

Evaluation of an In-House Melting Curve Analysis Assay for HSV-1 and HSV-2 Detection via Multiplex Real-Time PCR

Kingkan Rakmanee¹, Treewat Watthanachokchai¹, Pichet Yutthanakarnwikom¹, Ekawat Pasomsub^{1*} 

¹ Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Background: Herpes simplex virus (HSV) has developed mechanisms that allow it to evade the immune system and persist in the body, thus causing diseases and conditions such as sexually transmitted diseases and serious neurological infections.

Objective: To evaluate an in-house melting curve analysis (IHMCA) assay for multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) product to minimize false positive and false negative results in HSV detection.

Methods: A total of 233 clinical specimens were subjected to analysis using the HSV1&2 VZV R-GENE® multiplex real-time PCR assay with melting curve analysis. This analysis was then compared to the Luminex ARIES HSV 1&2 assay.

Results: HSV-1 and HSV-2 demonstrated sensitivity of 90.91% and 96.77%, and specificity of 99.50% and 96.55%. The positive predictive values were 96.77% and 81.08%, and the negative predictive values were 98.51% and 99.49%. The overall accuracy was 98.28% and 96.58%. The assay demonstrated strong agreement with the reference method with statistically significant results (HSV-1: $P < .001$, $SE = 0.04$, $\kappa = 0.93$ [95% CI, 0.86-1.00]; HSV-2: $P < .001$, $SE = 0.05$, $\kappa = 0.86$ [95% CI, 0.77-0.96]).

Conclusions: Amplicon analysis of the multiplexed real-time PCR product was performed in the same reaction tube without interference from multiple TaqMan probe signals due to the use of a DNA binding dye. The integration of multiplex real-time PCR with melting curve analysis enhances the accuracy and efficiency of HSV detection while potentially reducing costs and turnaround time. Importantly, the IHMCA should be considered as a complementary post-PCR method rather than a replacement for standard assays.

Keywords: Multiplex real-time PCR, Melting curve analysis, HSV-1, HSV-2

Citation: Rakmanee K, Watthanachokchai T, Yutthanakarnwikom P, Pasomsub E. Evaluation of an in-house melting curve analysis assay for HSV-1 and HSV-2 detection via multiplex real-time PCR. *Rama Med J.* 2025; 48(4):e274724. doi:10.33165/rmj.48.04.e274724

* **Corresponding Author:** ekawat.pas@mahidol.ac.th

Received: 9 April 2025

Revised: 28 August 2025

Accepted: 1 September 2025

Published: 10 October 2025



Copyright © 2025

by the Author(s).

Licensee RMJ. This article is licensed under the Creative Commons Attribution (CC BY) License.

About the Journal: The Ramathibodi Medical Journal (RMJ) has been operating continuously since 1978. This peer-reviewed journal aims to disseminate research findings, academic progress, and innovations in medicine, biomedical science, public health, and medical education to medical personnel and researchers domestically and abroad. RMJ welcomes various article types, including original research, reviews, and case reports.

Publication Frequency: The journal publishes four issues annually: No.1 in January - March, No.2 in April - June, No.3 in July - September, and No.4 in October - December.

Distribution: The RMJ contents are freely available for our readers to access online, ISSN: 2651-0561 (Online). Current and archived issues are distributed online to our readers worldwide via our website (<https://he02.tci-thaijo.org/index.php/ramajournal>).

Article Processing Charge: RMJ supports the authors in publishing their work without any article processing charge (APC).

Indexing: RMJ has been indexed in the Thai Journal Citation Index (TCI), Google Scholar, and Crossref.

Open Access Policy: RMJ supports open-access publication, allowing anyone to access and read the journal articles without charge.

การประเมินวิธีการวิเคราะห์ Melting Curve ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ผ่านทาง Multiplex Real-Time PCR

กิงกาญจน์ รักษ์มณี¹, ตรวิวัฒน์ วัฒนชะโคชัย¹, พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม¹, เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์^{1*} 

¹ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ประเทศไทย

บทคัดย่อ

บทนำ: ไวรัสเริม (herpes simplex virus, HSV) สามารถพัฒนาเกล็ดเกล็ดเยื่อระบบภูมิคุ้มกันและแฝงอยู่ในร่างกาย ทำให้เกิดโรคและภาวะต่าง ๆ เช่น โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และการติดเชื้อทางระบบประสาทที่ร้ายแรง

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาประเมินประสิทธิภาพการวิเคราะห์ค่า melting curve จากผลผลิตของ real-time polymerase chain reaction (PCR) เพื่อลดผลบวกปลอมและผลลบปลอมในการตรวจหาเชื้อไวรัส HSV

วิธีการศึกษา: การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HSV โดยใช้เทคนิค real-time PCR ตามด้วยการวิเคราะห์ melting curve ของผลิตภัณฑ์ real-time PCR

ผลการศึกษา: การทดสอบสำหรับ HSV-1 และ HSV-2 พบว่า มีความไว 90.91% และ 96.77% ความจำเพาะ 99.50% และ 96.55% ค่าการพยากรณ์ผลบวก คือ 96.77% และ 81.08% ค่าการพยากรณ์ผลลบ คือ 98.51% และ 99.49% ความถูกต้อง 98.28% และ 96.58% ตามลำดับ มีความสอดคล้องกับวิธีอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (HSV-1: $P < .001$, SE = 0.04, $\kappa = 0.93$ [95% CI, 0.86-1.00]; HSV-2: $P < .001$, SE = 0.05, $\kappa = 0.86$ [95% CI, 0.77-0.96])

สรุป: การวิเคราะห์แอมพลิคอนจาก multiplex real-time PCR ด้วย DNA binding dye สามารถทำได้โดยไม่ถูกรบกวนสัญญาณจาก TaqMan probe ภายในหลอดทดลองเดียวกัน ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ด้วย multiplex real-time PCR และยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ melting curve จะปรับปรุงความแม่นยำและประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อไวรัส HSV วิธีนี้สามารถใช้สำหรับการตรวจจบบีเชื้อไวรัส HSV ทางคลินิกได้

คำสำคัญ: เทคนิค multiplex real-time PCR การวิเคราะห์ melting curve เชื้อไวรัส HSV-1 เชื้อไวรัส HSV-2

Citation: Rakmanee K, Watthanachokchai T, Yutthanakarnwikom P, Pasomsub E. Evaluation of an in-house melting curve analysis assay for HSV-1 and HSV-2 detection via multiplex real-time PCR. *Rama Med J.* 2025; 48(4):e274724. doi:10.33165/rmj.48.04.e274724

* Corresponding Author:

ekawat.pas@mahidol.ac.th

Received: 9 April 2025

Revised: 28 August 2025

Accepted: 1 September 2025

Published: 10 October 2025



Copyright © 2025

by the Author(s).

Licensee RMJ. This article is licensed under the Creative Commons Attribution (CC BY) License.

บทนำ

ไวรัสเริม (herpes simplex virus, HSV) เป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและอาการที่รุนแรงจากการติดเชื้อที่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) เช่น สมอองอักเสบ และ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ¹ เชื้อไวรัสเริมสามารถแฝงตัวอยู่ในอวัยวะภายในและระบบประสาทได้เป็นเวลานานในปมประสาท (ganglia)² กลยุทธ์ในการแฝงตัวและกลับมาโจมตีซ้ำของเชื้อไวรัส herpes simplex virus type 1 (HSV-1) และ herpes simplex virus type 2 (HSV-2) ในมนุษย์ ช่วงแรกของการติดเชื้อในมนุษย์ ไวรัสจะถอยกลับเข้าสู่ระยะแฝงตัวและไม่แสดงอาการ หลังจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายคลายตัวลง ไวรัสเหล่านี้จะเกิดการติดเชื้อซ้ำขึ้นอีกครั้ง ทำให้เกิดการติดเชื้อที่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ และผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด เป็นต้น³

การติดเชื้อไวรัส HSV-1 พบได้ทุกส่วนของร่างกาย ส่วนมากพบการติดเชื้อไวรัส HSV-1 บริเวณรอบนอกของริมฝีปาก ในช่องปากด้านใน เหงือก และลิ้น จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health

Health Organization, WHO) พบว่า ผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 50 ปี มีรายงานการติดเชื้อไวรัส HSV-1 ทั่วโลกประมาณ 3.7 พันล้านคน และมีการติดเชื้อไวรัส HSV-2 ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคเริมที่อวัยวะเพศประมาณ 519.5 ล้านคน โดยมีอายุระหว่าง 15 ถึง 49 ปี อยู่ที่ร้อยละ 13.3⁴ ผู้ที่ติดเชื้อไวรัส HSV-2 มีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อไวรัส human immunodeficiency virus (HIV) มากถึง 3 เท่า เนื่องจากเชื้อไวรัส HSV-2 ทำให้เกิดตุ่มน้ำใส หรือมีแผลเปิดที่ผิวหนัง บริเวณอวัยวะเพศ ทวารหนัก หรือบริเวณใกล้เคียง ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง HIV และ HSV-2 มีโอกาสแพร่เชื้อไวรัส HIV ให้กับผู้อื่นได้สูงมาก⁵ สำหรับการติดเชื้อ HSV ในทารกแรกเกิด มีสาเหตุจากการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก สามารถเกิดขึ้นได้ใน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะในครรภ์ (in utero) ระยะก่อนคลอด (perinatal) และ ระยะหลังคลอด (postnatal) การติดเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วงก่อนคลอด ประมาณร้อยละ 85 ทารกที่คลอดผ่านช่องคลอดที่มีการติดเชื้อพบว่า มีความเสี่ยงในการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย ส่งผลให้เกิดความบกพร่องทางระบบประสาทอย่างรุนแรง หรือ เสียชีวิต⁶

การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพและการเพิ่มขึ้นของเชื้อไวรัส HSV อย่างรวดเร็ว เป็นเรื่องสำคัญที่ต้องรีบดำเนินการรักษาในการวินิจฉัยของแพทย์ ผู้ป่วยต้องรอผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนจึงจะสามารถสั่งยาต้านไวรัสสำหรับเชื้อ HSV ได้ เนื่องจากการใช้ยาต้านไวรัสเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการดื้อยาได้⁷ การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญในการสนับสนุนการวินิจฉัยของแพทย์ วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย real-time polymerase chain reaction (PCR) จึงถูกนำมาใช้สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ในกรณีที่ผลการทดสอบคลุมเครือ หากสามารถยืนยันผลการทดสอบจาก PCR product ที่เหลือทิ้งจากกระบวนการทำ real-time PCR ได้ โดยนำแอมพลิคอน (amplicon) มาวิเคราะห์ต่อด้วยการทำ melting curves analysis ก็จะเพิ่มโอกาสตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณน้อย และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความซับซ้อนเหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งการวิเคราะห์ PCR product ด้วย melting curves analysis มีข้อดีกว่าการยืนยันด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งมีรายงานหลายฉบับได้พัฒนาริธีการตรวจโดยใช้ TaqMan probe ร่วมกับ DNA binding dye สามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยลดปัญหาการแปลผลจากกราฟที่มีลักษณะผิดปกติ หรือแม้แต่ผลลบปลอม (false negative) และผลบวกปลอม (false positive) ที่เกิดจากความผิดพลาดในการทำงานของโพรบ⁸ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาพยาบาลที่ถูกต้องและรวดเร็วขึ้น

วิธีการศึกษา

การคัดเลือกตัวอย่าง

คัดเลือกและรวบรวมตัวอย่างทางคลินิกที่เหลือจากกระบวนการตรวจวิเคราะห์ (left-over specimen) เชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ด้วยชุดทดสอบ Luminex ARIES HSV 1&2 assay (Luminex Corp, Austin, TX, USA) ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ได้จำนวน 233 ตัวอย่าง

การทดสอบด้วย Luminex ARIES HSV 1&2 Assay

เตรียมชุดทดสอบ Luminex ARIES HSV 1&2 assay ปั่นผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ประมาณ 15-30 วินาที หลังจากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 200 µL ใส่ลงในตลับ ARIES (ARIES® Cassettes) ที่ช่องบรรจุตัวอย่าง ซึ่งในตลับมีสารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม (nucleic acid extraction reagents) สารตั้งต้นสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจจับ (amplification and detection reagents) รวมทั้งมีตัวอย่างควบคุมคุณภาพกระบวนการตรวจวิเคราะห์ (sample processing control) จากนั้นนำเข้าเครื่อง ARIES (ARIES® two-module system) ซึ่งตัวอย่างจะเข้าสู่กระบวนการทดสอบและแปลผลด้วยซอฟต์แวร์แบบอัตโนมัติ

การทดสอบด้วย HSV1/HSV2 VZV R-Gene® Kit Test

ในขั้นตอนการทดสอบนี้เป็นการตรวจวิเคราะห์แอมพลิคอนที่เกิดขึ้นของเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ใน real-time PCR แบบปกติทั่วไป (standard real-time PCR assay) จากชุดน้ำยาทดสอบ

HSV1/HSV2 VZV R-gene® kit test โดยอาศัยสัญญาณของสารเรืองแสง หรือ โพรบ (probe) ในการตรวจติดตามสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HSV-1 ในช่องสัญญาณ 6-carboxyfluorescein (FAM) และ HSV-2 ในช่องสัญญาณ Cyanine 5 (Cy5) ซึ่งถูกตรวจวัดแบบเวลาจริง (real-time) ระหว่างช่วงปฏิกิริยา PCR (PCR amplification stage) หากมีแอมพลิคอนเกิดขึ้นผลลัพธ์จะแสดงออกมาในรูปแบบกราฟลักษณะ S-shape ซึ่งสัญญาณความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) จะสูงขึ้นเหนือเส้น threshold (base-line threshold) และรายงานออกมาในรูปของค่า cycle threshold (Ct) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดสารพันธุกรรม : ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ประมาณ 15-30 วินาที หลังจากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 200 µL ใส่ในหลอดทดลองของชุดสกัดสารพันธุกรรม MagDEA Dx SV โดยใช้เครื่อง magLEAD 12gC (Precision System Science Co, Ltd, Matsudo, Japan) ดำเนินการตามขั้นตอนและคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เมื่อกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมเสร็จสิ้น ให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C จนกว่าจะทำการทดสอบ หากต้องการทดสอบในภายหลังให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมสารตั้งต้น : ทำการละลายชุดทดสอบ HSV1& 2 VZV R-GENE® (Biomérieux, Nürtingen, Germany) ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ประมาณ 5 วินาที และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบความเร็วต่ำ (briefly centrifuge) หลังจากนั้นดูดสารละลายตั้งต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ปริมาตร 15 µL ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 mL ทุกครั้งที่ดำเนินการทดสอบ ให้เตรียมตัวควบคุมคุณภาพผลบวก (positive control) และตัวควบคุมคุณภาพผลลบ (negative control) ควรทำการเตรียมสารละลายต่าง ๆ ในภาชนะที่เก็บรักษาความเย็น และหลีกเลี่ยงการสัมผัสด้วยแสงตามคำแนะนำในคู่มือของผู้ผลิต

ขั้นตอนที่ 3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม : นำสารละลายดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ ตัวควบคุมคุณภาพผลบวก และตัวควบคุมคุณภาพผลลบ ไปปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 5-10 วินาที และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำ จากนั้นดูด DNA template ปริมาตร 10 µL ใส่ลงในสารตั้งต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง real-time PCR โดยตั้งโปรแกรมสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (stage) ได้แก่ ขั้นตอนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โพลิเมอเรส (polymerase activation) ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนสำหรับการแยกสายดีเอ็นเอ (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายเป็นขั้นตอนการตั้งค่าอุณหภูมิสำหรับการยึดจับของไพรเมอร์ (primers) การสังเคราะห์สารพันธุกรรม และการบันทึกข้อมูล (annealing, extension, and data collection) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน 45 รอบ ในการตั้งค่าอุณหภูมิและการบันทึกข้อมูล ให้ดำเนินการตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ BioRad CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

การทดสอบด้วย In-House Melting Curve Analysis Assay for Multiplex Real-Time PCR Product (IH-MCA for MRT-PCR Product)

การทดสอบด้วย IH-MCA for MRT-PCR product ไม่ใช่วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นอิสระ แต่เป็นขั้นตอนการวิเคราะห์หลังจากปฏิกิริยา PCR (post amplification stage) โดยใช้แอมพลิคอนที่ได้จาก real-time PCR ครั้งแรก หรือแอมพลิคอนของ real-time PCR ที่ผ่านการทดสอบด้วย HSV1/HSV2 VZV R-gene® kit test ก่อนหน้านี้ (ซึ่งเรียกในการทดลองนี้เรียก "standard real-time PCR assay") มาทำการวิเคราะห์ต่อ โดยปกติการยืนยันผลของ real-time PCR สามารถทำได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เพื่อแสดงแอมพลิคอน แต่ในการทดลองนี้การตรวจสอบแอมพลิคอนจะใช้การวิเคราะห์ค่า melting curve แทน (ซึ่งเรียกในการทดลองนี้เรียก "IH-MCA for MRT-PCR product") มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เตรียม SYBR® Green I : ทำการเตรียมสารละลาย SYBR® Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen, USA) ความเข้มข้น 10x หลังจากนั้นทำการดูดสารละลาย SYBR® Green I ปริมาตร 2.78 µL (10x) ใส่ลงใน PCR product แต่ละหลุม

ขั้นตอนที่ 2 ตั้งค่าการวิเคราะห์ melting curve : ตั้งโปรแกรมการใช้งานตามคำแนะนำของผู้ผลิตเครื่องมือ BioRad CFX 96 โดยกำหนดอุณหภูมิ 60 °C ถึง 95 °C ที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเท่ากับ 0.5 °C ต่อ 0.05 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 การแปลผล : การแปลผลทดสอบจะรายงานผลในเชิงคุณภาพ (qualitative) ได้แก่ ผลบวก (positive) และผลลบ (negative) โดยวิเคราะห์จากค่า melting temperature ของ HSV-1 และ HSV-2 หากมีค่า melting temperature เท่ากับ 89.00 (±1) °C ให้แปลการทดสอบเป็นบวก กรณีที่มีค่า melting temperature นอกเหนือจากนี้ให้แปลผลการทดสอบเป็นลบ

การประเมินประสิทธิภาพ

วิเคราะห์ผลการทดสอบระหว่าง standard real-time PCR assay และ IH-MCA for MRT-PCR product เปรียบเทียบกับ Luminex ARIES HSV 1&2 assay โดยใช้โปรแกรม MedCalc version 23.3.4 (MedCalc Software, Ltd) เพื่อนำมาคำนวณค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าการพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ค่าการพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) และค่าความถูกต้อง (accuracy) สำหรับการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ Cohen's kappa (κ) แบบไม่ถ่วงน้ำหนัก และช่วงความเชื่อมั่น 95% CI จะใช้โปรแกรม R version 4.3.2 (R Project for Statistical Computing) และ RStudio version 2024.09.0-375 (R Project for Statistical Computing)

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างทั้งหมด 233 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทดสอบด้วย Luminex ARIES HSV 1&2 assay ให้ผลการทดสอบ HSV-1 บวก (actual positive) จำนวน 33 ตัวอย่าง และ ลบ (actual negative) จำนวน 200 ตัวอย่าง ส่วน HSV-2 ให้ผลการทดสอบบวก จำนวน 31 ตัวอย่าง และ ลบ จำนวน 202 ตัวอย่าง ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธี standard real-time PCR assay และ IH-MCA for MRT-PCR product กับวิธีอ้างอิง แสดงค่าที่คาดการณ์ (predicted value) ของตัวแปรเป้าหมาย (ตารางที่ 1)

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ด้วย standard real-time PCR assay พบว่า มีความไว เท่ากับ 90.91% และ 100.00% (95% CI, 75.67-98.08 และ 88.78-100.00) ความจำเพาะ เท่ากับ 95.00% และ 93.56% (95% CI, 91.00-97.58 และ 89.25-96.53) ค่าการพยากรณ์ผลบวก เท่ากับ 75.00% และ 70.45% (95% CI, 61.89-84.71 และ 58.50-80.14) ค่าการพยากรณ์ผลลบ เท่ากับ 98.45% และ 100.00% (95% CI, 95.56-99.47 และ 98.07-100.00) และมีความถูกต้อง เท่ากับ 94.42% และ 94.42% (95% CI, 90.65-97.00 และ 90.65-97.00) ตามลำดับ

ตารางที่ 1. ผลการตรวจวิเคราะห์ HSV-1 และ HSV-2 ด้วย Standard Real-Time PCR Assay และ IH-MCA for MRT-PCR Product โดยใช้ R-Gene® Kit เปรียบเทียบกับ Luminex ARIES HSV 1&2 Assay

Method	HSV-1 (R-Gene® Kit)		HSV-2 (R-Gene® Kit)	
	Standard Real-Time PCR Assay (PCR Amplification Stage)	IH-MCA for MRT-PCR Product (Post Amplification Stage)	Standard Real-Time PCR Assay (PCR Amplification Stage)	IH-MCA for MRT-PCR Product (Post Amplification Stage)
True positive	30	30	31	30
False positive	10	0	13	7
False negative	3	3	0	1
True negative	190	200	189	195

Abbreviations: HSV-1, herpes simplex virus type 1; HSV-2, herpes simplex virus type 2; IH-MCA, in-house melting curve analysis; MRT-PCR, multiplex real-time polymerase chain reaction; PCR, polymerase chain reaction.

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ด้วย IH-MCA for MRT-PCR product พบว่า มีความไว เท่ากับ 90.91% และ 96.77% (95% CI, 75.67-98.08 และ 83.30-99.92) ความจำเพาะ เท่ากับ 99.50% และ 96.55% (95% CI, 97.25-99.99 และ 93.02-98.60) ค่าการพยากรณ์ผลบวก เท่ากับ 96.77% และ 81.08% (95% CI, 80.89-99.53 และ 67.36-89.90) ค่าการพยากรณ์ผลลบ เท่ากับ 98.51% และ 99.49% (95% CI, 95.75-99.49 และ 96.61-99.93) และมีความถูกต้อง เท่ากับ 98.28% และ 96.58% (95% CI, 95.66-99.53 และ 93.37-98.51) ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์ความสอดคล้อง (agreement) ระหว่างผลลัพธ์ของ standard real-time PCR assay และ IH-MCA for MRT-PCR product เทียบกับ Luminex ARIES HSV 1&2 assay พบว่า มีอัตราความสอดคล้อง (concordance rates) โดยรวม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ร้อยละ 92.76 (85.73-99.78) และร้อยละ 86.24 (76.95-95.54) สำหรับ HSV-1 ($P < .001$, SE = 0.04, κ = 0.93 [95% CI, 0.86-1.00]) และ HSV-2 ($P < .001$, SE = 0.05, κ = 0.86 [95% CI, 0.77-0.96) ตามลำดับ

การประเมินประสิทธิภาพของ standard real-time PCR assay และ IH-MCA for MRT-PCR product พบว่า มีความไวสูง (90.91%-100.00%) และความจำเพาะสูง (93.56%-99.50%) พร้อมด้วย ค่าการพยากรณ์ผลบวกและค่าการพยากรณ์ผลลบที่สูงมาก วิธี IH-MCA for MRT-PCR product มีต้นทุนต่ำกว่า standard real-time PCR assay ประมาณ 22.49 เท่า นอกจากนี้ IH-MCA for MRT-PCR product ใช้เวลาในการทดสอบทั้งหมดเพียง 35 นาที ซึ่งเร็วกว่าวิธี standard real-time PCR assay ที่ใช้เวลา 2 ชั่วโมง 25 นาที หรือประมาณ 4.14 เท่า (ตารางที่ 2)

ในการคำนวณต้นทุนและระยะเวลาการดำเนินการของการทดลองนี้ ได้เปรียบเทียบระหว่าง standard real-time PCR assay กับวิธี IH-MCA for MRT-PCR product ซึ่งเป็นเสมือนขั้นตอนการยืนยันผลการทดสอบภายหลังปฏิกิริยา PCR (post-PCR confirmatory step) โดยต้นทุนของวิธี standard real-time PCR assay คิดเป็นค่าใช้จ่ายต่อ 1 ปฏิกิริยา (1 Rx) ซึ่งรวมถึงการสกัดกรดนิวคลีอิก (170.00 บาท) น้ำยาตรวจวิเคราะห์ (570.00 บาท) และวัสดุสิ้นเปลือง (36.99 บาท) รวมเป็น 776.99 บาทต่อการทดสอบ 1 ครั้ง ขณะที่วิธี IH-MCA for MRT-PCR product ใช้ น้ำยาตรวจวิเคราะห์และวัสดุสิ้นเปลืองที่มีต้นทุน 34.53 บาทต่อการทดสอบ ซึ่งต่ำกว่ามาก และไม่ต้องสกัดสารพันธุกรรมใหม่ ส่งผลให้ประหยัดทั้งต้นทุนและเวลา ในกรณีการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ (repeat) เพื่อยืนยันผลการทดสอบก่อนหน้านี้ด้วยวิธี standard real-time PCR assay จะใช้เวลารวม 2 ชั่วโมง 25 นาที สำหรับการตรวจวิเคราะห์ซ้ำด้วยวิธี IH-MCA for MRT-PCR product ใช้เวลา 35 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่สูงของวิธี IH-MCA for MRT-PCR product ทั้งในด้านต้นทุนและเวลา

จากการทดสอบปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ (cross-reaction) ด้วย standard real-time PCR assay และ IH-MCA for MRT-PCR product ไม่พบการเพิ่มขึ้นส่วนสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคดังต่อไปนี้ adenovirus, coronavirus NL63, coronavirus OC4, Epstein-Barr virus, influenza B virus, human metapneumovirus, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella species*, *Moraxella catarrhalis*, parainfluenza virus type 3, parainfluenza virus type 4, *Pneumocystis jirovecii*, rhinovirus, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, และ varicella-zoster virus อย่างไรก็ตาม สำหรับเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ cytomegalovirus, *Haemophilus influenzae*, respiratory syncytial virus, และ human parvovirus พบสัญญาณการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัส HSV-1 ในทั้ง 2 วิธี (ในส่วนเชื้อไวรัส HSV-2 ไม่พบสัญญาณการเพิ่มขึ้น) หลังตรวจยืนยันด้วยชุดทดสอบ FTD Neuro 9 assay (Fast Track Diagnostics, Junglinster, Luxembourg) ให้ผลการทดสอบ HSV-1 บวกใน 4 ตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์ melting curve ของเชื้อไวรัส HSV-1 (efficiency = 92.7, coefficient of determination = 0.998, slope = -3.511, y-intercept = 38.935) ที่ให้ผลบวกจากตัวอย่างทางคลินิก มีความเข้มข้นต่ำสุดและความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 370 copies/mL (Ct 40.43) และ 3,467,368,000 copies/mL (Ct 15.93) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อไวรัส HSV-2 (efficiency = 93.4, coefficient of determination = 0.998, slope = -3.490, y-intercept = 36.742) พบความเข้มข้นต่ำสุดและความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 610 copies/mL (Ct 37.15) และ 754,312,000 copies/mL (Ct 15.82) ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 2. ประเมินประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่าย และเวลาที่ใช้ สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2

A) Performance of HSV-1 Detection

Method	Real-Time PCR for HSV-1 Detection	95% CI	IH-MCA for MRT-PCR Product	95% CI
Sensitivity, %	90.91	75.67-98.08	90.91	75.67-98.08
Specificity, %	95.00	91.00-97.58	99.50	97.25-99.99
PLR	18.18	9.84-33.59	181.82	25.66-1288.30
NLR	0.1	0.03-0.28	0.09	0.03-0.27
PPV, %	75.00	61.89-84.71	96.77	80.89-99.53
NPV, %	98.45	95.56-99.47	98.51	95.75-99.49
Accuracy, %	94.42	90.65-97.00	98.28	95.66-99.53

B) Performance of HSV-2 Detection

Method	Real-Time PCR for HSV-1 Detection	95% CI	IH-MCA for MRT-PCR Product	95% CI
Sensitivity, %	100.00	88.78-100.00	96.77	83.30-99.92
Specificity, %	93.56	89.25-96.53	96.53	92.99-98.60
PLR	15.54	9.18-26.29	27.93	13.45-57.99
NLR	0	-	0.03	0.00-0.23
PPV, %	70.45	58.50-80.14	81.08	67.36-89.00
NPV, %	100.00	98.07-100.00	99.49	96.59-99.93
Accuracy, %	94.42	90.65-97.00	96.57	93.35-98.51

C) Costs

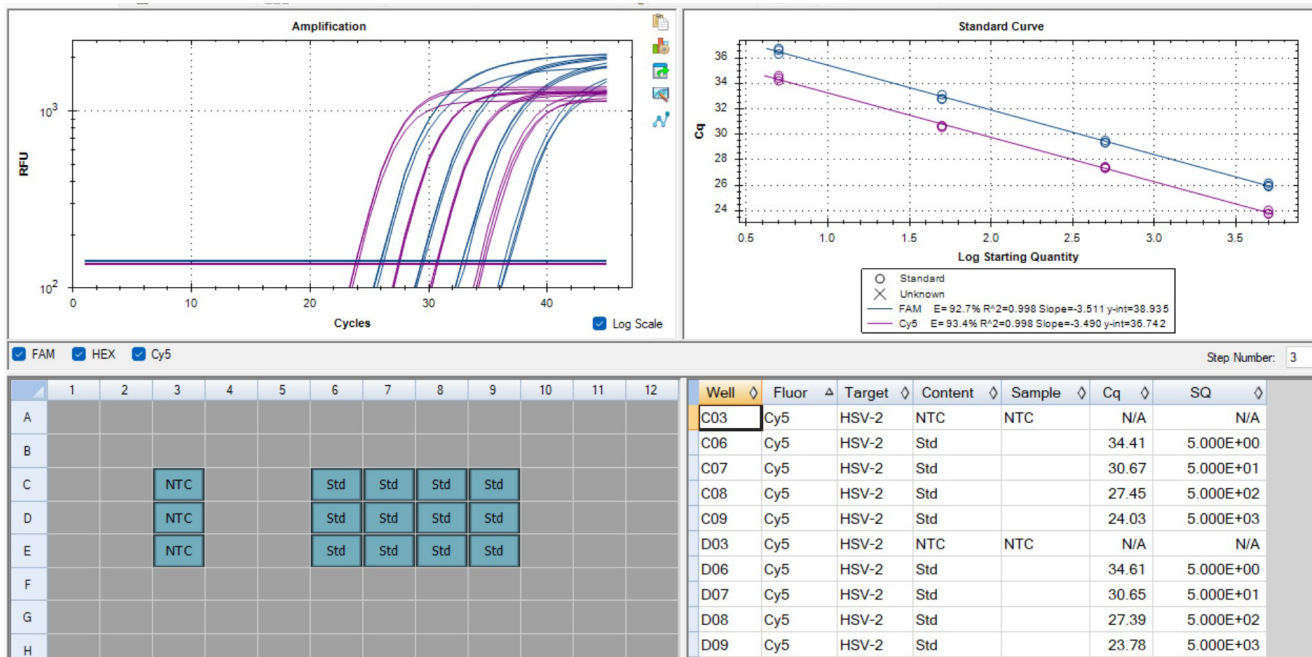
Topic	Standard Real-Time PCR	Price, \$	IH-MCA for MRT-PCR Product	Price, \$
Nucleic acid extraction	1 Rx	170.00	None	-
Reagent	1 Rx	570.00	1 Rx	0.01
Materials	1 well	36.99	1 well	34.52
Total		776.99		34.53

D) Turnaround Time

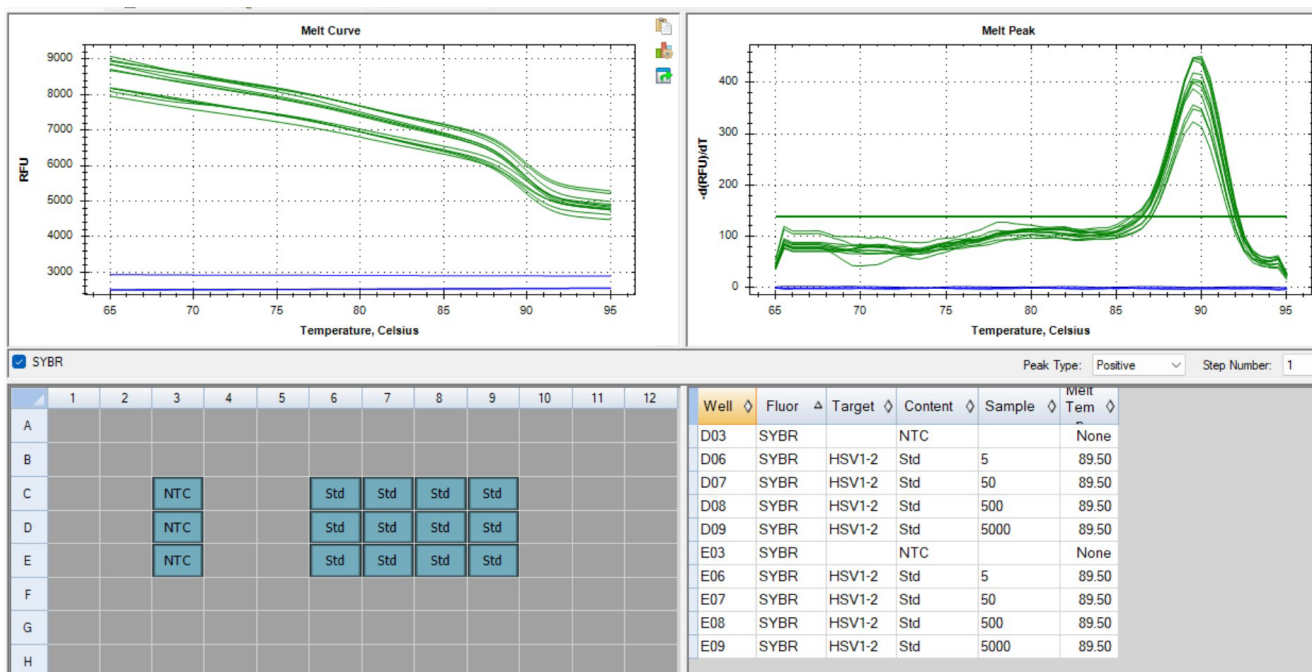
Workflow Step	Standard Real-Time PCR	Time	IH-MCA for MRT-PCR Product	Time
Nucleic acid extraction	Yes	30 min	No	-
Pre-mix	Yes	10 min	Yes	5 min
Amplification/detection	Yes	1 h 40 min	Yes	25 min
Data analysis	Yes	5 min	Yes	5 min
Total		2 h 25 min		35 min

Abbreviations: HSV-1, herpes simplex virus type 1; HSV-2, herpes simplex virus type 2; IH-MCA, in-house melting curve analysis; MRT-PCR, multiplex real-time polymerase chain reaction; NLR, negative likelihood ratio; NPV, negative predictive value; PCR, polymerase chain reaction; PLR, positive likelihood ratio; PPV, positive predictive value; Rx, reaction.

ภาพที่ 1. การวิเคราะห์ค่า Cycle Threshold (Ct) ของเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2



ภาพที่ 2. การวิเคราะห์ Melting Curve ของเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2



อภิปรายผล

วิธีการทดสอบทางด้านชีวโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 โดยอาศัยหลักการของ real-time PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ได้แก่ ยีน US7 ขนาด 142 bp สำหรับเชื้อไวรัส HSV-1 และ ยีน UL27 ขนาด 134 bp สำหรับเชื้อไวรัส HSV-2 การตรวจติดตามการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ได้แก่ FAM สำหรับ HSV-1 และ Cy5 สำหรับ HSV-2 ซึ่งแสดงผลเป็นกราฟ amplification curve ในตัวอย่างที่ให้ผลบวก จะได้ PCR product หรือแอมพลิคอน ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อด้วย melting curve analysis ภายหลังการหลอกลอดเพียงอย่างเดียว โดยค่า melting temperature จะจำเพาะกับบริเวณเป้าหมายของแต่ละเชื้อ

ในการศึกษานี้แอมพลิคอนของ HSV-1 (142 bp) และ HSV-2 (134 bp) มีขนาดต่างกันเล็กน้อย แต่เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์แบบ multiplex ถูกออกแบบให้เข้าจับในช่วงอุณหภูมิเดียวกัน ร่วมกับ GC content และลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ได้ค่า melt peak เท่ากันที่ประมาณ 89.50 °C ซึ่งอยู่ในช่วงความละเอียดของการวัดด้วย melting curve analysis ดังนั้น การใช้ melting curve analysis เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิดเชื้อเมื่อมีค่า melting temperature ร่วมกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ melting curve analysis ภายหลัง PCR ยังมีประโยชน์ โดยเฉพาะในกรณีที่ real-time PCR ให้สัญญาณเข้าในช่วงท้ายของปฏิกิริยาหรือมีลักษณะกราฟกระดกที่ปลาย (late amplification/false signal) การตรวจสอบ melt peak ของแอมพลิคอนสามารถช่วยบ่งชี้ได้ว่าการเกิดผลิตภัณฑ์เป้าหมายจริงจากการจับของไพรเมอร์ หรือเป็นเพียงผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะ ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ การเติม SYBR Green I ที่ลงในสารละลายที่มีสารเรืองแสง FAM และ Cy5 พบว่าสามารถทำงานร่วมกันได้ โดยไม่มีผลรบกวน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nagy และคณะ⁸ และ Lind และคณะ⁹ อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของกระบวนการทดสอบอยู่ที่ช่วงเวลาในการเติมสารเพื่อตรวจตามพันธะดีเอ็นเอ โดยในวิธี IH-MCA for MRT-PCR product มีการเติม DNA binding dye เช่น SYBR Green I ในช่วง post-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่า melting curve ในขณะที่การศึกษาของผู้วิจัยกลุ่มอื่นจะเติม DNA binding dye ในช่วง pre-PCR แต่แปลผลการทดสอบในช่วง post-PCR เช่นเดียวกัน

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามสำหรับเชื้อไวรัส HSV-1 ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ cytomegalovirus, *Haemophilus influenzae*, respiratory syncytial virus, และ human parvovirus สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย standard real-time PCR assay และ melting curve analysis เมื่อทำการทดสอบซ้ำด้วยชุดน้ำยาใหม่ด้วย FTD Neuro 9 assay ให้ผลการทดสอบตรงกัน โดยตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HSV-1 จากตัวอย่างผู้ป่วยดังกล่าว การติดเชื้อร่วม (coinfection) ในลักษณะนี้สามารถพบได้ในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ³ และพบการติดเชื้อไวรัส HSV ได้ในหลายอวัยวะ¹⁰

การทดสอบด้วย IH-MCA for MRT-PCR product มีประสิทธิภาพสูงกว่าการทำ standard real-time PCR assay โดยการทดสอบด้วย standard real-time PCR assay อาจมีการส่งสัญญาณที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น ทำให้กราฟมีลักษณะผิดปกติไม่เป็น sigmoid curve เช่น มีลักษณะโค้งแบนราบ เส้นกราฟมีลักษณะหยักไปมา ทำให้การแปลผลผิดพลาด เกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอมขึ้น⁸ นอกจากนี้ การออกแบบไพรเมอร์ ก็มีความสำคัญในการตรวจจับยีนเป้าหมาย หากมีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่ำ ก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามขึ้น ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย real-time PCR และยืนยันผลการทดสอบด้วย IH-MCA for MRT-PCR product จะสามารถบ่งชี้คุณภาพของแอมพลิคอนที่ได้จากกระบวนการทำงานของไพรเมอร์ หรือ หากเชื่อมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในบริเวณยีนเป้าหมาย ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ ก็สามารถตรวจติดตามได้จากค่า melting temperature ที่ต่างไปจากเดิม นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวช่วยในการตั้งข้อสังเกต เพิ่มทางเลือก และโอกาส ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ในตัวอย่างที่มีความซับซ้อนได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตาม การตรวจเชื้อไวรัส HSV-1 ด้วย IH-MCA for MRT-PCR product นอกจากจะใช้เวลา 35 นาที และมีต้นทุน 35 บาท ยังสามารถจัดผลบวกปลอมได้ทั้งหมด และในส่วนของเชื้อไวรัส HSV-2 สามารถลดผลบวกปลอมลงได้ถึง 1.86 เท่า ในกรณีที่ต้องการทดสอบเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ซ้ำ สามารถลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ลงได้ถึง 4.14 เท่า

ข้อจำกัดของวิธี IH-MCA for MRT-PCR product ได้แก่ ความจำเพาะของการแยกแอมพลิคอนที่มีลักษณะคล้ายกัน ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ค่า melting curve ซ้อนทับกันในกรณีที่มีเชื้อร่วมกันหลายชนิด นอกจากนี้ อาจมีข้อจำกัดในการประยุกต์ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่อง real-time PCR ที่สามารถวิเคราะห์ melting curve ได้

สำหรับแนวทางการพัฒนาในอนาคต ควรเพิ่มการทดสอบจากตัวอย่างทางในกลุ่มประชากรที่หลากหลาย เพื่อประเมินประสิทธิภาพในสถานการณ์จริง รวมถึงพัฒนาอัลกอริทึม (algorithm) ในการวิเคราะห์ข้อมูล melting curve แบบอัตโนมัติ เพื่อให้สามารถแปลผลการทดสอบได้ง่ายและแม่นยำมากขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือทางการแพทย์ในการยืนยันผลการทดสอบผลบวกปลอมและผลลบปลอมของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย real-time PCR ทั่วไป ช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผล

การทดสอบหาเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ด้วยวิธี real-time PCR และการวิเคราะห์ melting curve ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 มีประสิทธิภาพสูงกว่า standard real-time PCR assay ทั้งในเรื่องสมรรถนะ ราคา และระยะเวลาในการทดสอบ ช่วยลดข้อผิดพลาดจากผลบวกปลอมและผลลบปลอมจากการส่งสัญญาณแบบไม่จำเพาะได้

Additional Information

Acknowledgments: The authors sincerely thank the Virology Laboratory and the Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, for their support and assistance in this research.

Ethics Approval: The study was approved by the Human Research Ethics Committee, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University (MURA2022/159 on 8 March 2022).

Clinical Trial Consideration: This study does not report on a clinical trial.

Financial Support: No financial support was provided for this study.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions:

Conceptualization: Kingkan Rakmanee

Data Curation: Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai

Formal Analysis: Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai

Investigation: Kingkan Rakmanee

Methodology: Pichet Yutthanakarnwikom, Ekawat Pasomsub

Project Administration: Kingkan Rakmanee

Resources: Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai, Ekawat Pasomsub

Supervision: Pichet Yutthanakarnwikom

Validation: Pichet Yutthanakarnwikom, Ekawat Pasomsub

Visualization: Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai

Writing – Original Draft: Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai

Writing – Review & Editing: Pichet Yutthanakarnwikom, Ekawat Pasomsub

References

1. Rohani H, Arjmand R, Mozhgani SH, Shafiee A, Amini MJ, Forghani-Ramandi MM. The worldwide prevalence of herpes simplex virus encephalitis and meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Turk Arch Pediatr.* 2023;58(6):580-587. doi:10.5152/TurkArchPediatr.2023.23007
2. Tenser RB, Edris WA, Gaydos A, Hay KA. Secondary herpes simplex virus latent infection in transplanted ganglia. *J Virol.* 1994;68(11):7212-7220. doi:10.1128/JVI.68.11.7212-7220.1994
3. Spallone A, Ariza-Heredia EJ, Chemaly RF. Acute and latent viral infections in immunocompromised patients: a tale of brave battles and menacing foes. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(10):1319-1320. doi:10.1016/j.cmi.2022.06.010
4. World Health Organization. Herpes simplex virus. World Health Organization. 30 May 2025. Accessed 30 July 2025. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
5. World Health Organization. Massive proportion of world's population are living with herpes infection. World Health Organization. 1 May 2020. Accessed 30 July 2025. <https://www.who.int/news/item/01-05-2020-massive-proportion-world-population-living-with-herpes-infection>
6. Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):1-13. doi:10.1128/CMR.17.1.1-13.2004
7. Arshad Z, Alturkistani A, Brindley D, Lam C, Foley K, Meinert E. Tools for the diagnosis of herpes simplex virus 1/2: systematic review of studies published between 2012 and 2018. *JMIR Public Health Surveill.* 2019;5(2):e14216. doi:10.2196/14216
8. Nagy A, Černíková L, Vitásková E, et al. Correction: MeltMan: optimization, evaluation, and universal application of a qPCR system integrating the TaqMan qPCR and melting analysis into a single assay. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196444. doi:10.1371/journal.pone.0196444
9. Lind K, Ståhlberg A, Zoric N, Kubista M. Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques.* 2006;40(3):315-319. doi:10.2144/000112101
10. Public Health Agency of Canada. Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances-Herpes simplex virus. Public Health Agency of Canada; 2011. Updated 22 July 2020. Accessed 30 July 2025. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/herpes-simplex-virus.html>