

Validering av realtids-PCR-metod för Herpes simplex- och Varicella-zoster virus

Rachel Savill

Examensarbete, 15 hp, kandidatuppsats
Huvudområde: Biomedicinsk Laboratoriemetodik
Jönköping, Juni 2015

Huvudhandledare: Helena Enroth, Med Dr (PhD), Adj.
Professor Inst. för biovetenskap,
Högskolan i Skövde, F&U
Molekylärbiologi, Unilabs Norden

Labhandledare: Sandra Nord, BMA
Malin Svensson, Biolog

Examinator: Jan Strindhall, Universitetslektor,
Högskolan Jönköping

Sammanfattning

Nyckelord: PCR, TaqMan probe, SYBRgreen

Herpes simplex virus typ 1 (HSV 1) och typ 2 (HSV 2) samt Varicella-zoster virus (VZV) är orsak till vanligt förekommande hudinfektioner, samt mer sällsynta livshotande infektioner i centrala nervsystemet (CNS). Numera diagnosticeras dessa infektioner framförallt med Realtids-Polymerase Chain Reaction (Realtids-PCR). I det här projektet validerades en ny PCR-metod för detektion av HSV och VZV på Rotor-Gene Q med kommersiella kit från Qiagen och GeneProof samt in-house-designade TaqMan-primers och prober. HSV metoden skulle bli en duplexreaktion och sensitivitet/specifitet skulle förbättras från den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II. De kommersiella kiten utvärderades genom analys av extern kontrollpaneler från QCMD och patientprover. Till in-house metoderna optimerades först mastermix och sedan analyserades sensitiviteten på metoderna genom spädningsserier på kontrollmaterial. Specifiteten testades slutligen genom analys av negativ kontrollmaterial, positiva och negativa patientprover (40 VZV, 142 HSV) och QCMD-kontrollpaneler. Resultaten tydde på en ökad sensitivitet och specifitet för in-house VZV metoden. HSV in-house metoden fungerade som en duplex och fick likvärdiga resultat med den nuvarande metoden i sensitivitets- och specifitetstestning för HSV 1, men mindre bra resultat för HSV 2. De kommersiella kiten fick likvärdiga resultat till både den nuvarande metoden och in-house metoden men krävde vidare testning för att kunna dra några slutsatser.

Summary

Validation of a real-time PCR-analysis for Herpes simplex- and Varicella Zoster viruses

Keywords: PCR, TaqMan probe, SYBRgreen

Herpes simplex virus types 1 (HSV 1) and 2 (HSV 2) cause common skin infections and may also cause serious infections of the central nervous system. These infections are often diagnosed with real time Polymerase Chain Reaction (real time PCR). In this project a new PCR-method for detection of HSV and VZV was validated on Rotor-Gene Q using commercial PCR-kits from Qiagen and GeneProof and in-house designed TaqMan primers and probes. The aim with the in-house PCR was to improve the sensitivity and specificity from the method on Lightcycler 480 II and to make the HSV analysis a duplex. The commercial kits were evaluated through analysis of QCMD external control panels and patient material. The master mixes for the in-house PCR were optimized and the sensitivity of the analysis was tested through dilution series of control material. The specificity of the in-house PCR was tested by analysing negative control material, positive and negative patient material (40 VZV, 142 HSV) and QCMD control panels. The results suggested that the in-house PCR on RotorGene Q for HSV worked well as a duplex and had comparable results to Lightcycler in sensitivity and specificity tests for HSV 1 but poorer results for HSV 2. The commercial kits had comparable results to both Lightcycler and the in-house PCR but further testing was needed to come to any conclusions.

Innehållsförteckning

Inledning	1
Bakgrund	1
Medicinsk bakgrund	1
Herpes simplex virus.....	1
Varicella-Zoster Virus.....	2
Metodologisk bakgrund	3
Polymerase Chain Reaction.....	3
SYBRgreen och smältpunktsanalys.....	3
TaqMan-prober.....	4
PCR, Herpes simplex och Varicella-Zoster virus.....	5
Validering av en ny PCR-metod.....	6
PCR-instrument.....	7
Syfte	8
Material och metod	8
Utvärdering av PCR-kit	8
Material.....	8
GeneProof kit (GeneProof).....	9
Qiagen Artus kit (Qiagen).....	10
Jämförelse av in-house metoder och kit.....	10
In-house PCR metodvalidering	10
Primer och probe design:.....	10
Primerspecificitet: SYBRgreen.....	11
Optimering av VZV-mastermix.....	12
Optimering av HSV-mastermix.....	12
VZV Sensitivitet.....	13
HSV Sensitivitet.....	13
VZV Specificitet.....	13
HSV Specificitet.....	14
Analys av QCMD externa paneler.....	14
Statistik	14
Etiska överväganden	14
Resultat	14
Utvärdering av PCR-kit	14
Jämförelse av in-house metoder och kit.....	16
In-house PCR metodvalidering	16
Primerspecificitet: SYBRgreen.....	16
Optimering av VZV-mastermix.....	17
Optimering av HSV-mastermix.....	18
VZV Sensitivitet.....	19
HSV Sensitivitet.....	19
VZV Specificitet.....	20
HSV Specificitet.....	21

Diskussion.....	26
Slutsatser.....	30
Omnämmanden.....	30
Referenser.....	31
Bilagor.....	35

Inledning

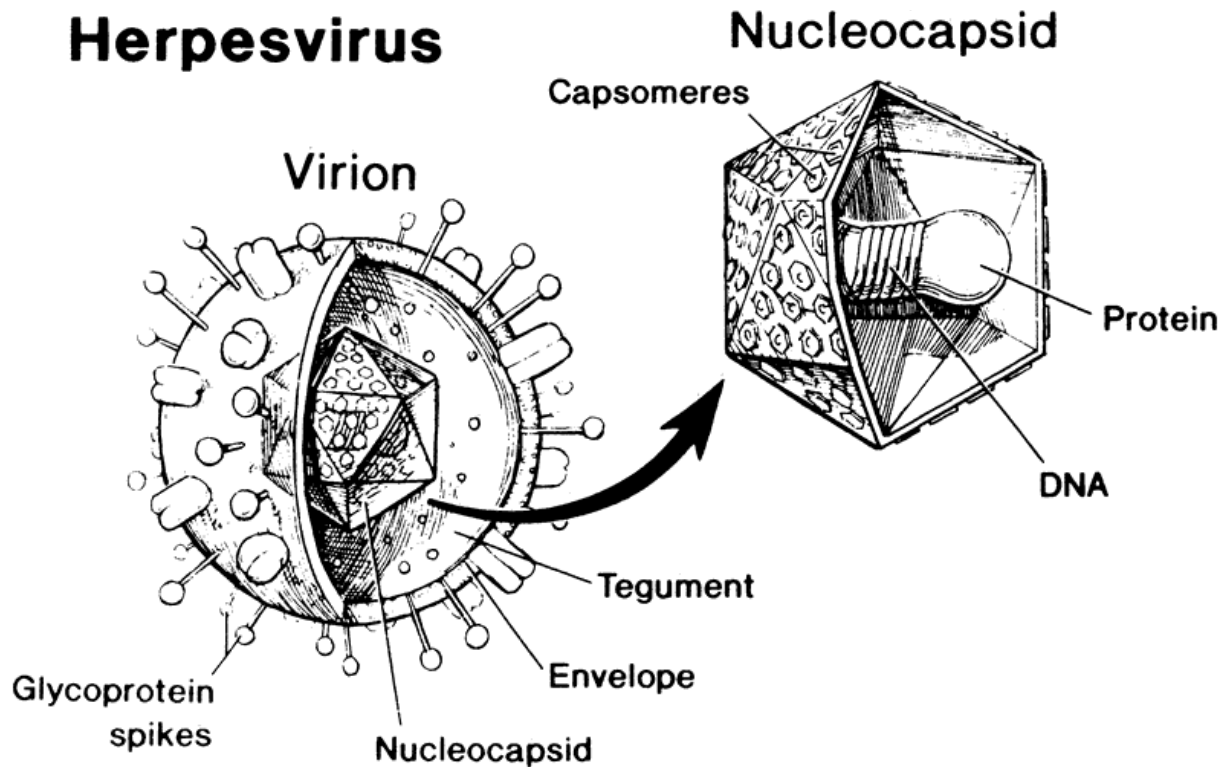
Realtids-PCR analysen för Herpes simplex virus typ 1 (HSV-1) och typ 2 (HSV-2) samt Varicella-Zoster (VZV) på Molekylärbiologen i Skövde skulle valideras på ett nytt instrument (Rotor-Gene Q, Qiagen). Det nuvarande instrumentet (Lightcycler 480, Roche) var inte kompatibelt med datorsystemet på laboratoriet (LIS) och bytet krävdes så att dataöverföring av resultat mellan instrument skulle bli automatiskt. Flytten innebar en ändring i PCR-metoden från att använda SYBRgreen och smältpunktsanalys till en probebaserad TaqMan metod. Avläsning av smältpunktsanalys är svårt att automatisera och låg specificitet av metoden är ett känt problem (1). Målet för laboratoriet var att antingen använda kommersiella PCR-kit i den nya metoden, eller designa en ny in-house PCR med primers, probe och mastermix. Analysen för HSV-1 och HSV-2 skulle vara en duplexreaktion, vilket innebar att de båda typerna av HSV skulle analyseras tillsammans i samma rör, och både HSV och VZV analyserna skulle gå på samma temperaturprotokoll. Känsligheten och specificiteten för analyserna borde också förbättras.

Bakgrund

Medicinsk bakgrund

Herpes simplex virus

Herpes simplex virus typ 1 (HSV 1) och typ 2 (HSV 2) ingår i släktet *simplexvirus* inom familjen Herpesviridae (2). De vanligaste infektionerna som HSV 1 och 2 orsakar är munsår och genitala blåsor. Genitala blåsor hos gravida kvinnor kan leda till att viruset passerar från mor till barn under förlossningen vilket kan ge livshotande sjukdom hos det nyfödda barnet, bland annat encefalit. HSV 1 orsakar också ögonsjukdomar inklusive konjunktivit och keratit som kan leda till blindhet. Efter primärinfektionen lagras HSV i neuroner och det kan senare aktiveras igen i epitelet i form av blåsor (3). Detta gör att HSV-infektioner oftast är utan symtom och det är under den aktiva "shedding" fasen av sjukdomen när blåsorna bildas som viruset kan sprida sig. HSV 1 och HSV 2 är stora dubbelsträngade DNA virus och de två subtyperna har liknande genomisk struktur (4). Viruserna har en kapsel med minst 10 olika glykoproteiner på ytan (Figur 1) (2). Inget vaccin finns än mot herpesinfektioner men de kan behandlas med nukleosidanaloger, till exempel aciklovir och valaciclovir (5).



Figur 1: Bild som visar strukturen av Herpesvirus inklusive glykoproteinerna (Glycoprotein spikes) och kapsiden (Envelope) samt andra viktiga delar av viruset (6)

Varicella-Zoster Virus

Varicella-Zoster virus (VZV) är ett dubbelsträngat DNAvirus som ingår i α -herpesvirus subfamiljen av Herpesviridae (7). VZV är ett väldigt smittsamt virus och till skillnad mot HSV sprids VZV via luften och orsakar primärinfektioner i tonsillerna och slemhinnor i luftvägarna. Viruset tar sig från blodet till lymfsystemet där det infekterar T-celler som sedan sprider viruset till epitelet. En sekundär infektion i huden uppstår efter 11-13 dagar (8). Infektioner från VZV debutera vanligast hos barn som vattkoppor och kan reaktiveras senare i 10-20% av de smittade individerna och ger blåsor på huden (bältros) (9). Eftersom reaktivering av viruset skadar neuronerna kan det leda till postherpatisk neuralgi (PHN) (8). Viruset kan också orsaka infektioner i CNS samt respiratoriska infektioner i både friska liksom immunsupprimerade individer. Det är viktigt att skilja VZV infektioner från HSV infektioner eftersom de kan vara kliniskt lika (9, 10). Ett levande vaccin som heter Zostavax finns för vuxna som är över 50 år. Målet med vaccinet är att reducera incidensen och svårigheten av bältros och PHN genom att ökar immunitet mot VZV bland de äldre. Vaccinet har varit tillgängligt i Europa sedan 2006 (11). VZV-infektioner kan behandlas med till exempel aciklovir, valaciklovir och famciklovir men lindrig vattkoppsjukdom bland ungdomar och barn behöver inte behandlas. Vid bältros är det viktigt att behandling ges

snabbt (inom 72 timmar) för att minska smärta och ge snabbare utläkning. Därför är det viktigt att ha en snabb analysmetod för VZV (5).

Metodologisk bakgrund

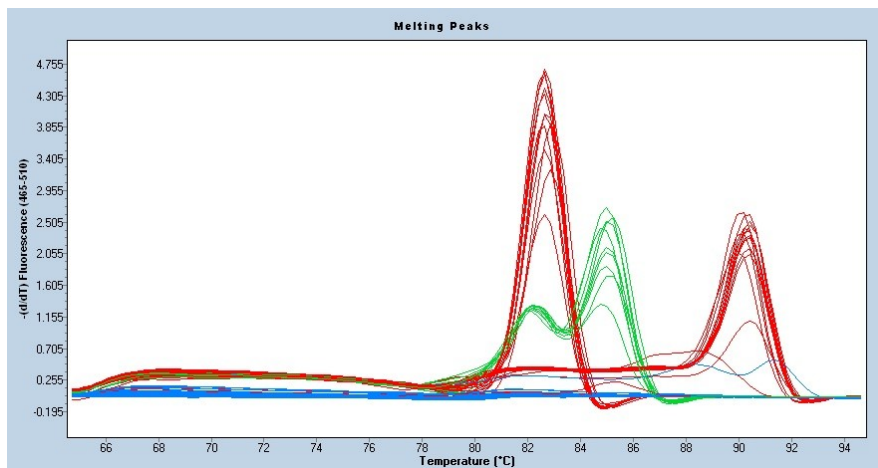
Polymerase Chain Reaction

Polymerase chain reaction (PCR) är en metod för kopiering av DNA som uppfanns 1984 av Kary Mullis. Om DNA sekvenserna före och efter en målsekvens är kända kan målsekvensen amplifieras med hjälp av en värmestabil DNAPolymeras, till exempel *Taq* DNAPolymeras som kommer från den termofila bakterien *Thermus aquaticus*. Metoden kräver också specifika oligonukleotider eller primers som är riktade mot de kända DNA-sekvenserna på sidorna av målsekvensen, samt de fyra deoxyribonukleosid trifosfater (dNTP) som används för förlängning av DNAt (12). DNA-sekvensen som ska amplifieras kallas för templat-DNA (13). Innan amplifiering av DNAt ingår det ofta ett dekontamineringssteg i PCR-protokollet där Uracil-DNA Glycosylas (UDG) används för att ta bort kontamineringsprodukter (10). Under höga temperaturer kan det ske en deaminering av cytosin och uracil kan då felaktigt bindas in i DNAt. UDG är ett protein som kan rätta till felet genom att ta bort uracil med hydrolys (14,15). Klassisk tre-steps-PCR börjar med att det dubbelsträngade DNAt separeras med värme till cirka 95-97°C. För att tillåta annealing av primers till enkelsträngat DNA kylls lösningen till cirka 60°C och primers binder till 3' änderna. Lösningen värms sedan för elongering av DNAt till 72 °C som är den optimala temperaturen för DNA-polymeraset. Primers förlängs med hjälp av fria dNTPs så att det bildas dubbelsträngat DNA. Processen av värmning och kylning repeteras vilket gör att målsekvensen amplifieras exponentiellt (12). Numera används ofta en tvåstegs-PCR där annealings- och elongeringsfaserna sker i samma temperatur, cirka 60°C (16, 13).

Med realtids-PCR mäts PCR produkten efter varje cykel med hjälp av fluorescerande färgmolekyler som binder till dubbelsträngat DNA (SYBRgreen) eller som ingår i specifika probe som binder det enkelsträngade DNAt under amplifikation (TaqMan-probe). En bestämd tröskel-signalnivå används för att skilja mellan bakgrundsfluorescens och en signifikant ökning i signalstyrka. Antalet cykler som det tar innan signalintensiteten överstiger tröskelvärdet benäms C_T och är relaterat till antalet original DNA-kopior i provet (17).

SYBRgreen och smältpunktsanalys

En fluorescerande molekyl som används inom PCR är SYBRgreen (12, 17, 18). SYBRgreen binder till minor groove i dubbelsträngat DNA (17). Endast inbundna molekyler avger fluorescens som kan detekteras (12, 18). Efter varje PCR cykel bildas en ny dubbelsträngad PCR produkt som SYBRgreen kan binda till och då ökar fluorescensintensiteten (17). När målsekvensen har amplifierats kan fluorescenssignalen detekteras (12). Den här detektionsmetoden är kosteffektiv, lätt att använda (18) och kräver inga specifikt designade probe (17). Nackdelen med metoden är att SYBRgreen binder allt dubbelsträngat DNA och kan därför också binda till ospecifika PCR-produkter och ge falskt positiva signaler från bakgrunden (17,18). PCR-produkten från SYBRgreen-metoden kan analyseras med hjälp av smältpunktsanalys. När dubbelsträngat DNA värms denatureras det till enkelsträngat. Om SYBRgreen är bunden till det dubbelsträngade DNA:t minskar fluorescensen plötsligt när smältpunkten (T_m) nås och DNA:t denatureras. T_m kan bestämmas med hjälp av ett diagram som plottar fluorescens mot temperatur (Figur 2). Metoden fungerar dock inte för TaqMan prober eftersom proben klyvs irreversibelt under amplifiering (17).

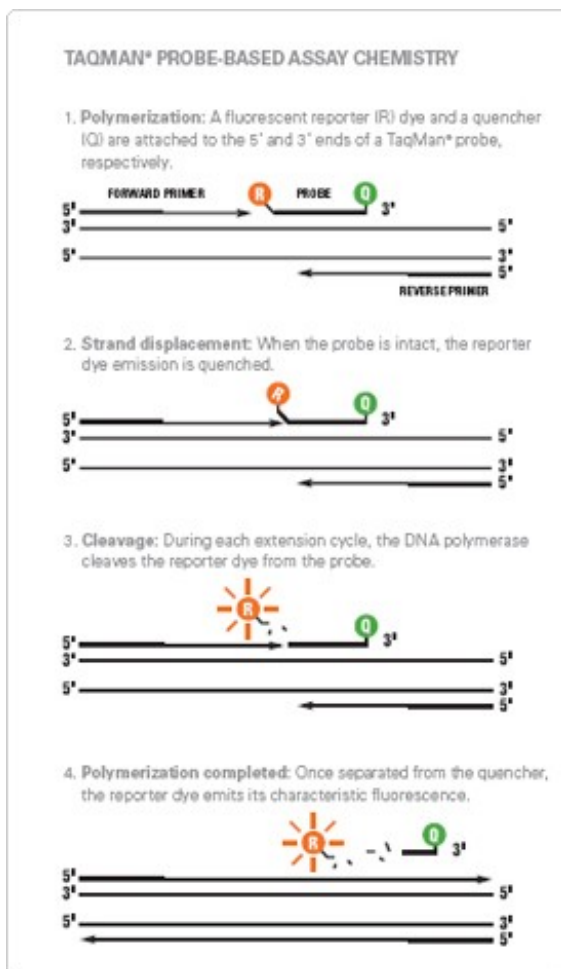


Figur 2: Smältkurvor för HSV 1 (topp på 83°C), HSV 2 (topp på 90°C) och VZV (dubbeltopp på 82,5/85°C) på Lightcycler 480 (Roche) (19)

TaqMan-prober

TaqMan-prober är korta oligonukleotider med två inbundna fluorescerande färgmolekyler av olika våglängder. Färgmolekylen som ska detekteras heter reportern och är bunden till 5' änden. Den andra färgmolekylen som heter quenchern reducerar signalen från reportern genom Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) och är bunden till 3' änden. FRET betyder att energi från fluoroforen med högre energi (reportern) överförs till fluoroforen med lägre energi (quenchern). När molekylerna ligger nära varandra blir signalen från reportern

dämpad. TaqMan-proben binder nedströms från målsekvensen och klyvs av DNA-polymeraset när primern förlängs. När proben klyvs skiljs reportern från quenchern och reporterns signal ökar (Figur 3). För varje PCR-cykel binder flera probe som sedan skiljs och därför ökar reporterns signal tills den går att detektera. En ökad signal visar att den specifika målsekvensen för proben finns i provet. Eftersom proben bryts ned påverkar den inte PCR processen (17, 20). Fördelen men att använda TaqMan-probe är att metoden är mer specifik än SYBRgreen och genom att använda probe med olika reporterfärger kan man detektera mer än en målsekvens i samma brunn. Specifika probe måste dock designas för varje analys (17).



Figur 3: Schematisk bild som beskriver Taqman probes kemi inklusive inbindning av proben, förlängning av forward och reverse primers, hydrolysis av proben och fluorescens signalökning (21)

PCR, Herpes simplex och Varicella-Zoster virus

Realtids-PCR har länge använts för detektion av VZV samt HSV 1 och 2 på laboratoriet. Smältpunktsanalys med SYBRgreen är en vanlig metod som används, men metoden har en nackdel. Ibland ger metoden atypiska smältkurvor som inte stämmer med smältpunkten för de positiva kontrollerna (1). TaqMan prober kan användas för att detektera HSV och VZV med högre specificitet (10). HSV 1 och 2 kan skiljas åt genom att använda prober som är riktade

mot DNA sekvenser med små skillnader i baspar mellan de två sub-arterna (22), till exempel HSVs DNA polymeras gen (4). En annan sekvens i DNAt som probe och primers har riktats mot för detektion av HSV 1 och 2 är gener för virusens glykoproteiner (10) till exempel glykoproteinet gB (16). Prober för VZV är ofta riktade mot virusets DNA polymeras (10).

Validering av en ny PCR-metod

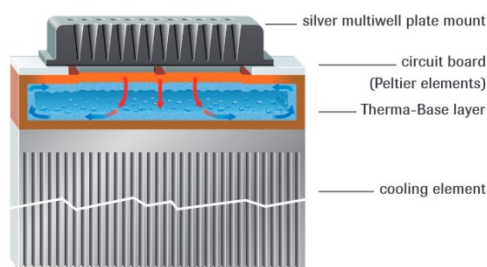
Syftet med det här projektet var att validera en ny PCR-metod för HSV och VZV med TaqMan probe eller kommersiellt kit. När en ny in-house PCR-metod valideras måste primer- och probe-sekvenser väljas. Sekvenserna som väljs ska matcha de önskade generna från mikroorganismen som de är designade för och inte korsreagera med någon annan art. För att kontrollera specificiteten av primers och probe kan en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-sökning utföras som använder algoritmer för att jämföra den sökta sekvensen med sekvenserna i nukleotiddatabaser. Sekvenserna i databasen får en score beroende på hur väl de matchar den sökta sekvensen och de mest statistiskt signifikanta fynden visas först. Statistisk signifikans i resultatet visas genom E-värdet, som beskriver hur många slumpmässiga hits som förväntas hittas i en databas av en viss storlek och ett statistiskt signifikant resultat ska ha ett E-värde så nära noll som möjligt. De andra intressanta värdena som visas i sökningsresultatet är Query coverage, som visar hur många nukleotider i den sökta sekvensen som BLAST kan aligna med databasfynd. Maximum identity visar hur väl den sökta sekvensen och den hittade sekvensen matchar nukleotid för nukleotid. 100 % är ett önskat resultat för båda Query coverage och Maximum identity (23).

En metods sensitivitet beskriver dess förmåga att hitta sant positiva resultat (24). Sensitiviteten av en ny PCR-metod kan bestämmas genom att hitta det lägsta antalet DNA-kopior som krävs för att ge ett positivt resultat vilket då också visar detektionsgränsen (22). Sensitivitet kan bestämmas genom att göra en spädningsserie från ett prov eller kontroll med känd koncentration och sedan köra PCR på spädningarna för att se var detektionsgränsen ligger (22, 25). Genom att upprätta en standardkurva på resultaten från en spädningsserie kan effektiviteten av en PCR-metod räknas ut. Standardkurvan från en optimerad PCR bör ha en lutning på 3,33 vilket visar att C_T -värdet ökar 3,33 cyklar för varje 1/10 spädning (16). Korrelationskoefficient (r) från en standardkurva visar hur stort linjärt samband data har. 1 visar ett starkt positivt samband och -1 visar ett starkt negativt samband. Om r kvadreras får man den determinationskoefficienten (R^2) som ger en statistisk mått på hur mycket variansen i y-variabeln kan förklaras av x-variabeln och det ska vara så nära 1 som möjligt. (26).

Specificiteten av en metod visar dess förmåga att ge sant negativa svar (24). För att testa specificiteten av en PCR-metod för virus kan test-material som innehåller andra virus typer än de sökta användas som inte ska amplifieras av metoden (22). Ett annat sätt att kontrollera specificiteten av en metod är att analysera kända positiva och negativa prov och kontroller för att se om metoden ger rätt resultat. Specificiteten kan också verifieras kliniskt genom att analysera prover parallellt med de nya och nuvarande metoderna och jämföra resultaten (25).

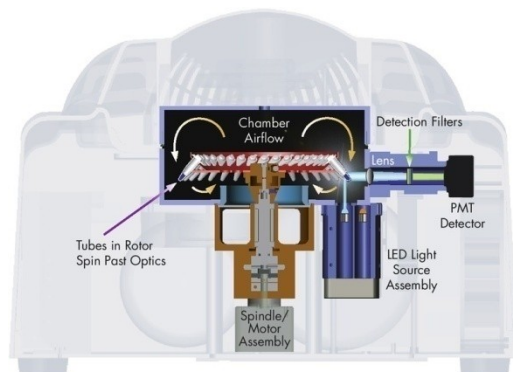
PCR-instrument

En av anledningarna till att en ny metod för HSV och VZV behövdes var att PCR-instrumentet för analysen skulle bytas från Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) till Rotor-Gene Q (Corbett Research, Australien).



Figur 4: Tvärsnitt bild på Lightcycler 480 II som visar kylplattan (cooling element), värmeblock (Therma-Base layer) och silverplattan med provbrunnar (silver multiwell plate mount) (27)

Lightcycler 480 II är en "thermal block cycler" som använder sig av kondensation och avdunstning i ett värmeblock och kylplatta för att snabbt kunna ändra temperaturen av proverna som appliceras i brunnar på en silver platta. Fluorescenssignalen från PCR-produkterna avläses med hjälp av en bredspektrum LED med hög intensitet och olika filter för att kunna läsa av de olika färgerna (27) (Figur 4).



Figur 5: Tvärsnitt bild på Rotor-Gene Q som visar kammaren med cirkulerande luft (Chamber Airflow), centrifugalrotor (Spindle), detektionsfilter (Detection filters), fotomultiplier detektorn (PMT Detector) och LED ljuskällan (LED Light Source Assembly) (28)

Rotor-Gene Q har en kammare där proverna snurrar på en centrifugalrotor med cirkulerande luft som håller temperaturen stadigt, eller värmer och kyler snabbt när byte av temperatur krävs. Rören snurrar förbi detektionsoptik som avläser var 150 millisekund. I detektionsoptiken ingår det 6 LED ljuskällor med 6 olika detektions filter. Detta ger 6 olika kanaler för avläsning från UV-ljus till infraröd. Signalen detekteras med en fotomultiplier detektor (28) (Figur 5).

Syfte

Syftet med studien var att validera en ny Realtids-PCR analys metod för HSV 1 och 2 samt VZV med in-house TaqMan primers och prober och med ett kommersiellt kit på ett nytt PCR-instrument (Rotor-Gene Q, Qiagen). Målet var även att förbättra sensitivitet och specificitet av analysen.

Material och metod

Utvärdering av PCR-kit

Material

Fyra kommersiella PCR-kit, två för HSV och två VZV (Tabell 1) utvärderades på Rotor-Gene Q (Corbett Research, Australia). Provmaterialet som användes för att testa HSV-kiten var fem externa kvalitetskontroller från QCMD (Qnostics, Glasgow, Scotland) för HSV 1 och 2 samt nio patientprover från blåsmaterial av vilka två var positiva för HSV 1, fem var positiva för HSV 2 och två var negativa för båda underarterna.

För VZV-kiten testades fem kvalitetskontroller från QCMD samt sju patientprover från blåsmaterial varav fem var positiva för VZV och två var negativa. Samma prov- och kontrollmaterial analyserades med kiten från de två olika företagen. Patientmaterialet som användes extraherades genom magnetkuleextraktion på MagNA Pure 96 (Roche, Mannheim, Tyskland).

Tabell 1. Kommerciella PCR-kit för HSV 1/2 och VZV med namn, katalognummer, virus som kitet påvisar och tillverkare för varje kit samt genen som primers och probe är riktade mot och fluroscensmolekylen eller kanalfärg för proben.

PCR-kit	Kat. nummer	Virus	Tillverkare	Gen	Probe/kanal
GeneProof Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) PCR Kit	HSV/ISIN/025	HSV 1/2	GeneProof, Brno, Czech Republic	gB	HSV 1- FAM HSV 2-Cy5
GeneProof Varicella-Zoster Virus (VZV) PCR kit	VZV/ISIN/025	VZV	GeneProof, Brno, Czech Republic	ORF62	VZV-FAM
Artus HSV-1/2 RG PCR kit	4500263	HSV 1/2	Qiagen, Hilden, Tyskland	Okänd	HSV 1-Cycling Green HSV 2-Cycling Orange
Artus VZV RG PCR kit	4502263	VZV	Qiagen, Hilden, Tyskland	Okänd	VZV-Cycling Green

GeneProof kit (GeneProof)

Ett PCR-kit för HSV och ett för VZV från GeneProof (Brno, Tjeckien) utvärderades på Rotor-Gene Q. Alla spädningar, tider och temperaturerna som användes rekommenderades av tillverkaren och var samma för båda kiten. Reaktionsvolymen 40 µl (30 µl mastermix, 10µl prov eller kontroll) blandades med QIAgility pipetteringsrobotten (Qiagen, West Sussex, UK). Fyra kalibratörer för HSV och VZV som ingick i kiten med koncentration 10⁴, 10³, 10² och 10¹ kopior/µl användes som positiva kontroller och vatten användes som negativ kontroll (NTC). När patientproverna analyserades användes kalibratören med 10² kopior/µl som positiv kontroll och vatten som negativ kontroll.

PCR-protokollen för båda GeneProof-kiten på Rotor-Gene Q började med en UDG dekontaminering i 37 °C, 2 minuter och en initial denaturering i 95 °C, 10 minuter. Under 45 cykler amplifierades DNAt genom att denaturera DNAt 5 sekunder i 95 °C, sänka temperaturen till 60 °C för 40 sekunder för annealing av primers och slutligen höja temperaturen till 72 °C i 20 sekunder för förlängning av DNAt. Från HSV-kitet visade en signalökning i den gröna kanalen (FAM) ett positivt resultat för HSV 1 och en signalökning i

den röda kanalen (Cy5) betydde ett positivt resultat för HSV 2. Ett positivt resultat för VZV gav en signalökning i den gröna kanalen (FAM).

Qiagen Artus kit (Qiagen)

Mastermixen för Qiagens Artus HSV-1/2 kit förbereddes genom att blanda 25µl HSV-1/2 RG Master, 5µl HSV-1/2 RG Mg-Sol och 2µl HSV-1/2 RG IC per prov. Mastermixen för Artus VZV kit innehöll 25,5µl VZV RG Master, 4,5µl VZV RG Mg-Sol och 2µl VZV RG IC per prov. Alla lösningar ingick i kiten och volymerna rekommenderades av tillverkaren. I kitet för HSV-1/2 fanns en positiv kontroll för HSV 1 och en positiv kontroll för HSV 2 samt en NTC som användes när alla QCMD kontroller och patientprover analyserades. För VZV användes fyra kvantifieringsstandarder som ingick i kitet med koncentrationer 10^4 , 10^3 , 10^2 och 10^1 kopior/µl som positiva kontroller och vatten som NTC när QCMD kontrollerna analyserades. När patientproverna amplifierades användes standarden med 10^2 kopior/µl som positiv kontroll och vatten som negativ kontroll.

För båda Artus PCR-kiten blandades reaktionsvolym 50 µl (30µl mastermix och 20µl prov eller kontroll) med QIAgility pipetteringsrobot och DNAt amplifierades på Rotor-Gene Q. Temperaturprotokollet började med 10 minuter i 95 °C och sedan följde 45 cykler: 95 °C, 15 sekunder, 65 °C, 30 sekunder, och 72 °C, 20 sekunder. Protokollet innehöll också en touchdown sekvens där temperaturen sänktes 1°C per cykel för 10 cykler. Resultat för HSV 1 avlästes i den gröna kanalen (FAM) och HSV-2 avlästes i den orangea kanalen (JOE). På VZV-kitet avlästes signalen i den gröna kanalen (FAM).

Jämförelse av in-house metoder och kit

För att få en jämförelse av de nya in-house PCR-metoderna för VZV och HSV med de kommersiella kiten och den nuvarande metoden på Lightcycler analyserades de externa QCMD-panelerna och patientproverna som hade analyserats med kiten med de nya optimerade in-house metoderna på Rotor-Gene Q.

In-house PCR metodvalidering

Primer och probe design:

Primers och probe som användes för in-house PCR-metoden beställdes från Eurogentec (Liège, Belgien). För HSV 1 och 2 användes primers och probe som designats i en studie av Namvar et al, 2005 (16). Primers och probe för VZV designades på molekylärbiologen i

Skövde och är riktade mot samma gen som den nuvarande VZV-metoden (19) (Tabell 2). Samtliga primers och probe analyserades för "mismatch" och korsbindningar genom en BLAST-sökning i den NCBI databasen (29). Alla sekvenser fick 100 % identitet och coverage med ett lågt E-värde och blev teoretiskt godkända. Ett alignment utfördes på primers och probe för HSV 1 och 2 för att hitta eventuella mismatchar i DNA-sekvenserna. Eftersom proben för HSV 1 innehöll ett mismatchat baspar och probe för HSV 1 och 2 var antisense-sekvenser på fel DNA-sträng så beställdes nya modifierade probe för HSV 1 och 2 (Tabell 2).

Tabell 2. Sekvens, gen och label för forward och reverse primers samt prober till in-house PCR-metoderna för HSV 1, 2 och VZV. Sekvensskillnader mellan HSV 1 och 2 probe samt de modifierade proberna har markerats.

Primer eller probe	Sekvens	Gen	Label
HSV 1-FP	GCAGTTTACGTACAACCACATACAGC	gB	
HSV 2-FP	TGCAGTTTACGTATAACCACATACAGC	gB	
HSV 1/2-RP	AGCTTGCGGGCCTCGTT	gB	
HSV 1-Probe	CGGCCCAACATATCGTTGACATGGC	gB	5'FAM,3'BHQ1
HSV 2-Probe	CGCCCCAGCATGTCGTT <u>CACGT</u>	gB	5'JOE, 3'BHQ1
HSV 1-Probe mod.	CCATGTCAACGATATGTTGGGCCG	gB	5'FAM,3'BHQ1
HSV 2-Probe mod.	A <u>CGTGA</u> ACGACATGCTGGGGCG	gB	5'JOE, 3'BHQ1
VZV-FP	TGACCCTGTCTCATTACTA	ORF4	
VZV-RP	CCCAAATTGGATATTAATAAGTTTG	ORF4	
VZV-Probe	CGTCCACCATCCGCCTACATA	ORF4	5'FAM,3'BHQ1

Primerspecificitet: SYBRgreen

För att testa de nya primers specificitet analyserades dubbelprov av en positiv kontroll och en negativ kontroll (vatten) för HSV 1, 2 och VZV med en SYBRgreen metod utan probe. De positiva kontrollerna för HSV 1 och 2 var poolade positiva prov från QCMD 2013/2014 och den positiva kontrollen för VZV var ett QCMD kontroll från 2012 (Qnostics, Glasgow, Scotland). I mastermixen för HSV 1 och 2 blandades 10 µl Express SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen, Göteborg, Sweden) med 2µl HSV 1 forward primer (10µM), 2µl HSV 2 forward primer (10µM) och 2µl HSV 1/2 reverse primer (10µM) samt 3µl vatten för varje kontroll. VZV mastermixen innehöll 10µl Express SYBR GreenER qPCR Supermix Universal, 2µl VZV forward primer (10µM) och 2µl VZV reverse primer (10µM) samt 5µl vatten för varje kontroll. 19µl mastermix blandades med 1µl kontroll och DNAt amplifierades på Rotor-Gene Q med PCR-protokollet av Namvar et al, 2005 (16) som anges i tabell 3. PCR-produkterna analyserades slutligen med smältpunktsanalys. Som en kontroll för primerdimers analyserades HSV 1 kontrollerna samt Qiagens positiva HSV kontroll från Artus-kitet med SYBR-green metoden på Rotor-Gene Q och HSV mastermixen med HSV 2 forward primern utbytt mot vatten.

Tabell 3. PCR-protokollet för in-house PCR metoder som beskriver temperatur och tid för alla PCR-steg samt reaktionsvolymen och volymen av mastermix och DNA-templat som används per prov.

PCR-steg	Temperatur (°C)	Tid
UDG-dekontaminering	50	2 min
Initial denaturering	95	10 min
45 cykler:		
1:	95	15 sek
2:	58	60 sek
Reaktionsvolym:	20 µl	
Optimerad mastermix	15 µl	
DNA-templat	5 µl	

Optimering av VZV-mastermix

Mastermixen för VZV optimerades genom att analysera två spädningar av VZV kontrollen med koncentration 1:10 och 1:1000 på PCR protokollet enligt tabell 3 med fyra mastermix med varierande koncentrationer av primers och probe samt Express qPCR Supermix Universal (Invitrogen, Göteborg, Sweden) (Tabell 4).

Tabell 4. Mastermixrecept för optimering av VZV-mastermixen till in-house PCR med fyra olika mastermixar med olika förhållanden mellan forward och reverse primers, probe samt vatten.

Mix	Mastermix (µl)	Forward primer (µl)	Reverse Primer (µl)	VZV Probe (µl)	Vatten (µl)
1	10	1	1	0,5	2,5
2	10	1	1	1	2
3	10	1	1	0,2	2,8
4	10	0,5	0,5	0,5	3,5

Optimering av HSV-mastermix

Mastermixen för HSV 1 och 2 optimerades genom att analysera en spädningsserie med spädningar från 1:1 till 10^{-6} i 1:10 steg på positiva patientprover för HSV 1 och 2 på Rotor-Gene Q med fyra olika mastermix blandningar. Probe från Namvar et al, 2005 (16) och de modifierade proberna blandades i mastermixar som anges i tabell 5. PCR-protokollet anges i tabell 3.

Tabell 5. Mastermixrecept för optimering av HSV-mastermixen till in-house PCR med fyra olika mastermixar med olika förhållanden mellan forward och reverse primers, original och modifierade probe samt vatten och Express qPCR Supermix Universal.

Mix	Express qPCR Supermix Universal (µl)	HSV1 FP (µl)	HSV2 FP (µl)	HSV1/2 RP (µl)	HSV1 Probe (µl)	HSV1 Probe Mod (µl)	HSV2 Probe (µl)	HSV2 Probe Mod (µl)
Mix 1	8,8	1,8	1,8	1,8	0,4	-	0,4	-
Mix 2	10,0	1,4	1,4	1,4	0,4	-	0,4	-
Mix 3	8,8	1,8	1,8	1,8	-	0,4	-	0,4
Mix 4	10,0	1,4	1,4	1,4	-	0,4	-	0,4

VZV Sensitivitet

Analytiska sensitiviteten av den nya optimerade PCR-metoden för VZV jämfördes med den nuvarande metoden på Lightcycler genom att analysera en spädningsserie av VZV-kontrollen med koncentrationer från 1:1 till 10⁻⁸ i 1:10 steg.

HSV Sensitivitet

För HSV 1 och 2 utfördes spädningsserier med samma koncentration som VZV-serien på patientprover med ett C_T från Rotor-Gene Q på 20,4 för HSV 1 och 22,1 för HSV 2. Samtliga spädningsserier amplifierades på Rotor-Gene Q med PCR-protokollet enligt tabell 3. Spädningsserierna analyserades även med den nuvarande metoden (19) på Lightcycler 480 II 8 (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland).

VZV Specificitet

Specificiteten för VZV PCR-metoden testades först genom att analysera två patientprover för HSV 1, två för HSV 2 och två negativa för HSV 1 och 2 samt två *Staphylococcus aureus* stammar (ATCC 29213, CCUG 43764) och en *Staphylococcus epidermidis* stam (ATCC 12228) på Rotor-Gene Q med PCR-protokollet enligt tabell 3. Sedan analyserades sparade patientprover som hade analyserats för VZV med den nuvarande metoden (19) på Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) varav 16 prover var frysta (9 positiva, 7 negativa) och 24 var färskt (9 positiva, 15 negativa) på Rotor-Gene Q med det optimerade PCR-protokollet (se tabell 3).

HSV Specificitet

För HSV PCR-metoden testades specificiteten först genom att analysera tre patientprover som hade analyserats för VZV (två positiva, en negativ) samt *Staphylococcus* stammarna som hade analyserats för VZV-specificitetstestet. Sedan analyserades sparade patientprover som hade analyserats för HSV 1 och 2 på Lightcycler; 29 positiva för HSV 1, 24 positiva för HSV 2 och 63 negativa för båda underarterna. Samtliga prover analyserades på Rotor-Gene Q med det optimerade PCR-protokollet.

Analys av QCMD externa paneler

QCMD-paneler för HSV 1, 2 och VZV (8 HSV 1 kontroller, 6 HSV 2 kontroller och 10 VZV kontroller) analyserades på de optimerade in-house PCR-metoderna. Panelerna analyserades två gånger med in-house metoderna, en gång med handpipettering och en gång med pipettering av QIAgility-pipetteringsroboten. Resultaten jämfördes med den nuvarande metoden på Lightcycler.

Statistik

Resultaten bearbetades statistiskt i IBM SPSS Statistics 20 (IBM, New York, USA). C_T -värdena för de kommersiella kiten jämfördes med ett Kruskal-Wallis för tre eller fler oberoende stickprov. C_T -värdena för jämförelse av patientmaterial mellan de nya in-house metoderna och den nuvarande metoden på Lightcycler analyserades med ett Wilcoxon's tecken-rangtest för parvisa observationer.

Etiska överväganden

Patientmaterial som ingår i arbetet avkodades så att det inte gick att koppla resultat till individer och biobankslagen tillåter tillgång till sparade patientmaterial. Eftersom arbetet innebär diagnostiskt utveckling och inte är någon forskning krävs det inte etiskt tillstånd för arbetet.

Resultat

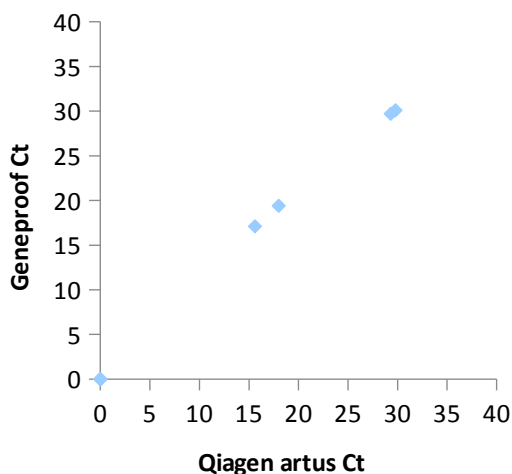
Utvärdering av PCR-kit

Patientprover och QCMD kontroller analyserades på Rotor-Gene Q med PCR-kit från Qiagen och GeneProof. Både kiten hittade samma antal positiva och negativa resultat som den nuvarande metoden på Lightcycler (HSV 1: 4 positiva, 10 negativa; HSV 2: 7 positiva, 7

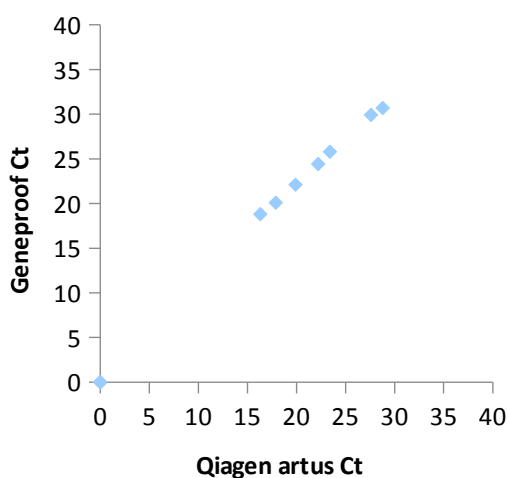
negativa; VZV: 9 positiva, 2 negativa) och med generellt något lägre C_T värden (-4,4 cyklar). Medelvärden och spridning av C_T-värdena för Qiagens Artus kit och GeneProofs kit för HSV och VZV anges i tabell 6. Det fanns ingen statistisk skillnad i C_T-värden mellan kiten för antingen HSV 1 (p=0,987), HSV 2 (p=0,798) eller VZV (p=0,612). Jämförelse av C_T-värden mellan kiten för HSV 1 presenteras i figur 6, HSV 2 i figur 7 och VZV i figur 8.

Tabell 6. Medelvärden och spridning av C_T-värdena för positiva prover och QCMD kontroller mellan Qiagens Artus kit och GeneProofs PCR-kit för HSV 1, 2 och VZV samt den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II och den optimerade inhouse metoden på Rotorgene Q.

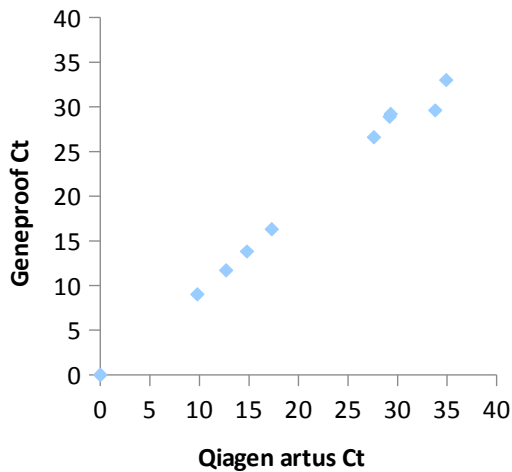
Metod	C _T Medelvärdet (Range)		
	HSV 1 (n=4)	HSV 2 (n=7)	VZV (n=9)
Qiagen artus kit	23,2 (15,6-29,8)	22,3 (16,3-28,8)	23,3 (9,8-34,9)
GeneProof kit	24,1 (17,1-30,1)	24,5 (18,8-30,7)	22,0 (9,0-29,6)
Lightcycler	27,5 (21,5-33,0)	28,7 (21,5-35,1)	26,5 (14,4-37,1)
Inhouse	23,0 (15,6-29,2)	21,9 (17,3-30,1)	21,1 (8,6-31,4)



Figur 6. Jämförelse av Ct-värden av positiva och negativa patientprover samt QCMD kontroller för HSV 1 (n=14) mellan Qiagens Artus och GeneProofs PCR-kit där negativa prover har värdet 0.



Figur 7. Jämförelse av Ct-värden av positiva och negativa patientprover samt QCMD kontroller för HSV 2 (n=14) mellan Qiagens Artus och GeneProofs PCR-kit där negativa prover har värdet 0.



Figur 8. Jämförelse av Ct-värden av positiva och negativa patientprover samt QCMD kontroller för VZV (n=11) mellan Qiagens Artus och GeneProofs PCR-kit där negativa prover har värdet 0.

Jämförelse av in-house metoder och kit

In-house metoderna för båda VZV och HSV påvisade samma antal positiva och negativa prover som kiten med likvärdiga C_T -värden (Tabell 6).

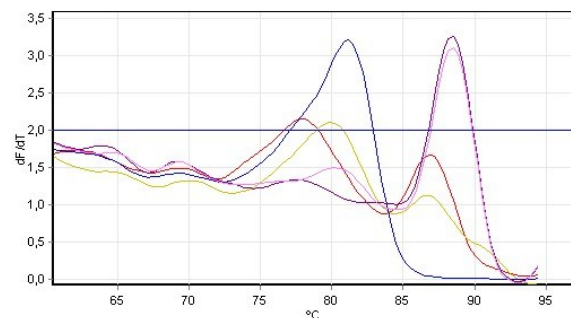
In-house PCR metodvalidering

Primerspecificitet: SYBRgreen

C_T - och T_M -värdena för dubbelproverna av HSV 1, 2 och VZV kontrollerna anges i tabell 7 och utseende på smältkurvorna visas i figur 9.

Tabell 7. C_T -värdena och T_m för HSV 1, 2 och VZV som amplifierades med en SYBRgreen- metod på Rotor-Gene Q.

Virus		C_T -värdet	T_m (°C)
HSV 1	1	25,2	78,0
	2	25,2	80,0
HSV 2	1	20,0	88,5
	2	21,9	88,5
VZV	1	18,3	82,0
	2	15,9	82,0



Figur 9. SYBRgreen smältkurvor för HSV 1 och 2 och nega kontroll (NTC) HSV 1 har två toppar vid 78 och 80°C (gul kurva), HSV 2 har två toppar vid 88,5°C (rosa kurva) och NTC har en topp vid cirka 80°C (blå kurva)

ativ
(röd och
kurvor) och NTC har en

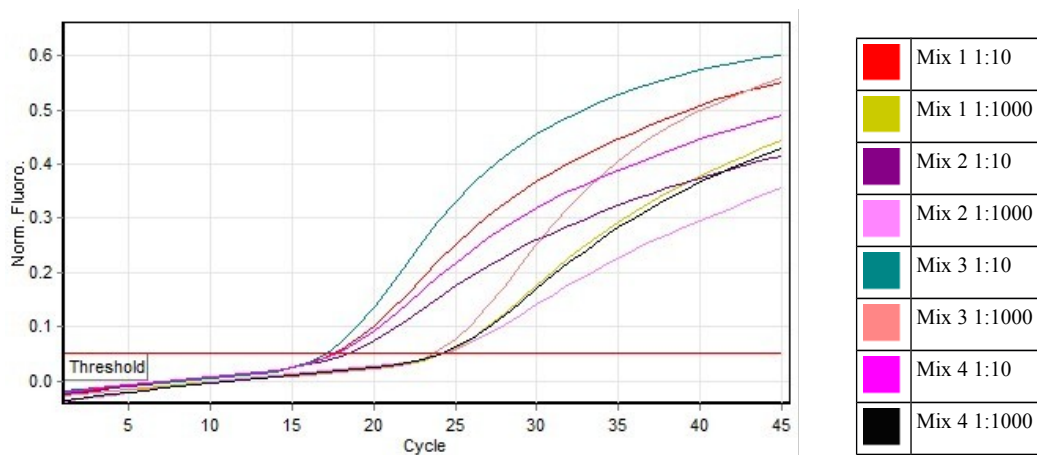
Smältkurvorna för HSV 1 visade flera låga toppar som inte stämde överens mellan dubbelproverna. HSV 1 kontrollen samt HSV 1 kontrollen från Qiagens Artus HSV-kit analyserades om med en mastermix utan HSV 2 primers. C_T - och T_M -värdena visas i tabell 8.

Tabell 8. C_T -värdena och T_m för två HSV 1 kontroller och en NTC som amplifierades med en SYBRgreen-metod på Rotor-Gene Q.

HSV 1 Kontroll		C_T -värdet	T_m (°C)	T_m (°C)
HSV 1	1	27,1	79,5	87,0
	2	27,3	79,5	87,0
HSV 1 Q	1	26,4	82,0	
	2	27,4	81,3	
Vatten	1	27,5	79,5	
	2	27,2	79,5	

Optimering av VZV-mastermix

C_T -värdena för kontrollerna med spädning 10^{-1} gick från 17,0 till 18,4 cykler och C_T -värdena för kontrollen med spädning 10^{-3} gick från 23,7 till 24,2 cykler. Mastermixen som gav lägsta C_T -värdena och högst fluorescens var Mix 3 och mastermixen med högsta C_T -värdena var Mix 2. Utseende på kurvorna visas i figur 10.



Figur 10. Amplifieringskurvor från två spädningar av en VZV-kontroll (10^{-1} och 10^{-3}) som amplifierades på Rotor-Gene Q med fyra VZV-mastermixar med olika förhållanden mellan primers, probe och vatten.

Optimering av HSV-mastermix

Mix 1 hittade spädningar 1:1 till 10^{-4} för båda HSV 1 och 2 med C_T -värden från 21,3 till 34,9 för HSV 1 och 22,8 till 34,7 för HSV 2. Mix 2 hittade spädningar 1:1 till 10^{-4} för HSV 1 (C_T 21,0 - 35,3) och spädningar 1:1 till 10^{-3} för HSV 2 (C_T 22,8-33,7). Med mix 3 hittades spädningar 1:1 till 10^{-4} för båda HSV 1 (C_T 21,6-39,1) och HSV 2 (C_T 23,8-36,7) och mix 4

hittade spädningar 1:1 till 10^{-5} för HSV 1 (Ct 21,4-39,2) och 1:1 till 10^{-4} för HSV 2 (Ct 23,7-35,9) (Tabell 9).

Tabell 9. C_T-värdena för spädningsserier på patientprover för HSV 1 och 2 som amplifierades på Rotor-GeneQ med fyra olika mastermixar där förhållanden mellan primers, probe, vatten och Express qPCR Supermix Universal varierade mellan mastermixar.

Spädning	Mix 1 Ct		Mix 2 Ct		Mix 3 Ct		Mix 4 Ct	
	HSV 1	HSV 2	HSV 1	HSV 2	HSV 1	HSV 2	HSV 1	HSV 1
1:1	21,3	22,8	21,0	22,8	21,6	23,8	21,4	23,7
10 ⁻¹	24,7	26,1	24,7	25,9	25,2	27,0	28,3	26,9
10 ⁻²	28,4	29,6	28,0	29,6	28,5	30,7	28,2	30,5
10 ⁻³	31,3	33,2	31,9	33,7	33,1	33,3	31,3	34,0
10 ⁻⁴	34,9	34,7	35,3	neg	39,1	36,7	39,2	35,9
10 ⁻⁵	neg	neg	neg	neg	neg	neg	40,1	neg

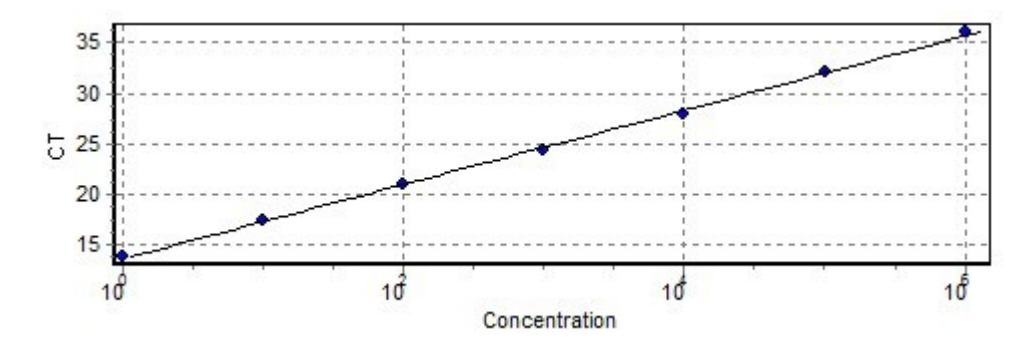
Standardkurvor upprättades på resultaten från spädningsserierna och R²-värdet, lutning och PCR-effektivitet för varje mix räknades ut (Tabell 10).

Tabell 10. R²-värden, lutning och effektivitet uträknade från spädningsserier på patientprover för HSV 1 och 2 som amplifierades på Rotor-GeneQ med fyra olika mastermixar där förhållanden mellan primers, probe, vatten och Express qPCR Supermix Universal varierade mellan mastermixar.

	Mix 1		Mix 2		Mix 3		Mix 4	
	HSV 1	HSV 2	HSV 1	HSV 2	HSV 1	HSV 2	HSV 1	HSV 2
R ² -värdet	0,998	0,984	0,999	0,996	0,984	0,997	0,931	0,990
Lutning	3,38	3,09	3,58	3,64	4,29	3,21	3,69	3,15
Effektivitet (%)	97,63	110,68	90,25	88,25	71,04	104,89	86,64	107,71

VZV Sensitivitet

Spädningen av kontrollen när resultatet från båda metoderna blev negativt var 10^{-7} och C_T värdet från spädningen med den lägsta koncentration som blev positiv var 36,1 på Rotor-Gene Q och 36,8 på Lightcycler. Standardkurvan från spädningsserien på Rotor-Gene Q fick ett R²-värde på 0,998 och en lutning på 3,66 vilket ger en effektivitet av 87,60% (Figur 11). På Lightcycler var standardkurvas lutning 3,33 vilket ger en effektivitet på 99,66% och R²-värdet var 0,996.



Figur 11. Standardkurva för \log_{10} (koncentration) och CT-värden för en spädningsserie på en VZV kontroll som amplifierades på Rotor-Gene Q med en optimerad mastermix

HSV Sensitivitet

För HSV 1 blev spädningar 1:1 till 10^{-4} positiva på båda Rotor-Gene Q och Lightcycler och för HSV 2 blev spädning 1:1 till 10^{-4} positiva på Lightcycler och 1:1 till 10^{-3} positiva på Rotor-Gene Q. R^2 -värden, lutning och PCR-effektivitet räknades ut på standardkurvor från spädningsserierna (Tabell 11).

Tabell 11. R^2 -värden, lutning och effektivitet uträknade från spädningsserier på patientmaterial positivt för HSV 1 och 2 som amplifierades på Rotor-Gene Q och Lightcycler 480 II med protokoll för HSV 1 och 2 och optimerade mastermixar.

	HSV 1 Inhouse	HSV 1 Lightcycler	HSV 2 Inhouse	HSV 2 Lightcycler
R^2-värdet	0,999	0,997	0,996	0,998
Lutning	3,58	3,23	3,64	3,52
Effektivitet (%)	90,25	103,98	88,25	92,35

VZV Specificitet

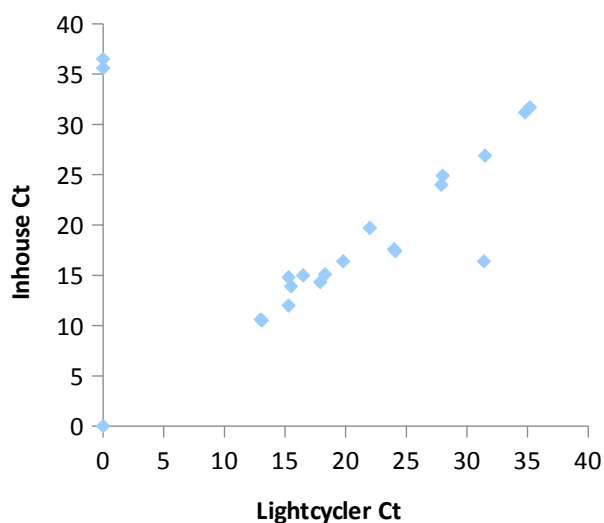
Alla prover och stammar förutom ett patientprov för HSV 1 visade ingen amplifiering med VZV-metoden. HSV 1 provet fick ett C_T -värde av 37,4 cykler och analyserades om på Lightcycler 480 II för VZV. På Lightcycler fick HSV 1-provet ett C_T -värde av 37,5 cykler och en T_M på 85,1 °C vilket visade att det var positivt för VZV.

Resultaten från patientproverna som analyserades på båda in-house metoden och den nuvarande metoden på Lightcycler visas i tabell 12.

Tabell 12. Jämförelse av positiva och negativa resultat för VZV mellan in-house PCR-metoden på Rotor-Gene Q och den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II samt sensitiviteten och specificiteten av in-house metoden jämfört med Lightcycler.

		In-house		Total	Sensitivitet 1,00 t Specificitet 0,91
		VZV-positiv	VZV-negativ		
Lightcycler	VZV-positiv	18	0	18	
	VZV-negativ	2	20	22	
Total		20	20	40	

C_T-värdena var lägre på in-house metoden (p=0,013). De två 2 positiva proverna som påvisades på in-house metoden men inte på Lightcycler fick C_T-värden på 36,5 och 35,6 (Figur 12).



Figur 12. Jämförelse av Ct-värden för positiva och negativa VZV-patientprover (n=40) mellan den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II och den optimerade VZV-in-house metoden på Rotor-Gene Q. Negativa resultat fick värdet 0.

HSV Specificitet

Samtliga VZV-prover och *Staphylococcus* stammar var negativa med HSV in-house metoden. En jämförelse av resultat mellan in-house metoden och den nuvarande metoden på Lightcycler från analysen av patientprover för HSV 1 visas i tabell 13 och för HSV 2 visas i tabell 14.

Tabell 13. Jämförelse av positiva och negativa resultat för HSV 1 mellan in-house PCR-metoden på Rotor-Gene Q och den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II samt sensitiviteten och specificiteten av in-house metoden jämfört med Lightcycler

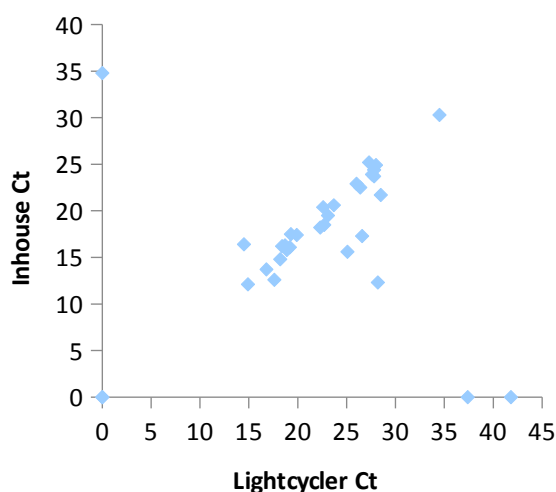
		In-house	Total	Sensitivitet 0,93 t

		HSV 1-positiv	HSV 1-negativ		Specificitet 0,99
Lightcycler	HSV 1-positiv	28	2	30	
	HSV 1-negativ	1	111	112	
Total		29	113	142	

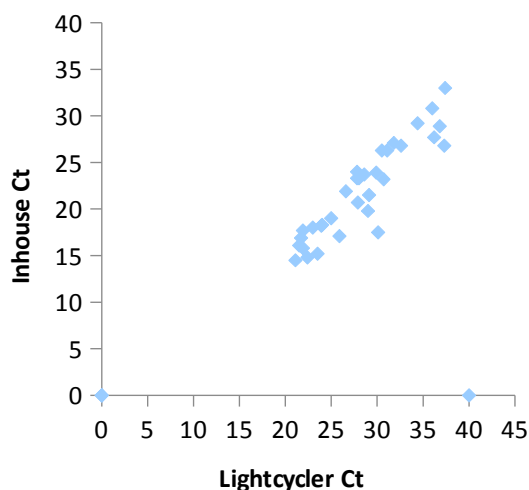
Tabell 14. Jämförelse av positiva och negativa resultat för HSV 2 mellan in-house PCR-metoden på Rotor-Gene Q och den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II samt sensitiviteten och specificiteten av in-house metoden jämfört med Lightcycler

		In-house		Total	Sensitivitet 0,97
		HSV 2-positiv	HSV 2-negativ		t
Lightcycler	HSV 2-positiv	33	1	34	Specificitet 1,00
	HSV 2-negativ	0	108	108	
Total		33	109	142	

C_T-värden var lägre för in-house metoden för både HSV 1 och HSV 2 (p<0,001). Patientprovet som var negativt för HSV 1 på Lightcycler och positivt på Rotor-Gene Q hade ett C_T-värde på 34,8. De två patientproverna som var positiva för HSV 1 på Lightcycler och inte på in-house metoden hade C_T-värden 37,4 och 41,8 (Figur 13). Provet som var positiv för HSV 2 på Lightcycler men inte på in-house metoden fick ett C_T-värde på 40,0 (Figur 14).

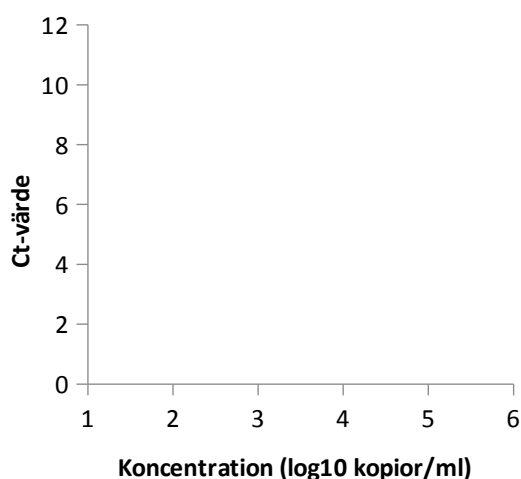


Figur 13. Jämförelse av Ct-värden för positiva och negativa patientprover för HSV 1 (n=142) mellan den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II och den optimerade HSV-in-house metoden på Rotor-Gene Q. Negativa resultat fick värdet 0.

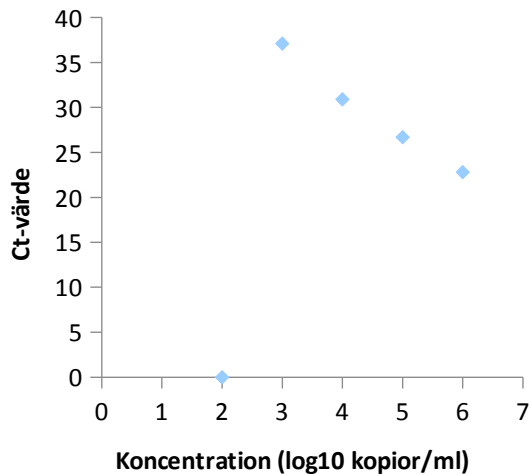


Figur 14. Jämförelse av Ct-värden för positiva och negativa patientprover för HSV 2 (n=142) mellan den nuvarande metoden på Lightcycler 480 II och den optimerade HSV-in-house metoden på Rotor-Gene Q. Negativa resultat fick värdet 0. Analys av QCMD externa paneler

Med pipettering från QIAgility blev de sju positiva kontrollerna för HSV 1 positiva med HSV-in-house metoden och den negativa kontrollen blev negativ (Figur 15). Fyra av de positiva HSV 2 kontrollerna hittades men den positiva kontrollen med koncentration 100 kopior/ml blev negativ med in-house metoden. Den negativa kontrollen för HSV 2 var också negativ (Figur 16). Andra gången HSV-panelerna analyserades på Rotor-Gene Q med handpipettering påvisades inte HSV 1 kontrollen med koncentration 10 kopior/ml och samma fyra HSV 2 kontroller blev positiva som vid första försöket.



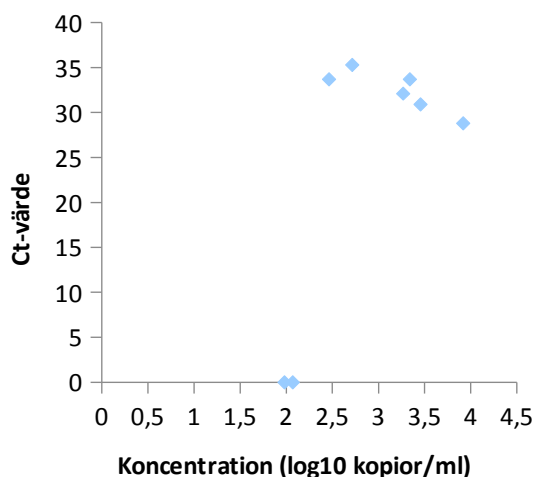
Figur 15. Ct-värden och koncentration (log10 kopior/ml) för positiva QCMD-kontroller för HSV 1 (n=7) som amplifierades med den optimerade in-house metoden på Rotor-Gene Q med pipettering på QIAgility



Figur 16. Ct-värden och koncentration (log10 kopior/ml) för positiva QCMD-kontroller för HSV 2 (n=5) som amplifierades med den optimerade in-house metoden på Rotor-Gene Q med pipettering på QIAgility. Kontroller som inte påvisades fick värdet 0.

De positiva kontrollerna från QCMD panelerna för HSV 1 och 2 som påvisades med in-house metoden påvisades också med Lightcycler.

Tio externa panelkontroller från QCMD analyserades på den optimerade VZV in-house PCR-metoden varav sex blev positiva. Först pipetterades kontrollerna med QIAgility pipetteringsroboten. Av de fyra kontrollerna som blev negativa med in-house metoden var två sant negativa och de andra två hade koncentration 95 kopior/ml och 118 kopior/ml (Figur 17). Med handpipettering blev dessa två kontroller positiva.



Figur 17. Ct-värden och koncentration (log10 kopior/ml) för positiva QCMD-kontroller för VZV (n=8) som amplifierades med den optimerade in-house metoden på Rotor-Gene Q med pipettering på QIAgility. Kontroller som inte påvisades fick värdet 0.

När VZV QCMD-kontrollerna analyserades med den nuvarande metoden på Lightcycler hittades fem positiva och fem blev negativa. Kontrollen med koncentration 292 kopior/ml som blev positiv med den nya metoden hittades inte på Lightcycler.

R²-värdena och PCR-effektivitet för HSV 1, 2 och VZV från QCMD kontrollpanelerna jämfördes mellan de två pipetteringstekniker. Resultatet visas i tabell 15.

Tabell 15. R²-värden, lutning och effektivitet som räknades ut på standardkurvorna från QCMD-externa panelerna för HSV 1,2 och VZV som amplifierades på Rotor-Gene Q med den optimerade in-house metoden med pipettering med båda QIAgility och för hand.

	VZV		HSV 1		HSV 2	
	QIAgility	Hand	QIAgility	Hand	QIAgility	Hand
R²-värde	0,714	0,879	0,917	0,994	0,986	0,960
Lutning	3,746	3,589	3,219	4,165	4,710	6,500
Effektivitet (%)	84,9	90,0	104,5	73,8	63,1	42,5

Diskussion

I det här projektet utvärderades PCR-kit för HSV och VZV från Qiagen och GeneProof som skulle kunna användas som ny PCR-metoder på Rotor-Gene Q. På QCMD-kontrollerna och patientproverna som testades var resultaten mellan de två kiten likvärdiga och kiten påvisade lika många positiva och negativa prover som den nuvarande metoden på Lightcycler. Skillnaden i C_T -värdena mellan Lightcyclers resultat och kitens resultat på Rotor-Gene Q beror på att Lightcyclers mjukvara ställer in tröskelvärdet automatiskt till skillnad från Rotor-Gene Qs, där värdet ställs in manuellt. Detta leder till att tröskelvärdet blir högre på Lightcycler och till följd blir C_T -värden högre.

På det fåtal prover som användes för att testa kiten blev resultaten likvärdiga mellan kiten och in-house metoden. In-house metoder är oftast billigare än kommersiella kit och är därför att föredra finansiellt att använda i klinisk rutin om de fungerar lika bra. För att fullt utvärdera kiten och jämföra dem med in-house metoden skulle flera prover samt spädningsserier behöva analyseras än de som testades i det här projektet.

En intern kontroll ingår i kiten från både Qiagen och GeneProof. Kontrollen på starkt positiva patientprover blev hämmad och i ett fall hamnade kurvan under tröskelvärdet. Eftersom signalen från det provet var så stark var det positiva resultatet sant. HSV- och VZV-kiten från båda företagen är optimerade för cerebral-spinal-vätska och inte blåsmaterial som användes i det här projektet och är därför optimerade för att hitta små mängder virus. Detta kan förklara varför internkontrollerna inhiberades av starka prover. Den interna kontrollen och provet tävlar i reaktionen och det blir konkurrens mellan PCR-produkter. Om provet är mycket starkare än internkontrollen amplifieras det snabbt och internstandarderna har inte lika stor tillgång till reagenserna för amplifiering.

Båda kiten använder en större volym prov än in-house metoderna. En större provvolym ger en högre sensitivitet till metoden eftersom det då finns större chans att hitta DNA:t än i en mindre volym. En större provvolym betyder dock att en större mängd av de andra reagenserna behöver användas per prov. Om en större provvolym användes för in-house metoderna skulle de bli mycket dyrare.

Utöver resultaten jämfördes handhavandet av kiten vilket visade några små skillnader. För det första var mastermixarna från GeneProofs kit färdigblandade, men Qiagens mastermixar krävde att en magnesiumlösning och den interna kontrollen tillsattes på laboratoriet. Detta förfarande gjorde att Qiagens kit var mer tidskrävande att använda. Volymer som skulle blandas till Qiagens mastermixar var också olika för HSV och VZV vilket ökar risken att mastermixarna blandas fel. De fyra standarderna som följer med alla kiten, förutom Artus HSV-kitet, är inte nödvändiga när blåsmaterial analyseras eftersom det väldigt sällan behöver kvantifieras.

Ett syfte med det här projektet var att validera en ny in-house PCR-metod. När en ny PCR-metod ska startas upp måste båda temperaturprotokollet och mastermixen optimeras för att få ett bra resultat. I det här projektet optimerades inte temperaturprotokollet eftersom protokollet från Namvar et al, 2005 (16) användes som redan var optimerad för primers och probe.

Primers testades för specificitet med en SYBR-green smältpunktsanalys. Smältkurvan för VZV och HSV 2 visade distinkta toppar som stämde överens mellan dubbelproverna men smältkurvorna för HSV 1 hade flera låga toppar som inte matchade. Den misstänkta orsaken till HSV 1s atypiska kurvor var primer-dimers. När primer-koncentrationen i mastermixen är hög kan primerna binda till varandra och användas som templat vilket leder till en ospecifik PCR-produkt (30, 31). Multiplex PCR har en ökad risk för bildning av primer-dimers på grund av hög koncentration av olika primers. Ett antal metoder för att minska bildning av primer-dimers har utvecklats, till exempel "hot-start" och "touch-down" PCR (31). Eftersom vattnet som analyserades med HSV 1 kontrollerna fick en smältkurva vid samma T_M som de positiva kontrollerna tyder det på att någon PCR-produkt bildades från primers i mastermixen utan närvaro av templat-DNA.

Ett alignment utfördes på HSV primers och probe vilket visade att proberna var antisense-probe på den andra DNA-strängen än förväntat. På grund av detta beställdes probe för HSV 1 och 2 som var sense-probe för att se om de fungerade bättre. Vid mastermix optimeringen analyserades HSV spädningsserier med två spädningar av originalprobe och de nya proberna och primers. Originalproberna fick bättre R^2 -värden och PCR effektivitet än de nya proberna och hade jämförbar sensitivitet. Därför användes originalproberna under resten av in-house valideringen.

Problemet med HSV 1 kan också ha berott på kontrollen som med ytterligare testning visade sig vara väldigt svag eller inte visade någon produkt allt med det nya PCR-protokollet. Kontrollen verkade inte passa med den nya metoden av okänd anledning, eftersom den fortsatt att fungera med den nuvarande metoden på Lightcycler. Originalproberna testades med starkt positiva patientprover för HSV 1 och 2 och fungerade utan problem förutom att den positiva kontrollen inte fick någon PCR-produkt. Det visades att de tidigare problemen med primer- och probetesterna troligen låg mest med HSV 1-kontrollen.

När mastermixen för VZV optimerades valdes fyra olika koncentrationer av primers och probe och det visade sig att de fungerade bäst med mindre mängd probe i förhållande till primers (1:5). Mix 3 gav den bästa sigmoidkurvan och fluorescens och användes som mastermix för fortsatt validering. Mix 3 gav en PCR-effektivitet runt 87%, vilket skulle kunna förbättras genom ytterligare optimering av primer- och probekoncentrationer i mastermix. Mix 2 för HSV valdes för att få samma volym Express qPCR Supermix Universal som VZV-mastermixen. C_T -värdena var jämförbara mellan Mix 2 och Mix 1 som hade koncentrationer enligt Namvar et al, 2005 (16) men sensitiviteten för HSV 2 verkade något lägre.

Ett krav med de nya in-house metoderna var att den analytiska sensitiviteten ska vara likvärdig med den nuvarande metoden, eller högre. Resultatet från sensitivitetstestet med spädningsserier för VZV visade inte någon skillnad i sensitivitet mellan den nya och nuvarande metoden. Däremot hittades två svagt positivt patientprover med den nya metoden som var negativa på Lightcycler, vilket tyder på att sensitiviteten med den nya metoden kan vara något högre. Den nya metoden för VZV hittade också en QCMD kontroll med låg spädning som inte blev positiv på Lightcycler, vilket vidare bekräftar att den analytiska sensitiviteten på den nya metoden är kan vara något högre. Specificiteten av in-house metoden blev 0,91 jämfört med Lightcycler efter analys av patientprover för VZV. I detta fall visar värdet inte att in-house metoden har lägre specificitet utan att sensitiviten av metoden är högre än den nuvarande metoden.

Den optimerade in-house metoden för HSV fick likvärdiga resultat på sensitivitetstestet som på Lightcycler för HSV 1, men den svagaste spädningen av HSV 2 som gav en PCR-produkt på Lightcycler påvisades inte med den nya metoden. Under specificitetstestet med patientprover visade den nya metoden inte heller någon produkt på ett patientprov som var svagt positivt för HSV 2 på Lightcycler. Två patientprover som var svagt positiva för HSV 1

på Lightcycler hittades inte med den nya metoden men ett prov som blev svagt positivt på Rotor-Gene Q var negativt på Lightcycler.

Skillnaderna i den analytiska sensitiviteten för båda VZV och HSV-metoderna visades bara från prover med höga C_T -värden, dvs. med låg koncentration av templat. Dessa skillnader kan ha berott på mätosäkerhet och möjligen blir resultatet annorlunda med omanalys av samma provermaterial. I det här projektet utfördes spädningsserierna på kontroller och patientprover som inte hade känd virus-koncentration vilket betyder att resultatet bara kan användas för att jämföra sensitiviteten mellan metoderna och inte för att bestämma detektionsgränserna. En spädningsserie på en kontroll med känd virus-koncentration skulle visa det lägsta antalet viruskopior som metoderna kan detektera.

Det negativa kontrollmaterialet som analyserades med de nya in-house metoderna gav ingen PCR-produkt, förutom ett HSV 1-positivt patientprov som analyserades med VZV-protokollet. Eftersom provet inte hade analyserats för VZV på Lightcycler analyserades den om igen med den nuvarande metoden vilket visade att det var positivt för VZV. Då var patientprovet dubbel-positivt för HSV 1 och VZV vilket betyder att det inte var någon ospecifik produkt som hade bildats på Rotor-Gene Q.

På QCMD-panelerna hittades alla positiva kontroller för HSV 1, men den svagaste positiva kontrollen för HSV 1 och de två svagaste positiva VZV-kontrollerna påvisades inte efter pipettering med QIAgility. För VZV och HSV 1 fick starkare kontroller ett högre C_T -värde än andra svagare kontroller vilket gav en ojämn standardkurva. En orsak till de ojämna C_T -värdena kan bero på pipetteringsroboten, och därför analyserades kontrollerna om efter pipettering för hand. När QCMD-panelerna analyserades om med hand-pipettering blev samtliga positiva kontroller för VZV positiva med in-house metoden vilket tyder på en högre sensitivitet än med pipetteringsroboten. Effektiviteten och R^2 -värden förbättrades för VZV med handpipettering men var fortfarande låga. En positiv kontroll för HSV 1 som hade påvisats i det första försöket med pipetteringsroboten påvisades inte med försöket med handpipettering och båda effektiviteten och R^2 -värdena för HSV 1 och 2 blev sämre på handpipetteringsförsöket. Lutningen på HSV 2s kurva från båda försöken var väldigt hög eftersom det fanns mindre HSV 2 positiva kontroller att räkna på och ekvationen påverkades mer av extrema värden än kurvorna för de andra två virusen. Eftersom R^2 -värden och effektiviteten för samtliga virus hade blivit bättre under tidigare analyser med in-house

metoderna tyder det på att problemet låg i extraktionen och inte i pipetteringen och kan ha berott på att kontrollerna inte var ordentligt blandade innan extraktionsvolymen togs.

Slutsatser

De kommersiella kiten fick likvärdiga resultat som den nuvarande metoden och den nya in-house metoden. Fler prover skulle behöva testas för att kunna dra några slutsatser om kitens sensitivitet och specificitet.

Den nya in-house metoden med TaqMan-prober för VZV fungerade minst lika bra på Rotor-Gene Q än den nuvarande metoden på Lightcycler och resultaten tyder på en något ökad analytisk sensitivitet med den nya metoden. Specificiteten av den nya in-house metoden är likvärdig med den nuvarande metoden på Lightcycler.

Ingen korsreaktivitet påvisades mellan HSV 1 och 2 i den nya HSV-metoden och därför fungerar den bra som en duplexanalys för klinisk rutin. Sensitiviteten av den nya metoden för HSV 1 var likvärdiga med den nuvarande metoden på Lightcycler, men den nya metoden visade en något lägre sensitivitet för HSV 2. Specificiteten av den nya HSV-metoden är likvärdig till metoden på Lightcycler.

Omnämmanden

Ett stort tack till personalen på Molekylärbiologen i Skövde för all hjälp under den praktiska delen av arbetet.

Referenser

1. Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Failure To Genotype Herpes Simplex Virus by Real-Time PCR Assay and Melting Curve Analysis Due to Sequence Variation within Probe Binding Sites. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):2135-2137. doi:10.1128/JCM.41.5.2135-2137.2003.
2. Uyangaa E, Patil AM, Eo SK. Prophylactic and Therapeutic Modulation of Innate and Adaptive Immunity Against Mucosal Infection of Herpes Simplex Virus. *Immune Netw.* 2014;14(4):187-200. doi:10.4110/in.2014.14.4.187.
3. Chentoufi AA, BenMohamed L. Mucosal Herpes Immunity and Immunopathology to Ocular and Genital Herpes Simplex Virus Infections. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:149135. doi:10.1155/2012/149135.
4. LeGoff J, Péré H, Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virol J.* 2014;11:83. doi:10.1186/1743-422X-11-83
5. Farmakoterapi vid herpes simplex-, varicella- och herpes zosterinfektioner- *Behandlingsrekommendation.* Stockholm: Läkemiddelsverket; 2005 [läst 2015-05-15]. Tillgänglig: <https://lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrekommendationer/herpes1.pdf>
6. Lisegang T. Biology and molecular aspects of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *Ophthalmology.* 1992;99(5):781-799.
7. Arvin AM. Varicella-zoster virus: molecular virology and virus-host interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4(4):442-449. doi:10.1016/S1369-5274(00)00233-2
8. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology.* 7:e upplag. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. 469-470.

9. Espy MJ, Teo R, Ross TK, et al. Diagnosis of Varicella-Zoster Virus Infections in the Clinical Laboratory by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3187-3189.
10. Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT. Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus Infections by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1565-1568. doi:10.1128/JCM.41.4.1565-1568.2003.
11. Weinke T, Glogger A, Bertrand I, Lukas K. The Societal Impact of Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia on Patients, Life Partners, and Children of Patients in Germany. *Scientific World J.* 2014;2014:749698. doi:10.1155/2014/749698.
12. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 7:e upplag. New York: W. H. Freeman and Company; 2012. 151-152,167-168.
13. Realtids-PCR. Stockholm: Föreningen för Medicinsk Mikrobiologi vid Svenska Läkaresällskapet, Folkhälsomyndigheten; 2015 [läst 2015-05-17]. Tillgänglig: <http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Realtids-PCR>
14. Varshney U, Hutcheon T, van de Sande JH. Sequence Analysis, Expression, and Conservation of *Escherichia coli* Uracil DNA Glycosylase and Its Gene (ung). *J Biol Chem.* 1988;283:7776-7784
15. Liu X-P, Liu J-H. Characterization of Family IV UDG from *Aeropyrum pernix* and Its Application in Hot-Start PCR by Family B DNA Polymerase. Xu S, ed. *PLoS One.* 2011;6(11):e27248. doi:10.1371/journal.pone.0027248.
16. Namvar L, Olofsson S, Bergström T, Lindh M. Detection and Typing of Herpes Simplex Virus (HSV) in Mucocutaneous Samples by TaqMan PCR Targeting a gB Segment Homologous for HSV Types 1 and 2. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2058-2064. doi:10.1128/JCM.43.5.2058-2064.2005.
17. Real-time PCR handbook. 2012. New York: Life Technologies Corporation; 2012 [läst 2015-05-20]. Tillgänglig: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>

- 18.** Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res.* 2014;3:85. doi:10.4103/2277-9175.127998.
- 19.** Enroth, H. Nord S, Thilesen, C. HSV VZV Realtids-PCR metod beskrivning. Skövde: Unilabs; 2014. NM06968-8.
- 20.** Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.* 1995;4(6):357-362. Tillgänglig: <http://genome.cshlp.org/content/4/6/357.full.pdf+html>
- 21.** TaqMan Chemistry vs. SYBR Chemistry for Real-Time PCR. Kalifornien: Life Technonologies; 2015 [läst 2015-04-05]. Tillgänglig: <http://www.lifetechnologies.com/se/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>
- 22.** Burrows J, Nitsche A, Bayly B, Walker E, Higgins G, Tuckweng K. Detection and subtyping of Herpes simplex virus in clinical samples by LightCycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. *BMC Microbiol.* 2002;2:12-7
- 23.** Agostino M. *Practical Bioinformatics. 1:a upplag.* New York: Garland Science; 2012. 47-71.
- 24.** Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E, redaktörer. *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin. 9:e upplag.* Lund: Studentlitteratur; 2012. 44-45.
- 25.** Druce J, Catton M, Chibo D, et al. Utility of a Multiplex PCR Assay for Detecting Herpesvirus DNA in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1728-1732. doi:10.1128/JCM.40.5.1728-1732.2002.
- 26.** Eljertsson G. *Statistik för hälsovetenskaparna. 2:a upplag.* Lund: Studentlitteratur; 2012. 227-231.

27. The LightCycler 480 System: Unleash the Potential of Real-Time PCR. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH; 2012 [läst 2015-05-02]. Tillgänglig:

http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05237645001_10.12.pdf

28. Rotor-Gene Q. Dusseldorf: Qiagen; 2013-15 [läst 2015-05-20]. Tillgänglig:

<https://www.qiagen.com/se/products/catalog/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-q/#productdetails>

29. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2009 [läst 2015-04-05]. Tillgänglig: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

30. Poritz M, Ririe K. Getting Things Backwards to Prevent Primer Dimers. *J Mol Diagn.* 2014;16(2):159-162.

31. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(16):3235-3241.

Bilagor

1. Tabell över C_T -värden för positiva VZV-patientprover som amplifierades på Rotor-Gene Q med den optimerade VZV-in-house PCR metoden och på Lightcycler 480 II med den nuvarande PCR-metoden.

Prov ID	Rotor-Gene Q Ct-värde	Lightcycler Ct-värde
VZVPAT0		
1	10,5	13,1
VZVPAT0		
2	10,6	13
VZVPAT0		
3	12	15,3
VZVPAT0		
4	13,9	15,5
VZVPAT0		
5	14,33	17,9
VZVPAT0		
6	14,8	15,3
VZVPAT0		
7	15	16,5
VZVPAT0		
8	15,1	18,3
VZVPAT0		
9	16,4	31,4
VZVPAT1		
0	16,4	19,8
VZVPAT1		
1	17,4	24,1
VZVPAT1		
2	17,6	24
VZVPAT1		
3	19,7	22
VZVPAT1		
4	24	27,9
VZVPAT1		
5	24,9	28
VZVPAT1		
6	26,9	31,5
VZVPAT1		
7	31,2	34,8
VZVPAT1		
8	31,7	35,2
VZVPAT1		
9	35,6	neg
VZVPAT2		
0	36,5	neg

2. Tabell över C_T -värden för positiva HSV-patientprover som amplifierades på Rotor-Gene Q med den optimerade HSV-in-house PCR-metoden och på Lightcycler 480 II med den nuvarande PCR-metoden.

Prov ID	HSV 1 Rotor-Gene Q Ct-värde	HSV 2 Rotor-Gene Q Ct-värde	Rotor-Gene Q Resultat	HSV 1 Lightcycler Ct	HSV 2 Lightcycler Ct	Lightcycler resultat
HSVPAT01	16,3	neg	HSV1	18,7	neg	HSV 1
HSVPAT02	neg	neg	neg	37,4	neg	HSV 1
HSVPAT03	30,3	neg	HSV 1	34,5	neg	HSV 1
HSVPAT04	20,4	neg	HSV 1	22,6	neg	HSV 1
HSVPAT05	23,9	neg	HSV 1	27,6	neg	HSV 1
HSVPAT06	neg	neg	neg	41,8	neg	HSV 1
HSVPAT07	15,8	neg	HSV 1	18,9	neg	HSV 1
HSVPAT08	13,7	neg	HSV 1	16,8	neg	HSV 1
HSVPAT09	23,7	neg	HSV 1	27,8	neg	HSV 1
HSVPAT10	18,5	neg	HSV 1	22,7	neg	HSV 1
HSVPAT11	16,1	neg	HSV 1	19,2	neg	HSV 1
HSVPAT12	16,2	neg	HSV 1	18,4	neg	HSV 1
HSVPAT13	24,9	neg	HSV 1	28	neg	HSV 1
HSVPAT14	18,2	neg	HSV 1	22,3	neg	HSV 1
HSVPAT15	21,7	neg	HSV 1	28,5	neg	HSV 1
HSVPAT16	25,2	neg	HSV 1	27,3	neg	HSV 1
HSVPAT17	22,5	neg	HSV 1	26,4	neg	HSV 1
HSVPAT18	24,4	neg	HSV 1	27,8	neg	HSV 1
HSVPAT19	12,6	neg	HSV 1	17,6	neg	HSV 1
HSVPAT20	20,6	neg	HSV 1	23,7	neg	HSV 1
HSVPAT21	17,3	neg	HSV 1	26,6	neg	HSV 1
HSVPAT22	17,4	neg	HSV 1	19,9	neg	HSV 1
HSVPAT23	15,6	neg	HSV 1	25,1	neg	HSV 1
HSVPAT24	12,3	neg	HSV 1	28,2	neg	HSV 1
HSVPAT25	22,9	neg	HSV 1	26	neg	HSV 1
HSVPAT26	14,8	neg	HSV 1	18,2	neg	HSV 1
HSVPAT27	12,1	neg	HSV 1	14,9	neg	HSV 1
HSVPAT28	16,4	neg	HSV 1	14,5	neg	HSV 1
HSVPAT29	17,5	neg	HSV 1	19,3	neg	HSV1
HSVPAT30	19,5	neg	HSV 1	23,1	neg	HSV1
HSVPAT31	34,8	neg	HSV 1	neg	neg	neg
HSVPAT32	neg	23,3	HSV 2	neg	28	HSV 2
HSVPAT33	neg	24	HSV 2	neg	27,8	HSV 2
HSVPAT34	neg	14,5	HSV 2	neg	21,1	HSV 2
HSVPAT35	neg	23,9	HSV 2	neg	29,9	HSV 2
HSVPAT36	neg	neg	neg	neg	40	HSV 2
HSVPAT37	neg	23,7	HSV 2	neg	28,6	HSV 2
HSVPAT38	neg	28,9	HSV 2	neg	36,8	HSV 2
HSVPAT39	neg	18,2	HSV 2	neg	23,9	HSV 2
HSVPAT40	neg	16,9	HSV 2	neg	21,7	HSV 2
HSVPAT41	neg	26,3	HSV 2	neg	31,1	HSV 2
HSVPAT42	neg	30,8	HSV 2	neg	36	HSV 2
HSVPAT43	neg	21,9	HSV 2	neg	26,6	HSV 2
HSVPAT44	neg	18,3	HSV 2	neg	24	HSV 2

HSVPAT45	neg	19	HSV 2	neg	25	HSV 2
HSVPAT46	neg	29,2	HSV 2	neg	34,4	HSV 2
HSVPAT47	neg	23,2	HSV 2	neg	30,7	HSV 2
HSVPAT48	neg	17,7	HSV 2	neg	21,9	HSV 2
HSVPAT49	neg	19,8	HSV 2	neg	29	HSV 2
HSVPAT50	neg	27,1	HSV 2	neg	31,8	HSV 2
HSVPAT51	neg	26,3	HSV 2	neg	30,5	HSV 2
HSVPAT52	neg	23,3	HSV 2	neg	27,8	HSV 2
HSVPAT53	neg	33	HSV 2	neg	37,4	HSV 2
HSVPAT54	neg	18	HSV 2	neg	23	HSV 2
HSVPAT55	neg	15,2	HSV 2	neg	23,5	HSV 2
HSVPAT56	neg	26,8	HSV 2	neg	37,3	HSV 2
HSVPAT57	neg	17,5	HSV 2	neg	30,1	HSV 2
HSVPAT58	neg	16,1	HSV 2	neg	21,5	HSV 2
HSVPAT59	neg	14,8	HSV 2	neg	22,4	HSV 2
HSVPAT60	neg	27,7	HSV 2	neg	36,2	HSV 2
HSVPAT61	neg	17,1	HSV 2	neg	25,9	HSV 2
HSVPAT62	neg	21,5	HSV 2	neg	29,1	HSV 2
HSVPAT63	neg	20,7	HSV 2	neg	27,9	HSV 2
HSVPAT64	neg	26,8	HSV 2	neg	32,6	HSV 2
HSVPAT65	neg	15,8	HSV 2	neg	21,9	HSV 2