Thesis Title Major Causes and Development of Suitable Laboratory Diagnostic Panel for Infectious Uveitis in Northern-Thai Population

Author Miss. Natedao Kongyai

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Asst.Prof.Dr. Wasna	Sirirungsi	Advisor
Assoc.Prof.Dr. Kessara	Pathanapitoon, M.D.	Co-advisor
Asst.Prof.Dr. Pranee	Leechanachai	Co-advisor
Prof.Dr. Aniki	Rothova, M.D.	Co-advisor

ABSTRACT

Uveitis is the major cause of severe visual impairment leading to blindness. Patients in all age groups are affected, which makes uveitis an important public health problem worldwide. While infectious uveitis is usually treated with antibiotics, uveitis arising from unknown causes is conventionally treated with steroids or other immunosuppressive agents. With long term steroid treatment, patients may potentially experience serious adverse side effects. Thus, an accurate etiological diagnosis is important for an effective treatment.

Systematic study of infectious uveitis in Thailand is currently lacking. This study aims to investigate the major causes of uveitis in the Northern Thai population and to establish a suitable panel of laboratory diagnosis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Two hundred and fourty Northen-Thai uveitis patients attending the Ophthalmology Clinic, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, were enrolled in this study. Singleplex real-time polymerase chain reaction (PCR) and Goldman-Withmer Coefficient Analysis (GWC) were used to identify the incidence of cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV-1, HSV-2), varicella zoster virus (VZV) and *Toxoplasma gondii (T.gondii*) in uveitis patients.

Results reveal that singleplex real-time PCR for CMV, HSV-1 and VZV detection had comparable sensitivity at 30 copies. The lowest concentrations of HSV-2 and *T.gondii* for singleplex real-time PCR detection were 300 copies and 3 copies, respectively. Using singleplex real-time PCR, 96 of all 240 (40.0%) patients with infection were diagnosed. CMV was the most common cause (67/240, 27.9%) in all anatomical types of uveitis. Other pathogens detected, in descending order, were *T.gondii* (4.2%), VZV (3.3%), HSV-2 (2.5%) and HSV-1 (2.1%). The rate of CMV infection in anterior uveitis (AU), intermediate uveitis (IU), posterior uveitis (PU) and panuveitis (PanU) were 13/69 (18.8%), 3/21 (14.3%), 25/70 (35.7%) and 26/80 (32.5%), respectively.

The information obtained from this study motivated us to establish duplex real-time PCR for CMV diagnosis, and additionally for HSV-1, HSV-2, VZV and *T.gondii*. The resulting technique had comparable sensitivity comparing CMV/HSV-1 and CMV/VZV duplex real-time PCR to singleplex real-time PCR for each pathogen. In contrast, CMV/HSV-2 and CMV/*T.gondii* duplex real-time PCR had the lower efficacy. We further attempted to optimize the multiplex real-time PCR for simultaneous detection of CMV, HSV and VZV. Under optimal conditions, the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

diagnostic efficiency of multiplex real-time PCR was investigated in known positive samples for CMV, HSV and VZV. The efficiency of CMV and VZV diagnosis was comparable to singleplex real-time PCR, with 100% true positive cases. However, in HSV detection, only 4 of 11 cases (36%) were diagnosed by multiplex real-time PCR. Thus, it appears that multiplex real-time PCR could be used for CMV and VZV diagnosis, but multiplex real-time PCR conditions should be further developed for HSV detection.

Using GWC, 5/66 (8%) of all samples examined by both methods had positive results. Five of 23 (22%) patients with infectious anterior uveitis were determined by GWC solely, in contrast to 13/23 (57%) who were positive solely by real-time PCR. Combination of PCR and GWC analysis provided better diagnostic efficiency. The developed duplex real-time PCR had however lower cost and work-load. Based on the cost of GWC analysis and above mentioned results, GWC may not suitable as a routine diagnostic method in the resource-limited country.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	สาเหตุสำคัญและการพัฒนาแผนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมสำหรับภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบจากการติดเชื้อในประชากรไทยภาคเหนือ		
ผู้เขียน	นางสาว เนตรดาว คงใหญ่		
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)		
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. วาสนา	ศิริรังษี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.พญ.ดร. เกษรา	พัฒนพิฑูรย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร. ปราณี	ลิ้ชนะชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Prof. Dr. Aniki	Rothova	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบ (uveitis) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสายตาที่รุนแรงซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็นอย่างถาวร ภาวะดังกล่าวเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขที่สามารถพบได้ในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุทั่วโลก โดยหากสาเหตุของการอักเสบนี้เกิดจากการติดเชื้อ ผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวจะได้รับการรักษาด้วยสารต้านจุลชีพ ในขณะที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ไม่สามารถวินิจฉัยสาเหตุของภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบได้ชัดเจนจะได้รับการรักษาด้วยสารกลุ่มสเตียร์รอยด์ หรือสารกดภูมิคุ้มกันอื่น แต่การรักษาด้วยสารกลุ่มดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้ ดังนั้นหากสามารถวินิจฉัยสาเหตุของภาวะดังกล่าวได้อย่างถูกต้องจะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

ในประเทศไทยยังขาดการศึกษาถึงภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบอย่างเป็นระบบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศ และนำไปพัฒนาแผนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมต่อไป

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบที่เข้ารับการรักษาที่คลินิกจักษุวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 240 ราย โดยใช้เทคนิค singleplex real-time PCR และ Goldman-Witmer Coefficient (GWC) analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญ ได้แก่ เชื้อ cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus type 1 และ type 2 (HSV-1, HSV-2) , varicella zoster (VZV) และ *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*)

ในการศึกษาความไวของเทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุเดี่ยว (singleplex real-time PCR) พบว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อ CMV, HSV-1 และ VZV เท่ากัน คือ 30 copies ส่วนเชื้อ HSV-2 และ *T.gondii* คือ 300 copies และ 3 copies ตามลำดับ เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวไปตรวจวินิจฉัยในผู้ป่วย พบภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ 96 ราย คิดเป็น 40.0% และพบว่าเชื้อ CMV คือสาเหตุหลักของการอักเสบในทุกส่วนของโครงสร้างผนังตาชั้นกลาง (67 ใน 240 ราย, 27.9%) รองลงมาคือ *T.gondii* (10 ใน 240 ราย, 4.2%), VZV (8 ใน 240 ราย, 3.3%), HSV-2 (6 ใน 240 ราย, 2.5%) และ HSV-1 (5 ใน 240 ราย, 2.1%) ตามลำดับ สำหรับความชุกการติดเชื้อ CMV ในผู้ป่วย anterior uveitis (AU), intermediate uveitis (IU), posterior uveitis (PU) และ panuveitis (PanU) คือ 13/69 (18.8%), 3/21 (14.3%), 25/70 (35.7%) และ 26/80 (32.5%) ตามลำดับ

ผลการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุในกลุ่มประชากรข้างต้นได้ถูกนำมากำหนดแนวทางการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ที่สามารถตรวจหาเชื้อได้พร้อมกัน 2 เชื้อในหลอดทดสอบเดียวกัน (duplex real-time PCR) โดยใช้การตรวจหาเชื้อ CMV เป็นหลักคู่กับเชื้ออื่นทีละคู่ พบว่า duplex real-time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ CMV/HSV-1 และ CMV/VZV มีความไวในการตรวจหาเชื้อเทียบเท่ากับ singleplex real-time PCR ในขณะที่การตรวจหาเชื้อ CMV/HSV-2 และ CMV/*T.gondii* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า ดังนั้นจึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจเพิ่มเติมโดยให้สามารถตรวจหาเชื้อ CMV, HSV และ VZV ได้ในหลอดทดสอบเดียวกัน (multiplex real-time PCR) เมื่อนำชุดตรวจดังกล่าวนี้ไปทดสอบกับตัวอย่างที่ทราบผลบวกต่อเชื้อทั้งสามก่อนแล้ว พบว่ามีความถูกต้องในการตรวจหาเชื้อ CMV และVZV คิดเป็น 100% แต่สำหรับการตรวจหาเชื้อ HSV พบว่ามีความถูกต้องในการตรวจเพียง 36% ดังนั้นชุดตรวจหาเชื้อ CMV, HSV และ VZV ได้ในหลอดทดสอบเดียวกันนี้มีประสิทธิภาพดีในการตรวจหาการติดเชื้อ CMV และ VZV แต่ยังคงต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติมหากต้องการใช้ในการตรวจหาเชื้อ HSV ร่วมด้วย

เมื่อนำ Goldmann-Witmer coefficient (GWC) มาตรวจวินิจฉัยร่วมด้วย พบผลบวก 5 ใน 66 ราย (8%) หากตรวจด้วย GWC เพียงวิธีเดียวจะสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อได้ 5 ใน 23 ราย (22%) ของผู้ป่วยภาวะ anterior uveitis ในขณะที่หากใช้ real-time PCR เพียงวิธีเดียว จะสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อได้ 13 ใน 23 ราย (57%) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค real-time PCR ร่วมกับ GWC สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยได้ สำหรับ duplex real-time PCR ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุได้พร้อมกัน 2 เชื้อในหลอดทดสอบเดียวกันที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนี้ สามารถลดค่าใช้จ่ายและขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้ดี อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายและผลการตรวจวินิจฉัยข้างต้นพบว่าวิธี GWC ยังมีค่าใช้จ่ายสูงทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ประจำวันโดยเฉพาะในประเทศที่มีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved