනි දින ලිපියේ සංස්කරණ 2-1 ලෙස යාවත්කාලීන කර තිබේ [18]. ලෝක සෞඛ්‍ය සංවිධානය මගින් මෙම කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව පිළිගෙන ඇත්තේ එය ජනවාරි 23 වැනිදින යුරෝසර්වේලන්ස් විසින් ප්‍රසිද්ධියට පත් කිරීමට පවා පෙරය.
සාමාන්‍යයෙන් ප්‍රතිවිමර්ශනයක් වූ කලී බොහෝසෙයින් කාලය වැයවන ක්‍රියාවලියක් වන අතර අඩුම වශයෙන් අදාළ ක්ෂේත්‍රය පිළිබඳ විශේෂඥයන් දෙදෙනෙකු විසින්වත් ඉදිරිපත් කරන ලද පත්‍රිකාව විවේචනාත්මක කියැවීමකට ලක් කර ඒ පිළිබඳව අදහස් දැක්විය යුතුව තිබේ.

අපගේ අදහස අනුව මෙම කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව ප්‍රතිවිමර්ශනයකට ලක් කර නැත. සම්පූර්ණ ප්‍රතිවිමර්ශනයක් සිදු කිරීමට පැය 24 ක් කොහෙත්ම ප්‍රමාණවත් නොවේ. අපගේ නිගමනයට ආධාර සපයන්නේ අප විසින් සොයා ගන්නා ලද, SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා මෙම PCR පරීක්ෂණය නිර්ණය මෙවලමක් ලෙස සම්පූර්ණයෙන්ම නොගැලපෙන්නක් බවට පත් කිරීමට හේතු වී ඇති, එය තුළ පවත්නා බරපතල සැලසුම් දෝෂ අතිවිශාල සංඛ්‍යාවයි. RT-PCR පරීක්ෂණ සැලසුම් පිළිබඳ අවබෝධයක් ඇති ඕනෑම මොලිකියුල ජීව විද්‍යාඥයෙකු කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ ඇති බරපතල වැරදි ඉතා පහසුවෙන් සැබෑ ප්‍රතිවිමර්ශන ක්‍රියාදාමයකට පෙර නිරීක්ෂණය කරනු ඇත.

2020 ඔක්තෝබර් 26 වැනි දින අප වෙත ප්‍රතිවිමර්ශන වාර්තාවේ පිටපතක් එවන ලෙස යුරෝසර්වේලන්ස් වෙතින් ඉල්ලා සිටියෙමු. මේ දක්වාම එම වාර්තාව අප වෙත ලැබී නැති අතර යුරෝසර්වේලන්ස් හි සත්කාරකයා ලෙස වසංගත රෝග වැළැක්වීම සහ පාලනය පිළිබඳ යුරෝපීය මධ්‍යස්ථානය (The European Centre for Disease Prevention and Control- ECDC) විසින් 2020 නොවැම්බර් 18 වැනි දින අප වෙත එවන ලද ලිපියක් මගින් කිසිදු වාස්තවික සහ විද්‍යාත්මක හේතු දැක්වීමකින් තොරව අපගේ ඉල්ලීම ප්‍රතික්ෂේප කොට තිබිණි. එයට ප්‍රතිවිරුද්ධ ලෙස ඔවුන් ලියා තිබුණේ “තොරතුරු අනාවරණය මගින් විද්‍යාත්මක පරීක්ෂණයේ අරමුණුවලට බාධා පමුණුවනු ඇත.“යි යන්නයි [24]

9. කර්තෘවරුන්ම සංස්කාරකයන් බවට පත්වීම
Authors as the editors

අවසාන කරුණ වූකලී අතිශය සැළකිල්ලට ගත යුතු දෙයකි. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ කතුවරුන් දෙදෙනෙක් වන ක්‍රිස්ටියන් ඩ්‍රොස්ටන් සහ ෂන්තාල් රොයිස්කන් යුරෝසර්වේලන්ස් ජර්නලයේ සංස්කාරක මණ්ඩලයේද සාමාජිකයන් බව හෙළිදරව් විය [19]. මෙය අවශ්‍යතාවන් පිළිබඳ ගැටුම්කාරී තත්ත්වයක් (conflict of interest) මතු කරන අතර එය විසින් මෙම පත්‍රිකාව ප්‍රතිවිමර්ශනයකට ලක් කර නැතැයි යන සැකය තවදුරටත් ශක්තිමත් කරයි. කඩිමුඩියේ පත්‍රිකාව ප්‍රකාශයට පත් කිරීමට හැකියාව ලැබී ඇත්තේ පත්‍රිකාවේ කතුවරුන් යුරෝසර්වේලන්ස් ජර්නලයේ සංස්කාරක මණ්ඩලයේ සාමාජිකයන් ද වීම නිසා බව පැහැදිලිය. **මෙම භාවිතය විසින් විද්‍යාත්මක ගෞරවය කෙලෙසා දමා තිබේ.**

පත්‍රිකාව තුළ හමු වූ දෝෂ පිළිබඳ සංක්ෂිප්ත විස්තරය

කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ පහත දැක්වෙන විශේෂිත වැරදි අන්තර්ගත වේ.

1. අතිශය ඉහළ ප්‍රයිමර් සාන්ද්‍රණ භාවිතය ගැන කිසිදු විශේෂිත හේතුවක් මෙම ප්‍රොටොකෝලය තුළ දක්වා නැත. විස්තර කරන ලද සාන්ද්‍රණයන් විසින් නිශ්චිත නොවන බන්ධන සිදුකිරීම සහ PCR නිෂ්පාදන පිටපත් සංඛ්‍යාව අධික ලෙස ඉහළ නැංවීමක් කරා යොමු කරන අතර එය විසින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසු එකක් බවට පත් කරනු ලබයි.

2. නිශ්චිත නොකරන ලද අස්ථායි ස්ථාන 6 ක් විසින් මෙම පරීක්ෂණයට අදාල ප්‍රායෝගික විද්‍යාගාර ක්‍රියාකාරකම් තුළ අසීමාන්තික විචල්‍යයන් ඇති කරනු ලබයි. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව තුළ දක්නට ඇති ව්‍යාකූල සහ නිශ්චිතව දක්වා නැති විස්තර කිරීම් ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් ප්‍රොටොකෝලයක් සඳහා නොගැලපෙයි. එමගින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසු එකක් බවට පත් කරනු ලබයි.

3. මෙම පරීක්ෂණයට සම්පූර්ණ වෛරසයක් හා වෛරස කැබැලිති වෙන්කර හඳුනාගැනීමට නොහැකිය. එහෙයින් එය ආසාදක වෛරස නිර්ණයෙහිලා භාවිතා කළ නොහැකිය. එමගින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසු එකක් බවට පත් කරනු ලබන අතර ආසාදනයක පැවැත්ම අනුමාන කරයි.

4. ප්‍රයිමර් යුගල-1 (primer pair1 RdRp_SARSr_F සහ RdRp_SARSr_R)සඳහා සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වයට (annealing temperature- Tm) අදාළ 10° C ක වෙනස විසින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසු එකක් බවට පත් කරනු ලබයි.

5.සාම්පලයක් පොසිටිව් හෝ නෙගටිව් ලෙස සැලකිය යුතු බහුගුණන චක්‍ර සංඛ්‍යාව (Ct value) දැක්වීමෙන් මුළුමණින්ම මඟහැර යාම අතිශය බරපතල දෝෂයකි. පසුව ඉදිරිපත් කරන ලද සංස්කරණ තුළ ද මෙම බහුගුණන චක්‍ර සංඛ්‍යාව (Ct value) ඇතුළත් කොට නැත. එවිසින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසු එකක් බවට පත් කරනු ලබයි.

6. PCR නිෂ්පාදන මොලිකියුල මට්ටමේදී තහවුරු කර නැත. මෙම කරුණ විසින් මෙම ප්‍රොටොකෝලය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස අප්‍රයෝජනවත් දෙයක් බවට පත් කර තිබේ.

7. මෙම PCR පරීක්ෂණය තුළ SARS-CoV-2 සඳහා එහි සුවිශේෂකත්වය ඇගයීමට ලක්කරන පැහැදිලි පොසිටිව් පාලකයක් හෝ සෙසු කොරෝනා වෛරස නොපවතින බවට තහවුරු කිරීමට නෙගටිව් පාලකයක් අන්තර්ගත නොවේ. එහෙයින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසුය.

8. කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ පරීක්ෂණ සැලසුම ඉතා අපැහැදිලි සහ දෝෂ සහගත වන අතර යමෙකු එමගින් දුසිම් ගණන් වෙනස් දිශාවන්ට යොමු විය හැකිය. කිසිවක් ප්‍රමිතියට අනුකූල නොවනවාක් මෙන්ම ප්‍රමිතිගත මෙහෙයුම් පරිපාටියක් ද නැත. මෙය විසින් පත්‍රිකාවේ විද්‍යාත්මක වලංගු බව බරපතල ප්‍රශ්නකිරීමකට ලක් කරන අතර එය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසු එකක් බවටද පත්කරනු ලබයි.

9. බොහෝ සෙයින් පෙනී යන පරිදි කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව සඳහා ප්‍රතිවිමර්ශනයක් සිදු කර නැත. එහෙයින් මෙම පරීක්ෂණය SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා විශේෂිත නිර්ණ මෙවලමක් ලෙස භාවිතයට නුසුදුසුය.

10. අවම වශයෙන් පත්‍රිකාවේ කර්තෘවරුන් 4 දෙනෙකු සම්බන්ධයෙන් ඉතා බරපතල“අවශ්‍යතා පිළිබඳ ගැටුම්කාරී තත්ත්වයන්” (conflicts of interest) මතුව ඇති බව අපට හමුවිය. ඒ කෝර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ කතුවරුන් දෙදෙනෙකු (ක්‍රිස්ටියාන් ඩ්‍රොස්ටන් සහ ෂන්තාල් රොයිස්කන්) යුරෝසර්වේලන්ස් ජර්නලයේ සංස්කාරක මණ්ඩල සාමාජිකත්වය ද දැරීමට අමතරවය. 2020 ජූලි 29 වැනි දින තවත් “අවශ්‍යතා පිළිබඳ ගැටුමක්” එක් විය. එනම් ඔල්ෆර්ට් ලාන්ඩ්ට් TIB-Molbiol සමාගමේ ප්‍රධාන විධායක නිලධාරියා (CEO) වන අතර මාර්කෝ කයිසර් GenExpress සමාගමේ ජ්‍යෙෂ්ඨ පර්යේෂකයෙක් ලෙස කටයුතු කරන අතරම TIB-Molbiol සමාගම සඳහා විද්‍යා උපදේශකයෙකු ලෙස ද කටයුතු කිරීමය.

මෙම තොරතුරු පළමු සංස්කරණය තුළ ප්‍රකාශයට පත් කර නොතිබිණ. (එමෙන්ම PubMed සංස්කරණය තුළ තවමත් එම තොරතුරු අඩංගු කර නැත) . TIB-Molbiol සමාගම වූ කලී කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ අත්පිටපතේ වූ ප්‍රොටොකෝලය මත පදනම් ව PCR ටෙස්ට් කට්ටල නිෂ්පාදනය (Light Mix) ආරම්භ කරන ලද පළමු සමාගමයි. ඔවුන්ගේම වදන්වලට අනුව, ඔවුහු මෙම ටෙස්ට් කට්ටල බෙදාහැරීම ආරම්භ කළේ පත්‍රිකාව ඉදිරිපත් කිරීමටත් පෙරය. [20];
වික්ටර් කෝර්මන් සහ ක්‍රිස්ටියන් ඩ්‍රොස්ටන් ඔවුන්ගේ තවත් සම්බන්ධයක් පිළිබඳ සඳහන් කිරීමට අසමත්ව තිබේ. එනම් වාණිජ පරීක්ෂණ විද්‍යාගාරයක් වන “Labor Berlin” සමාගම සමග ඔවුන්ට ඇති සබඳතාවයි. ඔවුන් දෙදෙනාම එම සමාගම තුළ වෛරස් නිර්ණ කටයුතු සම්බන්ධයෙන් වගකීම් දරන අතර [21] එම සමාගම යථාකලීන PCR පරීක්ෂණ සිදු කරයි.

SARS-CoV-2 වෛරසය හඳුනාගැනීම සඳහා කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාව විසින් විස්තර කරනු ලබන පරීක්ෂණ ප්‍රොටොකෝලය සම්බන්ධයෙන් අප විසින් සිදු කරන ලද පුනර්පරීක්ෂණයේ ආලෝකය තුළ අප විසින් හඳුනාගන්නා ලද සැළකිල්ලට ගත යුතු ඉහත සඳහන් දෝෂ සහ ආවේණික දුර්වලතා නිසා SARS-CoV-2 PCR පරීක්ෂණය අප්‍රයෝජනවත් දෙයක් බව අප විසින් නිගමනය කරන්නට යෙදුණි.

නිගමනය

කුමන පරීක්ෂණ ප්‍රොටොකෝලයක් ප්‍රසිද්ධ කරන්නේ ද යන්න සහ එය පුළුල් වශයෙන් බෙදාහැරීම පිළිබඳව තීරණය පවතින්නේ යුරෝසර්වේලන්ස් ජර්නලයේ දැත් මතය. කොර්මන්-ඩ්‍රොස්ටන් පත්‍රිකාවේ දක්නට ලැබෙන දෝෂ පිළිගැනීම මගින් දැනට සිදුවෙමින් පවතින මානුෂික දුක්පීඩාවන් අවම කරගැනීමට හැකිවනු ඇත.
මෙම පත්‍රිකාව ඉවත් කිරීම යුරෝසර්වේලන්ස්හිම යහපත පිණිස හේතු නොවන්නේද? අපගේ නිගමනය පැහැදිලිය. අප විසින් මෙහිලා විස්තර කරන ලද PCR ප්‍රොටොකෝල සැලසුමේ ඇති අතිවිශාල සැලසුම් දෝෂ සහ සාවද්‍යතා හමුවේ විද්‍යාත්මක අවංකත්වයේ සහ වගකීමේ රාමුව තුළ වෙනත් විකල්පයක්
ඉතුරුව නැත

උපකාරක සටහන්

1.Viral load - වෛරස් භාරය

වෛරස් භාරය යනු දෙන ලද ජීව විද්‍යාත්මක හෝ පාරිසරික ද්‍රව නියැදියක අඩංගු වෛරස් ප්‍රමාණයක සංඛ්‍යාත්මක ප්‍රකාශනයයි. ජීව විද්‍යාත්මක නැතහොත් ශාරීරික ද්‍රව ලෙස සැළකෙනුයේ රුධිර ප්ලාස්මාව සහ ශ්වසන පද්ධතිය ආශ්‍රිත ශ්ලේෂ්මල ස්‍රාවයන් හෝ කෙළයයි. පාරිසරික ද්‍රව නිදර්ශක ලෙස සැළකෙනුයේ බාහිර පරිසරයේ ඇති ජලය වැනි ද්‍රවයන්ය.වෛරස් භාරය මිලි ලීටරයක අඩංගුවන වෛරස් අංශු හෝ ආසාදක අංශු ලෙස සාමාන්‍ය යෙන් විස්තර වේ. වෛරස් භාරය ආසාදනයක තීව්‍රතාව සමග අන්‍යෝන්‍ය සම්බන්ධතාවක් දක්වයි.

2. Screening -නිවාරක පරීක්ෂණය

නිවාරක පරීක්ෂණය යනු රෝගී යැයි සැළකෙන යම් පුද්ගලයෙකු හෝ සමූහයක් තුළ තවමත් හඳුනාගත නොහැකි වූ තත්ත්වයන් සහ අවදානම් සළකුණු සොයා බැලීමට යොදාගනු උපායමාර්ගයකි. මෙම පරීක්ෂණ ක්‍රමය පුද්ගලයෙකු හෝ සමූහයක් සම්බන්ධයෙන් භාවිතා කළ හැකිය. පරීක්ෂාවට ලක් කරන ලද පුද්ගලයන් රෝගයක ලක්ෂණ පෙන්නුම් නොකරනවා විය හැකිය. නැතහොත් ඔවුන්ටම තමන් රෝගී තත්ත්වයක සිටින බව නිශ්චිත ලෙස හඳුනා ගත නොහැකි රෝග ලක්ෂණ එකක් හෝ දෙකක් පෙන්වනවා විය හැකිය.

3.complementary DNA (cDNA) - අනුපූරක DNA

ජානවේදයේදී අනුපූරක ඩී.එන්.ඒ. හෙවත් complementary DNA (cDNA) යනුවෙන් හැඳින්වෙන්නේ ඒක දාම RNA වලින් සංශ්ලේෂණය කරනු ලබන DNA ය. උදාහරණ ලෙස මෙසෙන්ජර් RNA (mRNA) හෝ මයික්‍රෝ RNA (mRNA)දැක්විය හැකිය. ක්ලෝනීකරණයට මගින් යුකාරියෝටික් ජාන (eukaryotic genes) ප්‍රොකාරියෝටිස් ජාන බවට පත් කිරීමට cDNA බහුල වශයෙන් යොදා ගැනේ. සාමාන්‍ය යෙන් යම් සෛලයක් තුළ ප්‍රකාශනය නොවන විශේෂිත ප්‍රෝටීනයක් එම සෛලය තුළ ප්‍රකාශනය කිරීමට විද්‍යාඥයන්ට අවශ්‍ය වූ විට ඔවුහු එම ප්‍රෝටීනය සඳහා වන කේත එම ප්‍රතිග්‍රාහක සෛලය තුළට ඇතුළු කරයි. මොලිකියුල ජීව විද්‍යාවේදී , RNA වල පිටපත් විශ්ලේෂණය සඳහා cDNA ජනනය කරයි

4. ජාන ප්‍රතිලේඛන (Transcriptome)

ජාන ප්‍රතිලේඛන යනු පුද්ගලයෙකු හෝ සෛල ගහණයක් තුළ තුළ කේතීය (coding) හෝ නිර්කේතීය (non-coding) RNA ද ඇතුළත් සියලු RNA ප්‍රතිලේඛන ගොනුවල එකතුවයි. Transcriptome යන යෙදුම ඇතැම් විට සියලුම RNA හෝ හුදෙක් mRNA, සඳහා යොදාගනු ලබයි. එය පරීක්ෂණයට ඇති අදාළත්වය මත රඳා පවතී.

5.transcriptomic profiles- ජාන ප්‍රතිලේඛන ආකෘති

සෛලයක පවත්නා තත්ත්වය නිර්ණය කිරීම සඳහා ජාන ප්‍රකාශන රටාවන් සොයාගැනීමට හෝ සමාන ප්‍රකාශන රටාවන් ඇති ජාන හඳුනාගැනීමට ගෝලීය ජාන ප්‍රතිලේඛන ආකෘතිකරණය අතිශයින් වැදගත් මෙහෙයක් ඉටුකරයි. නිශ්චිත සෛල වර්ගයක ජානමය නියාමනය (genetic regulation) අවබෝධ කරගැනීම සඳහා ජාන ප්‍රතිලේඛන ආකෘති (transcriptome profiling) භාවිතා කිරීම මෑත වසරවලදී බොහෝ සෙයින් සිදුව ඇත. යම් ජීව ඒකකයක් තුළ ප්‍රකාශනයට පත්වන සමස්ත මෙසෙන්ජර් රයිබොනියුක්ලික් අම්ල මොලිකියුල (mRNA) සංඛ්‍යාව ජාන ප්‍රතිලේඛන ලෙස නිර්වචනය කෙරී ඇත. ජාන ප්‍රතිලේඛන විසින් නියෝජනය කරනු ලබන්නේ RNA මොලිකියුල බවට පිටපත් කරන ලද කරන ලද සමස්ත ජානමය කේතවලින් ඉතා සුළු ප්‍රමාණයක් පමණි. එහෙත් සෛලවල ක්‍රියාකාරිත්වය පවත්වාගනු ලබන වැදගත් ජීව විද්‍යාත්මක ක්‍රියාකාරිත්වයන් පිළිබඳව එය විසින් වටිනා තොරතුරු ඉදිරිපත් කරයි.

6. GC-content - GC- අන්තර්ගතය

ජාන සහ මොලිකියුලර් ජීව විද්‍යාවේදී, GC- අන්තර්ගතය නැතහොත් **ග්වානින්- සයිටෝසින් අන්තර්ගතය** □□□ DNA හෝ RNA වල පවතින ග්වානින් (G) හෝ සයිටෝසින් (C)යන නයිට්‍රජන් භෂ්ම දෙකෙහි ප්‍රතිශතයයි. එනම් DNA වල GC අන්තර්ගතය යනු එහි අන්තර්ගතවන භෂ්ම 4 වන සයිටෝසින්, ග්වානින්, ඇඩිනින් සහ තයමින්වල සමස්ත එකතුවේ ප්‍රතිශතයක් ලෙස ග්වානින් සහ සයිටෝසින් අගය දැක්වීමයි. RNA වල නම් සයිටෝසින් , ග්වානින්, ඇඩිනින් සහ යුරාසිල් භෂ්ම 4 සමස්ත එකතුවේ ප්‍රතිශතයක් ලෙස ග්වානින් සහ සයිටෝසින් අගය දැක්වීමයි

GC-අන්තර්ගතයේ අගය එක්කෝ DNA හෝ RNA වල කොටසක් සඳහා හෝ සමස්ත ගෙනොමය සඳහාම මනිනු ලැබේ. නිශ්චිත ජාන කොටසකට අදාළව නම් එම තනි ජාන යට හෝ ජානයේ එක් අංශයකට (domain), ජාන සමූහයකට හෝ ජාන පොකුරකට, නිර්කේත කලාපයකට හෝ ප්‍රයිමර් වැනි කෘත්‍රිම ඔලිගොනියුක්ලියෝටයිඩ වලට අනුරූපව දැක්වේ.

DNA දාමය තුළ දී විශේෂිත හයිඩ්‍රජන් බන්ධන මගින්, ග්වානින් (G) සම්බන්ධ වන්නේ සයිටොසින් (C) සමගය. ඇඩිනින් (A) සම්බන්ධ වන්නේ තයමින් (T) සමගය. RNA දාමයක් තුල දී ඇඩිනින් (A) සම්බන්ධවනුයේ යුරාසිල් (U) සමගය. ග්වානින් සහ සයිටොසින් භෂ්ම යුගල එකිනෙකා අතර සම්බන්ධවන්නේ හයිඩ්‍රජන් බන්ධන 3 කින් වන අතර ඇඩිනින් සහ තයමින් භෂ්ම යුගල ද, ඇඩිනින් සහ යුරාසිල් භෂ්ම යුගල ද එකිනෙකා සමග සම්බන්ධ වන්නේ හයිඩ්‍රජන් බන්ධන 2 ක් මගිනි. මෙම වෙනස නිරූපණය කරනු සඳහා ඒවා "G≡C","A=T" සහ "A=U" ලෙස දැක්වේ.

අඩු GC අන්තර්ගතයක් සහිත DNA ඉහල GC-අන්තර්ගතයක් සහිත DNA වලට සාපේක්ෂව ස්ථායි බවින් අඩුය. කෙසේ වුවද හුදෙක් හයිඩ්‍රජන් බන්ධන නිසාම මොලිකියුල වල ස්ථායිතාවට විශේෂ බලපෑමක් සිදු නොවේ. ප්‍රධාන වශයෙන්ම එය රඳා පවතිනුයේ භෂ්ම ගොනුව තුළ මොලිකියුලවල අන්තර් ක්‍රියාවන් මතය. නියුක්ලික් අම්ලයක GC-අන්තර්ගතය ඉහළ අගයක් ගනී නම් එම නියුක්ලික් අම්ලයට ඉහළ තාපස්ථායිතාවක් හිමිවේ. ඉහල GC-අන්තර්ගතයක් අඩංගු DNA වලින් සමන්විත සමහර බැක්ටීරියා විශේෂ සෛලයේ ජීව කාලය අඩුවීම හේතුවෙන් ඉතා ඉක්මණින් ස්වයංජීරණයකට පත්වන බව නිරීක්ෂණය කර තිබේ. ඒ එහි GC යුගලවල තාපස්ථායිතාව හේතුවෙනි. ඉහළ අන්තර්ගතයක් පැවතීම ඉහළ උෂ්ණත්වයන් තුළ පැවැත්ම සඳහා අත්‍යවශ්‍ය අනුවර්තනයක් ලෙස මීට පෙර අනුමාන කළ ද එම අනුමානය 2001 දී ප්‍රතික්ෂේප විය.

AU භෂ්ම යුගල සාපේක්ෂව GC භෂ්ම යුගලවලට වඩා අඩු ස්ථායිතාවකින් යුතුය. ඉහළ GC-අන්තර්ගතයක් සහිත RNA ව්‍යුහයන් ඉහල උෂ්ණත්වයක් සඳහා වැඩි ප්‍රතිරෝධයක් දක්වයි.

7. Taq-Pol / Taq-Polymerase -ටැක්-පොල් / ටැක් පොලිමරේස්

ටැක්-පොල් හෙවත් ටැක් පොලිමරේස් යනු තර්මස් අක්වාරිකස් (Bakteriums Thermus aquaticus-Taq) බැක්ටීරියාවේ තාපස්ථායි DNA පොලිමරේස්ය. මෙම බැක්ටීරියාව 70 °C ක් පමණ උෂ්ණත්වයක් සහිත උණුදිය උල්පත්වල ජීවත් වේ. ටැක්- පොලිමරේස් එක්ස්ට්‍රිමෝසයිම් නම් එන්සයිම ගණයට අයත්වන අතර අසාමාන්‍ය ලෙස තාපයට ඔරොත්තු දෙයි. මෙය කෙටියෙන් Taq හෝ Taq pol ලෙස දැක්වේ. පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව (polymerase chain reaction-PCR)සඳහා මෙය නිතර උපයෝගී කර ගැනේ.

ටැක් ක්‍රියාකාරි වීම සඳහා ප්‍රශස්ත උෂ්ණත්වය 75–80°C වේ. 92.5°C දී පැය දෙකකට වැඩි අර්ධ ජීව කාලයක් සහිත එය, 95°C දී මිනිත්තු 40 ක්ද, 97.5 °C දී මිනිත්තු 9 ක් ද වශයෙන් පැවැත්මට සමත්ය. උෂ්ණත්වය 72 °C. දී තත්පර 10 කට අඩු කාලයක් තුළ දී එය වල භෂ්ම යුගල 1000 ක් ප්‍රති නිෂ්පාදනය කිරීමට සමත් වේ. 75-80 °C දී සිය ප්‍රශස්ත පොලිමරේස්කරණ අනුපාතය වන එක් එන්සයිම මොලිකියුලයක් සඳහා එක් තත්ත්පරයකට නියුක්ලියෝටයිඩ 150 ක අගයට ළඟා වීමට සමත් වේ. ප්‍රශස්ත උෂ්ණත්ව අනුපාත පරාසය වෙතින් සිදුවන කවර

අපගමනයක් වුව ද ව්‍යාප්ත අනුපාතය ඇණ හිට වීමට හේතු වේ.
තනි ටැක් පොලිමරේසයක් විසින් 70 °C උෂ්ණත්වයේදී තත්පරයකට නියුක්ලියෝටයිඩ 60 ක් සංශ්ලේෂණය කිරීමට සමත් වේ. 55 °C දී එය විසින් තත්පරයකට නියුක්ලියෝටයිඩ 24 ක් ද, 37 °C දී තත්පරයකට නියුක්ලියෝටයිඩ 1.5 ක් ද, 22 °C දී තත්පරයකට නියුක්ලියෝටයිඩ 0.25 ක් ද එය විසින් සංශ්ලේෂණය කරයි. 90 °C දී ටැක් විසින් එක්කො ඉතා අවම ක්‍රියාකාරිත්වයක් දක්වන අතර නැතහොත් එය නිෂ්ක්‍රිය තත්ත්වයේ පවතින අතර එන්සයිමයේ ස්වභාවයට හානියක් නොවේ. ප්‍රතික්‍රියාව සිදුවන භාජනය තුළ යම් නිශ්චිත අයන පැවතුණහොත් එය එන්සයිමයේ විශේෂිත ක්‍රියාකාරිත්වයන් සඳහා බලපෑමක් සිදු කරයි.
පොටැසියම් ක්ලෝරයිඩ (KCl) ස්වල්පයක් සහ මැග්නිසියම් අයන ($Mg2+$) විසින් එන්සයිමයේ ක්‍රියාකාරිත්වය වර්ධනය කරයි. පොටැසියම් ක්ලෝරයිඩ මිලිමවුල 50 ක් (50mM KCl) විසින් සහ නියුක්ලියෝසයිඩ ට්‍රයිපොස්පේට් (nucleoside triphosphates-dNTPs)සාන්ද්‍රණය විසින් තීරණය කරනු ලබන නිවැරදි මැග්නිසියම් අයන සාන්ද්‍රණයක් විසින්ටැක් පොලිමරේසය උපරිම වශයෙන් සක්‍රිය කරයි. පොටැසියම් ක්ලෝරයිඩ සහ මැග්නිසියම් අයන වල ඉහළ සාන්ද්‍රණය විසින් ටැක් ක්‍රියාකාරිත්වය නතර කරයි.
ටැක් පොලිමරේස්වල එක් අවාසි සහගත තත්ත්වයක් නම් 3' සිට 5' දිශාව දක්වා එක්සෝනියුක්ලේස් සෝදුපත්බැලීමේ ක්‍රමය එනම් පිටපත් නිෂ්පාදනයේදී සිදුවන වෙනස් කම් නිවැරදි කිරීමේ ක්‍රමය එහි දක්නට නොමැති වීමයි.මෙහි දෝෂ සිදුවීමේ අනුපාතය නියුක්ලියෝටයිඩ 9000 ට 1 කි. අධික උෂ්ණත්ව තුළ ජීවත් වෙන වෙනත් සමහර බැක්ටීරියාවන් ආකියාවන් ගෙන් වෙන් කරගන්නා ලද Pfu DNA පොලිමරේස් වැනි DNA පොලිමරේස් වර්ග විසින් නිවැරදි පිටපත්කරණයේ සිදුවන දෝෂ නිවැරදි කිරීමේ ක්‍රියාවලියක් සිදු කරනු ලබයි. පිටපත් කිරීමේ දෝෂ ඉතා ඉහළ අනුපාතයකින් සිදුවිය හැකි බහුගුණකරණ සඳහා ටැක් පොලිමරේස් වෙනුවට මෙම පොලිමරේස් යොදා ගනු ලැබේ. ඇතැම් විට ඒවා ටැක් පොලිමරේස් සමග සංයුක්ත කොට යොදා ගැනේ.
1980 ගණන්වලදී කාරි මුලිස් Cetus Corporation හි සේවය කරමින් සිටියදී කෘත්‍රිම DNA ජීව තාක්ෂණය සඳහා භාවිතා කිරීම පිළිබඳ පරීක්ෂණවල නිරත විය. DNA-ඔලිගෝනියුක්ලියෝටයිඩ ප්‍රෝබ ලෙස යොදාගනිමින් ඉලක්ක කරන ලද DNA දාම සමග බන්ධන සිදු කළ හැකි ආකාරයද, DNA දාම අනුක්‍රම ක්‍රියාවලිය සහ අනුපූරක-DNA (cDNA) සංශ්ලේෂණය සඳහා DNA-ඔලිගෝනියුක්ලියෝටයිඩ ප්‍රයිමර් ලෙස භාවිතා කළ හැකි ආකාරය ගැනද ඔහු දැන සිටියේය. 1983 දී ඔහු ඉලක්ක කරන ලද DNA හි එක් එක් දාමය මුහුම්කරණය (hybridize) සඳහා ද ප්‍රතික්‍රියාව සඳහා DNA-පොලිමරේස් ද එක් කිරීම සඳහා ද ප්‍රයිමර් 2 ක් භාවිතය ආරම්භ කළේය. මෙය විසින් ප්‍රයිමර් අතර තනි තනි DNA ඛණ්ඩ බහුගුණකරණය විශාල වශයෙන් සිදු කරමින් DNA පිටපත්කරණය වේගවත් කෙරිණි.
කෙසේ වුවද, සෑම පිටපත්කරණ වටයකටම පසුව සංයෝගය 90°C කට වඩා උෂ්ණත්වයකට ලක්කළ යුතුවිය. ඒ මීළඟ වටයේ පිටපත්කරණය සඳහා අච්චුවක් ලෙසින් අලුතින් නිපදවන ලද DNA භාවිතා කිරීමට එහි දාම දෙක වෙන් කිරීම සඳහාය. මෙම තාපකරණ ක්‍රියාවලිය විසින් Taq-පොලිමරේස් සොයාගැනීමට පෙර භාවිතා කරන ලද පොලිමරේස් වර්ගවල ක්‍රියාකාරිත්වය ද නතර කිරීම සිදු විය. මෙහිලා භාවිතා කිරීම සඳහා Taq-පොලිමරේස් බෙහෙවින් ගැලපුණේ එය එහි ගුණාංග එලෙසම පවත්වාගනිමින් දාම වෙන්කිරීමට අවශ්‍ය වන 95 °C වඩා උෂ්ණත්වයකට ඔරොත්තු දීමට සමත් බැවිනි.
තාපස්ථායි Taq-පොලිමරේස් භාවිතය විසින් පරීක්ෂණය ඉහළ උෂ්ණත්වයක් තුළ(~60 °C සහ ඊට ඉහළ) සිදු කිරීමට හැකියාව ලැබිණි. එමගින් ප්‍රයිමර් ඉහළ නිශ්චිත බවක් ලබාගැනීමේ පහසුකම් සැලසුන අතර ප්‍රයිමර් ඩයිමර් වැනි විශේෂිත නොවන මොලිකියුල නිෂ්පාදනය අවම කරගත හැකිවිය. තාපස්ථායි පොලිමරේස් යොදාගැනීම මගින් සෑම තාප චක්‍රයකටම නව එන්සයිම එක් කිරීමේ අවශ්‍යතාව ඉවත් විණි. තනි වසන ලද නලයක් තුළ සාපේක්ෂව සරල යන්ත්‍රයක් මගින් සමස්ත පරීක්ෂණ ක්‍රියාදාමයම පවත්වාගෙන යාහැකිය. එමගින් මොලිකියුල ජීව විද්‍යාවේ විවිධ

ක්ෂේත්‍රවල DNA විශ්ලේෂණයේදී මතුව තිබූ ගැටළු ගණනාවකට විසඳුමක් ලෙස PCR පරීක්ෂණය යොදාගත හැකි තත්ත්වයක් Taq-පොලිමරේස් භාවිතය විසින් නිර්මාණය කෙරිණ.

8. assay - පරීක්ෂණය

සංයෝගයක අන්තර්ගත නිශ්චිත සංරචකයක් පිළිබඳ ප්‍රමාණමිතික සහ ගුණාත්මක විශ්ලේෂණය.මෙම පරිවර්තනයේදී assay යන්නට "පරීක්ෂණය" යන සිංහල යෙදුම භාවිතා කර ඇත.

වෛද්‍ය විද්‍යාව, කැණීම් කටයුතු, ඖෂධවේදය, පාරිසරික ජීව විද්‍යාව, මොලිකියුල ජීව විද්‍යාව ආදී ක්ෂේත්‍රයන් තුළ කිසියම් සංයෝගයක අඩංගු කිසියම් නිශ්චිත සංරචකයක් පිළිබඳව සිදු කරන ගුණාත්මක ඇගයීමකට ලක් කිරීමට හෝ කිසියම් නිශ්චිත සංරචකයක පැවැත්ම, ප්‍රමාණය හෝ ක්‍රියාකාරිත්වය පිළිබඳව ප්‍රමාණාත්මකව මැනීමට , විද්‍යාගාරයක් තුළ සිදු කරන පරීක්ෂණ ක්‍රියාදාමය (විශ්ලේෂණාත්මක) assay නමින් හැඳින්වේ. මෙහිදී විශ්ලේෂණයට ලක්වන දෙය හෙවත් විශ්ලේෂිතය (the analyte) ඖෂධයක්, ජීව රසායනික ද්‍රව්‍යයක්, සංයෝගයක රසායනික මූලද්‍රව්‍යයක්, ජීවියෙකු හෝ ජීව සාම්පලයක් තුළ පවතින සෛලයක් විය හැකිය. මැනීමට ලක්වන දෙය විශ්ලේෂිතය, හෝ පරීක්ෂණයේ ඉලක්කය (target of the assay) ලෙස හැඳින්වේ. සාමාන්‍ය යෙන් පරීක්ෂණයක අරමුණවන්නේ එමගින් විශ්ලේෂණයට ලක්වන දෙයෙහි විශේෂිත ගුණාංග මැනීමකට ලක් කර එය ජාත්‍යන්තරව පිළිගත් මිනුම් ඒකක මගින් ප්‍රකාශයට පත් කිරීමයි. උදාහරණ ලෙස මවුලිකතාව, ඝණත්වය, එන්සයිමයක ක්‍රියාකාරිත්වය සහ බලපෑම ආදිය දැක්විය හැකිය.

9. confirmatory assay- තහවුරුකාරක පරීක්ෂණය

නිශ්චිත ප්‍රාථමික පරීක්ෂණයකදී ප්‍රතික්‍රියාකාරිත්වයක් දැක් වූ නිදර්ශක තුළ නිශ්චිත වෛරසයට අදාළ ප්‍රතිදේහ අඩංගුදැයි පරීක්ෂා කිරීමට සිදු කරන පරීක්ෂණය තහවුරුකාරක පරීක්ෂණයක් ලෙස හැඳින්වේ.

10.forward-primer and reverse primeßß- පූර්වගාමී ප්‍රයිමර් සහ අපරගාමී ප්‍රයිමර්

DNA වල ඉලක්ක කරන ලද කලාපයන් පිටපත් කිරීම ආරම්භ කිරීම සඳහා එය සමග ආංශිකව සම්බන්ධ වීමට ප්‍රයිමර් සැලසුම් කෙරේ. පූර්වගාමී ප්‍රයිමර (forward-primer සහ අපරගාමී ප්‍රයිමර (reverse primer) යනුවෙන් ප්‍රයිමර් දෙකක් සෑම PCR ප්‍රතික්‍රියාවකදීම යොදාගනු ලබයි. මෙම ප්‍රයිමර් වර්ග දෙකම ඔලිගොනියුක්ලියෝඩයිඩ වේ. ඒවායේ දිග නැතහොත් ආයාමය භෂ්ම යුගල 18-25 දක්වා විය හැකිය. DNA විඝටන ක්‍රියාදාමයේදී එය තනි අනුපූරක DNA දාම දෙකක් බවට පත්වේ. මෙයින් එක් දාමයක් ප්‍රති සංවේදී දාමය (antisense strand) ලෙස හැඳින්වෙන අතර අනෙක සංවේදී දාමය (sense strand) ලෙස හැඳින්වේ.

පූර්වගාමී ප්‍රයිමරය සහ අපරගාමී ප්‍රයිමර අතර මූලිකම වෙනස නම් පූර්වගාමී ප්‍රයිමර DNA ද්විත්ව දාම වෙන්වීමෙන් නිර්මාණය වන දාම දෙකෙන් එකක්වන ප්‍රතිසංවේදී දාමය (antisense strand) සමග බන්ධන ගොඩනැගීමත්, අපරගාමී ප්‍රයිමර බන්ධන ගොඩනගන්නේ ද්විත්ම දාම DNA හි සංවේදී දාමය (sense strand) සමගය. පූර්වගාමී ප්‍රයිමරය බන්ධන සිදු කරන්නේ DNA ප්‍රතිසංවේදී දාමයේ 3′ අන්තයේ සිට 5′අන්තය දක්වා වන දිශාවටය. අපරගාමී ප්‍රයිමරය බන්ධන සිදුකරන්නේ 5′අන්තයේ සිට 3′අන්තය දක්වාය.. එහෙයින් පූර්වගාමී ප්‍රයිමර 5′ප්‍රයිමර ලෙස ද හැඳින්වෙන අතර අපරගාමී ප්‍රයිමර 3′ ප්‍රයිමර ලෙස හැඳින්වේ. සාමාන්‍යයෙන් ප්‍රතිසංවේදී දාමය මෙසෙන්ජර් RNA හෙවත් mRNA සංශ්ලේෂණය සඳහා අච්චුවක් සේවය කරයි.

11.probes- ප්‍රෝබ

මුහුම්කරණයේදී නිශ්චිත නියුක්ලික් අම්ල අනුක්‍රම හඳුනාගැනීමසඳහා විකිරණ ක්‍රියාකාරිත්වය මගින් හෝ රසායනිකව සළකුණු කරන ලද RNA හෝ DNA ඛණ්ඩ ප්‍රෝබ ලෙස හැඳින්වේ. ප්‍රෝබවල දිග නැතහොත් ආයාමය භෂ්ම යුගල 25-1000 දක්වා විය හැකිය.ඒවා ද්විත්ව දාම සමග මුහුම්කරණය වෙයි.

12. **2019-nCoV RdRp**

මෙය SARS-CoV-2 හෙවත් 2019-nCoV වෛරසය සිය පිටපත් සෑදීමට භාවිතා කරනු ලබන පොලිමරේස් වර්ගය ලෙස සැලකේ. RdRp යනු RNA-dependent RNA polymerase යන්න හැඳින්වෙන කෙටි යෙදුමයි

13.clinical presentation

යම් රෝගී බවකට හේතුවන්නා වූ භෞතික ලක්ෂණ හෝ රෝග ලක්ෂණ සමූහය අර්ථකතනය කිරීම

14. 5′ සහ 3'

5′ සහ 3' යන්නෙන් දැක්වෙන්නේ 5 ප්‍රයිමය (five prime) සහ 3 ප්‍රයිමයයි (three prime). එමගින් DNA හි සීනි ව්‍යුහයේ කාබන් අණු ප්‍රමාණය සංකේතවත් වේ. 5' කාබන් ව්‍යුහයෙහි පොස්පේට් කාණ්ඩයක් සම්බන්ධ වී ඇති අතර 3'කාබන් ව්‍යුහයට හයිඩ්‍රොක්සිල් (-OH) සම්බන්ධ වී ඇත. මෙම අසමමිතිකතාව විසින් DNA දාමයට දිශානතියක් හිමිකර දී ඇත. නිදසුනක් ලෙස DNA පොලිමරේස් ක්‍රියාත්මක වන්නේ 5' -> 3' දිශාවටය.

15. 5′-end 5′-අන්තය (මෙය "මෙය 5 ප්‍රයිම අන්තය" ලෙසද හැඳින්වේ) නමින් හැඳින්වෙන්නේ DNA හෝ RNA දාමයක කෙළවර ඇති ඩිඔක්සිරයිබෝස් හෝ රයිබෝස් සීනි කවයේ පස්වැනි කාබන් අණුවයි. 5′අන්තයට සම්බන්ධව ඇති පොස්පේට් කාණ්ඩය විසින් නියුක්ලියෝටයිඩ දෙකක් අතර බන්ධනයක් ගොඩනැගීමට ඉඩ සැලසේ. නිදසුනක් ලෙස මෙම නියුක්ලියෝටයිඩයේ 5′-අන්තය සමග වෙනත් නියුක්ලියෝටයිඩයක 3′-hydroxyl (3′-හයිඩ්‍රොක්සිල්) කාණ්ඩයක් සමග සහසංයුජ බන්ධනයක් ගොඩ නගමින් පොස්පෝඩීස්ටර් බන්ධන ගොඩ නැංවීම දැක් විය හැකිය. 5′-පොස්පේට් කාණ්ඩය ඉවත් කිරීම මගින් බන්ධන සිදුවීම වැළැක් විය හැකිය. නියුක්ලික් අම්ලවල අනවශ්‍ය බන්ධන සිදු කිරීම වැළැක්වීමට මොලිකියුල ජීව විද්‍යාඥයන් බොහෝ විට පොස්පටේස් මගින් 5′-පොස්පේට් කාණ්ඩය ඉවත් කරනු ලබයි

16. 3′-අන්තය (3 ප්‍රයිම අන්තය)

3′-අන්තය (3 ප්‍රයිම අන්තය) යනු DNA හෝ RNA දාමයක කෙළවර නම් කරනුයේ එම අන්තයේ ඇති සීනි කවයේ 3 වන කාබන් අණුව සමග සම්බන්ධව ඇති හයිඩ්‍රොක්සිල් කාණ්ඩය හේතුවෙනි. නව නියුක්ලික් අම්ල සංශ්ලේෂණයේදී DNA හෝ RNA දාමයක 3′-අන්තයේ ඇති 3′-හයිඩ්‍රොක්සිල් වෙනත් නියුක්ලියෝටයිඩයක ඇති 5′-පොස්පේට් සමග බන්ධන සිදුකරමින් සහසම්බන්ධිත නියුක්ලියෝටයිඩ දාමයක් නිර්මාණය කරයි.
DNA පිටපත්කරණ ක්‍රියාදාමය කිසියම් අවස්ථාවක නතර කිරීමට අවශ්‍ය වූ විට මොලිකියුල ජීව විද්‍යාඥයන් 3′-හයිඩ්‍රොක්සිල් රහිත නියුක්ලියෝටයිඩ එනම් ඩයිඩිඔක්සික්සිරයිබෝනියුක්ලියෝටයිඩ (dideoxyribonucleotides) යොදාගනිති. මෙම තාක්ෂණය සන්ගර් විධික්‍රමය ලෙස හෝ ඩයිඩිඔක්සි දාම නැවතුම් ක්‍රමය (dideoxy chain-termination method)ලෙස හඳුන්වයි

17. homology- සම ප්‍රභවතාව

සමාන ගොඩනැගීමක් සහ සමාන ජානමය අන්තර්ගතයක් සහිත ක්‍රෝමසෝම හෝ ක්‍රෝමසෝම කොටස් සම ප්‍රභවතාවකින් යුතු යැයි දැක්වේ.

18. ද්‍රවක උෂ්ණත්වය - melting temperature-Tm

ද්‍රවක උෂ්ණත්වය යනු DNA ද්විත්ව දාමවලින් 50%ක් තනි දාම බවට පත් කරන උෂ්ණත්වයයි. එය සෘජුවම DNA මොලිකියුලයක ආයාමය හෙවත් දිග සහ සංයුතිය මත රඳා පවතී. දිගු බවින් වැඩි සහ ඉහළ ගුවානින්- සයිටෝසින් (GC) අන්තර්ගතයක් සහිත දාමවලට ඉහළ ද්‍රවක උෂ්ණත්වයක් අවශ්‍යය.

19. annealing temperature.- සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය

මෙම පරිවර්තනයේදී annealing temperature යන්න සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය ලෙසින් පරිවර්තනය කර ඇත. ඒ අනුපූරක DNA සමග ප්‍රයිම අනුක්‍රම බන්ධන සිදු කරන්නේ මෙම උෂ්ණත්වයේදී බැවිනි.

සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය යනු PCR ප්‍රතික්‍රියාවේ සිසිලනය කිරීමේ අදියර සිදුවන උෂ්ණත්වයයි. සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය ප්‍රයිමර්වල ද්‍රවක උෂ්ණත්වය මත දැඩි ලෙස රඳා පවතී. පූර්වගාමී සහ අපරගාමී ප්‍රයිමර දෙකම තනි DNA දාම සමග බන්ධන සිදු කිරීමට නම් සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය ප්‍රමාණවත් තරමින් අඩු මට්ටමක පැවතිය යුතුය. සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය විශාල වශයෙන් අඩු මට්ටමක පැවැතිය හොත් එකම තනි DNA දාමයේ මොලිකියුල වළලු හෝ කොණ්ඩාකටු (intramolecular hairpins) වැනි හැඩ ඇති කරමින් නැවත සම්බන්ධ විය හැකිය. මෙය පරීක්ෂණයෙන් අපේක්ෂිත ප්‍රතිඵල ලබාගැනීමට බාධාවක් වනු ඇත. එහෙයින් සංශ්ලේෂක උෂ්ණත්වය සාමාන්‍ය යෙන් ප්‍රයිමර්වල අඩුම ද්‍රවක උෂ්ණත්වයට වඩා අංශක කීපයක් (3-6) අඩුවෙන් පවත්වාගැනීමට සැලසුම් කළ යුතුය.

20. amplicon - විස්තාරිත DNA කොටස

කෘත්‍රිම හෝ ස්වාභාවික පිටපත්කරණ ක්‍රියාවලියේදී නිෂ්පාදනය කරනු ලබන DNA කොටස මෙනමින් (amplicon) හැඳින්වේ. උදාහරණයක් ලෙස පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාවේදී නිෂ්පාදනය වන DNA කොටස් දැක්විය හැකිය.

21. standard operating procedure (SOP)/ ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටිය

ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් යනු බහුලව විවිධ පුද්ගලයන් විසින් විවිධ ස්ථානවලදී සිදු කෙරෙන නිශ්චිත කාර්යයක් එක හා සමාන තත්ත්වයන් යටතේ පවත්වාගෙන යාමට අදාළ වෘත්තිකයන් වෙත නිකුත් කරනු ලබන උපදෙස් සංග්‍රහයයි. එමගින් කාර්යක්ෂමතාව ඉහළ නැංවීම, ක්‍රියාදාමයේ ඒකරූපතාව පවත්වාගැනීම ආදි අරමුණු මෙන්ම, සන්නිවේදන වැරදි අවම කිරීම, නිෂ්පාදනයේ නියාමන රෙගුලාසි පිළිපැදීමෙහිදී සිදුවන වැරදි අවම කිරීම ආදි අරමුණු ද ඉටු කරගැනීම අපේක්ෂා කෙරේ

අනුවර්තනය පිළිබඳ ජාත්‍යන්තර කවුන්සලය (International Council for Harmonisation-ICH) සායනික පර්යේෂණයන්ට අදාළ ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටිය පිළිබඳ සිය නිර්වචනයේදී මෙසේ දක්වා ඇත." ප්‍රමිතිගත ක්‍රියාපරිපාටිය යනු නිශ්චිත ක්‍රියාවක් සිදු කිරීමේදී කාර්ය සාධනයේ ඒකාග්‍රතාව ඇති කරගැනීමට අවශ්‍යවන සවිස්තාරාත්මක ලිඛිත උපදේශමාලාවයි." ඖෂධ නිෂ්පාදන ක්‍රියාවලිය තුළ සහ ඊට අදාළ අධ්‍යයනයන්වලදී ප්‍රමිතිගත ක්‍රියා පරිපාටියක් නිතරම භාවිතා කෙරේ. මෙහිදී අවධානය යොමු කරන්නේ නැවත නැවතත් එකම වෙනස් නොවන කාර්යාවලියක් සහ ක්‍රියා පරිපාටියක් භාවිතය සහ ඒවා ලේඛන ගත කිරීමයි.

22. threshold cycle /Ct value - සීමා දර්ශක චක්‍ර අගය

අගය නැතහොත් චක්‍ර සීමා දර්ශකය අගය යනු ප්‍රතික්‍රියාවක් තුළ ජනනය කරනු ලබන ෆ්ලොරසන්ස් අණු සංඛ්‍යාව එහි සීමාව කරා පැමිණීමට අවශ්‍යවන ප්‍රතික්‍රියා වාර (චක්‍ර) සංඛ්‍යාවයි. මෙය පරීක්ෂණවලදී ප්‍රතික්‍රියා චක්‍ර සංඛ්‍යාවේ දර්ශකයක් ලෙස භාවිතා කෙරේ.

23. dNTPs/Deoxynukleosidtriphosphate -ඩිඔක්සිනියුක්ලියෝට්‍රයිපොස්පේට්

ඩිඔක්සිනියුක්ලියෝට්‍රයිපොස්පේට් වූකලී DNA වල තැනුම් ඒකකයයි. ඒවා වර්ග සතරකට අයත් වේ.

එනම්,

ඇඩිනින් හස්මය සහිත ඩිඔක්සිඇඩොනොසින්ට්‍රයිපොස්ට් - dATP (Deoxyadenosintriphosphat)

සයිටෝසින් හස්මය සහිත ඩිඔක්සිසයිටඩින්ට්‍රයිපොස්පේට් - dCTP (Deoxycytidintriphosphat)

ග්වානින් හස්මය සහිත ඩිඔක්සිග්වානොසින්ට්‍රයිපොස්පේට් - dGTP (Deoxyguanosintriphosphat)

තයමින් හස්මය සහිත ඩිඔක්සිතයිමිඩින්ට්‍රයිපොස්පේට් - dTTP (Deoxythymidintriphosphat) යන සතරයි.

පාරිභාෂික ශබ්දමාලාව

cDNA-අනුපූරක **DNA**

dNTPs/Deoxynukleosidtriphosphate -ඩිඔක්සිනියුක්ලියෝට්‍රයිපොස්ෆේට්

chemoluminescence-රසායනික සංදීප්තිය

complementary sequences- අනුපූරක අනුක්‍රම

confirmatory assay - තහවුරුකාරක පරීක්ෂණය

control material - පාලක පරීක්ෂණය සඳහා යොදාගනු ලබන ද්‍රව්‍ය

diagnostic methodology - නිර්ණ ක්‍රමවේදය

double-stranded DNA - ද්විත්ව දාමයක් සහිත **DNA**

enzymatic substrate conversion-එන්සයිමික උපස්තර පරිවර්තනය

expression - ජාන ප්‍රකාශනය

GC content - ග්වානින් සහ සයිටෝසින් අන්තර්ගතය

gene-expression - ජාන ප්‍රකාශනය

genetic regulation - ජාන නියාමනය

genomic sequence - ගෙනෝමික අනුක්‍රමය

good laboratory practice or GLP- නිවැරදි විද්‍යාගාර භාවිතය

hybridisation - මුහුම්කරණය

melting temperature - ද්‍රවක උෂ්ණත්වය

Molecular biological validation - මොලිකියුල ජීව විද්‍යාත්මක වලංගුකරණය

multiple molecular technique-බහුගුණක මොලිකියුල තාක්ෂණය

non-coding region-නිර්කේත කලාපය

nonspecific bindings- නිශ්චය නොකරන ලද රසායනික බන්ධන- අවිනිශ්චිත බන්ධන

peer-reviewe - ප්‍රතිවිමර්ශනය

phylogenetic outliers - වංශප්‍රවේණික බාහිරස්ථ

protocol - කෙටුම්පත, ප්‍රොටෝකෝලය

Screening - නිවාරක පරීක්ෂණය

sequence - අනුක්‍රමය

specific - නිශ්චිත, විශේෂිත. විශේෂණය කරන ලද

specific diagnostic tool- නිශ්චිත නිර්ණය මෙවලම - නිශ්චිත ආසාදක විෂබීජයක් හඳුනාගැනීමට සැලසුම් කරන ලද පරීක්ෂණය

standard operating procedure (SOP)- ප්‍රමිතිගත ක්‍රියාපරිපාටිය

strand - දාමය

synthesis - සංශ්ලේෂණය

transcribe - පිටපත්කරණය

thermostability - තාපස්ථායිතාව

transcriptome - ජාන ප්‍රතිලේඛන

transcriptomic profiles- ජාන ප්‍රතිලේඛන ආකෘති

wobbly positions - අස්ථායි ස්ථාන

validation - වලංගුකරණය

viral load - වෛරස් භාරය

REFERENCES

[1] Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

[2] Email communication between Dr. Peter Borger & Dr. Adam Meijer: Supplementary Material

[3] Jafaar et al., Correlation Between 3790 Quantitative Polymerase Chain Reaction–Positives Samples and Positive Cell Cultures, Including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates. https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1491/5912603

[4] BBC, January 21st 2020: https://www.bbc.com/news/world-asia-china-51185836;
Archive: https://archive.is/0qRmZ

[5] Google Analytics – COVID19-deaths worldwide: https://bit.ly/3fndemJ
Archive: https://archive.is/PpqEE

[6] Laboratory testing for COVID-19 Emergency Response Technical Centre, NIVD under China CDC March 15th, 2020: http://www.chinacdc.cn/en/COVID19/202003/P020200323390321297894.pdf

[7] Real-Time PCR Handbook Life Technologies: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf

Nolan T, Huggett J, Sanchez E.Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) First Edition 2013

[8] Trestan Pillonel et al, Letter to the editor: SARS-CoV-2 detection by real-time RT-PCR: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7268274/

[9] Kurkela, Satu, and David WG Brown. “Molecular-diagnostic techniques.” Medicine 38.10 (2009): 535-540.

[10] Wolfel et al., Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x

[11] Thermofischer Primer Dimer Web Tool: https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html

Supplementary Material

[12] Primer-BLAST, NCBI – National Center for Biotechnology Information: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

[13] Marra MA, Steven JMJ, Caroline RA, Robert AH, Angela BW et al. (2003) Science. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science 300(5624): 1399-1404.

[14] Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947

[15] Borger P. A SARS-like Coronavirus was expected but nothing was done to be prepared. Am J Biomed Sci Res 2020. https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.001312.pdf
https://www.researchgate.net/publication/341120750_A_SARS-like_Coronavirus_was_Expected_but_nothing_was_done_to_be_Prepared;
Archive: https://archive.is/i76Hu

[16] Eurosurveillance paper evaluation / review process: https://www.eurosurveillance.org/evaluation

[17] Official recommendation of the Corman-Drosten protocol & manuscript by the WHO,published on January 13th 2020 as version 1.0 of the document:

https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf; archive: https://bit.ly/3m3jXVH

[18] Official WHO-recommendation for the Corman / Drosten RT-qPCR-protocol, which directly derives from the Eurosurveillance-publication, document-version 2-1, published on 17th January 2020: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2

[19] Eurosurveillance Editorial Board, 2020: https://www.eurosurveillance.org/upload/site-assets/imgs/2020-09-Editorial%20Board%20PDF.pdf;
Archive: https://bit.ly/2TqXBjX

[20] Instructions For Use LightMix SarbecoV E-gene plus EAV Control, TIB-Molbiol & Roche Molecular Solutions, January 11th 2020: https://www.roche-as.es/lm_pdf/MDx_40-0776_96_Sarbeco-E-gene_V200204_09164154001 (1).pdf
Archive, timestamp – January 11th 2020: https://archive.is/Vulo5;
Archive: https://bit.ly/3fm9bXH

[21] Christian Drosten & Victor Corman, responsible for viral diagnostics at Labor Berlin: https://www.laborberlin.com/fachbereiche/virologie/
Archive: https://archive.is/CDEUG

[22] Tom Jefferson, Elizabeth Spencer, Jon Brassey, Carl Heneghan Viral cultures for COVID-19 infectivity assessment. Systematic review. Systematic review doi: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.04.20167932v4https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932

[23] Kim et al.,The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420304062

[24] ECDC reply to Dr. Peter Borger, 18th November 2020: Supplementary Material

[25] Prof. Dr. Ulrike Kämmerer & team, survey & Primer-BLAST table: Supplementary Material

Additional literature:

Description RT-PCR RKI Germany, on page 10 of this link: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsJ/JoHM_S5_2020_Studienprotokoll_CORONA_MONITORING_lokal.pdf?__blob=publicationFile