

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46226

MAJOR CAUSES AND DEVELOPMENT OF SUITABLE LABORATORY  
DIAGNOSTIC PANEL FOR INFECTIOUS UVEITIS  
IN NORTHERN-THAI POPULATION

NATEDAS KONGTAL

DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOMEDICAL SCIENCE

THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
AUGUST 2011

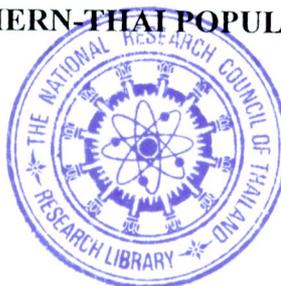
600256341

ห้องสมุดกลางวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46226

**MAJOR CAUSES AND DEVELOPMENT OF SUITABLE LABORATORY  
DIAGNOSTIC PANEL FOR INFECTIOUS UVEITIS  
IN NORTHERN-THAI POPULATION**



**NATEDAO KONGYAI**

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN  
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOMEDICAL SCIENCE**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY**

**AUGUST 2011**

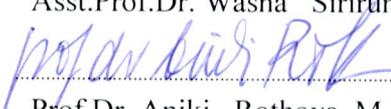
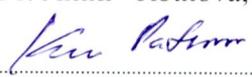
MAJOR CAUSES AND DEVELOPMENT OF SUITABLE LABORATORY  
DIAGNOSTIC PANEL FOR INFECTIOUS UVEITIS  
IN NORTHERN-THAI POPULATION

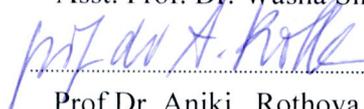
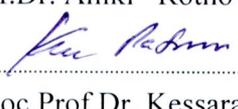
NATEDAO KONGYAI

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED  
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOMEDICAL SCIENCE

EXAMINING COMMITTEE

THESIS ADVISORY COMMITTEE

 .....CHAIRPERSON  
Asst.Prof.Dr. Nattaporn Tesavibul, M.D.  
 .....MEMBER  
Asst.Prof.Dr. Wasna Sirirungsi  
 .....MEMBER  
Prof.Dr. Aniki Rothova, M.D.  
 .....MEMBER  
Assoc.Prof.Dr. Kessara Pathanapitooon, M.D.  
 .....MEMBER  
Asst.Prof.Dr. Pranee Leechanachai

 .....ADVISOR  
Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi  
 .....CO-ADVISOR  
Prof.Dr. Aniki Rothova, M.D.  
 .....CO-ADVISOR  
Assoc.Prof.Dr. Kessara Pathanapitooon, M.D.  
 .....CO-ADVISOR  
Asst.Prof.Dr. Pranee Leechanachai

11 August 2011

© Copyright by Chiang Mai University

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and deepest appreciation to Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi, my thesis advisor; Prof. Dr. Aniki Rothova, M.D., Assoc. Prof. Dr. Kessara Pathanapitoon, M.D. and Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai, my co-advisor and Dr. Jolanda D.F. de Groot-Mijnes for their guidance, patience, continuous discussion and encouragement throughout this study and for the revision of this thesis and manuscripts. This thesis would not have been accomplished without their kindly help.

I extend my gratitude to Asst. Prof. Dr. Nattaporn Tesavibul, M.D. and all examining committee, for their valuable suggestions and advice.

I would like to thank the Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences for the support in providing instruments, reagents and a place to study and the Faculty of Graduate Studies for allowing me to do this project. I am grateful to all personnel and faculty members for their assistance in using instruments at the Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

This work was granted in part by the Office of Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand and the combined grants from Dr. P. Binkorst foundation for ophthalmologic research, Nijmegen; Landelijke stichting voor Blinden en Slechtienden, Utrecht; Stichting Oog, 's Gravenzande, Dr. F.P. Fischer Foundation, Utrecht, the Netherlands. Miss Natedao Kongyai, CHE510588 was supported by CHEPhD Scholarship.

Finally, I would like to express special gratitude to my family and my friends for their love, understanding, encouragement, support, assistance and warm friendship which will never be forgotten.

Natedao Kongyai

**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**

**E46226**

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.

Two hundred and forty Northern-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

**E46226**

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.

## ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

สาเหตุสำคัญและการพัฒนาแผนการตรวจวินิจฉัยทาง  
ห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมสำหรับภาวะผนังตาชั้นกลาง  
อักเสบจากการติดเชื้อในประชากรไทยภาคเหนือ

## ผู้เขียน

นางสาว เนตรดาว คงใหญ่

## ปริญญา

วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

## คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. วาสนา ศิริรังษี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.พญ.ดร. เกษรา พัฒนพิฑูรย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. ปราณี ลีชนะชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Dr. Aniki Rothova	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## บทคัดย่อ

E46226

ภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบ (uveitis) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสายตารุนแรงซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็นอย่างถาวร ภาวะดังกล่าวเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขที่สามารถพบได้ในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุทั่วโลก โดยหากสาเหตุของการอักเสบนี้เกิดจากการติดเชื้อ ผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวจะได้รับการรักษาด้วยสารต้านจุลชีพ ในขณะที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ไม่สามารถวินิจฉัยสาเหตุของภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบได้ชัดเจนจะได้รับการรักษาด้วยสารกลุ่มสเตียรอยด์ หรือสารกดภูมิคุ้มกันอื่น แต่การรักษาด้วยสารกลุ่มดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้ ดังนั้นหากสามารถวินิจฉัยสาเหตุของภาวะดังกล่าวได้อย่างถูกต้องจะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

ในประเทศไทยยังขาดการศึกษาถึงภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบอย่างเป็นระบบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของภาวะผนังตาชั้นกลางอักเสบในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศ และนำไปพัฒนาแผนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมต่อไป

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

E46226

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 เป็นหลักคู่กับเชื้ออื่นที่ละคู่ 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 และ VZV 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

**E46226**

สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุได้พร้อมกัน 2 เชื้อในหลอดทดสอบเดียวกันที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนี้ สามารถลดค่าใช้จ่ายและขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้ดี อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายและผลการตรวจวินิจฉัยข้างต้นพบว่าวิธี GWC ยังมีค่าใช้จ่ายสูงทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ประจำวัน โดยเฉพาะในประเทศที่มีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากร

## TABLE OF CONTENTS

	<b>Page</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENT</b>	iii
<b>ENGLISH ABSTRACT</b>	v
<b>THAI ABSTRACT</b>	viii
<b>LIST OF TABLES</b>	xvi
<b>LIST OF FIGURES</b>	xix
<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	xxi
<b>CHAPTER I INTRODUCTION</b>	
1. Objectives of the study	4
2. Education and application advantages	4
<b>CHAPTER II LITERATURE REVIEW</b>	
1. Anatomy of the Eye	6
2. Uveitis	15
2.1 Uveitis Classification	15
2.2 Clinical features	18
2.3 Causes of uveitis	21
2.3.1 Non-infectious uveitis	25
2.3.2 Infectious uveitis	27

3. Ocular infection and infectious uveitis in Thailand and Southeast Asia	32
4. Laboratory investigation: Diagnosis of ocular infection	35
4.1 Serological Method	35
4.2 Molecular Methods	36
4.2.1 Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR)	36
4.2.2 Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique	37
5. Treatment	40

### **CHAPTER III MATERIALS AND METHODS**

1. Study population	42
2. Specimen collection and preparation	43
2.1 Intraocular fluid sample	43
2.2 EDTA-anticoagulated blood sample	43
3. Methods	44
3.1 Investigation of the major causes of infectious uveitis in Northern-Thai population	44
3.1.1 Detection of causative agents using reference method : Singleplex real-time PCR	44
3.1.1.1 DNA extraction from the intraocular fluid	44
3.1.1.2 Preparation of the DNA controls (Plasmid DNA controls)	45
3.1.1.3 Detection of interested DNA by reference singleplex real-time PCR	52

3.1.2 Determination of specificity of reference singleplex real-time PCR	55
3.1.3 Determination of sensitivity of reference singleplex real-time PCR	56
3.1.4 Incidence of the interested infectious agents determination in intraocular fluid samples	56
3.2 Development of multiplex real-time PCR technique to identify organisms involved in uveitis	57
3.2.1 Setting up the Multiplex real-time PCR reaction panel.	57
3.2.2 Determination of sensitivity and specificity of Multiplex real-time PCR	59
3.2.3 Diagnostic efficiency determination of Multiplex real-time PCR	59
3.3 Evaluation of the diagnostic efficiency of Goldmann-Witmer coefficient analysis and Real-time PCR technique in identifying the causes of uveitis	60
3.3.1 Analysis of infectious uveitis by Goldmann-Witmer coefficient (GWC): Determination of plasma and intraocular antibody production	60
3.3.2 Determination of diagnostic value of GWC analysis and real-time PCR analysis	62

## CHAPTER IV RESULTS

1. Preparation of pathogen DNA controls using PCR cloning	63
---	----

2. Reference singleplex real-time PCR	75
2.1 Determination of specificity of reference singleplex real-time PCR	75
2.2 Determination of sensitivity of reference singleplex real-time PCR	76
2.3 Incidence of the infectious agents in intraocular fluid samples	81
3. Development of multiplex real-time PCR technique to identify organisms involved in uveitis	85
3.1 Duplex real-time PCR development	85
3.1.1 Optimization of duplex real-time PCR and determination of sensitivity and specificity of duplex real-time PCR	85
3.1.2 Diagnostic efficiency determination of duplex real-time PCR	93
3.2 Multiplex real-time PCR development	95
3.2.1 Optimization of multiplex real-time PCR	95
3.2.2 Determination of sensitivity and specificity of multiplex real-time PCR	97
3.2.3 Diagnostic efficiency determination of multiplex real-time PCR	100
4. Evaluation of the diagnostic efficiency of Goldmann-Witmer coefficient analysis and Real-time PCR technique in identifying the causes of uveitis	102
<b>CHAPTER V DISCUSSION</b>	103
<b>CHAPTER VI CONCLUSION</b>	112
<b>REFERENCES</b>	114

**APPENDICES**

- **APPENDIX A** List of the chemicals and instruments 127
- **APPENDIX B** List of microorganisms and DNA 131
- **APPENDIX C** Reagents preparation 133

**CURRICULUM VITAE** 140

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
1 Causes of Anterior uveitis	22
2 Causes of Posterior uveitis	23
3 Causes of Panuveitis	25
4 Causes of infectious uveitis	27
5 Primers and probes for detection of interested pathogens	53
6 Real-time PCR cycle	55
7 Size of amplified PCR product of interested micro-organisms	63
8 The quantity of stock DNA controls	74
9 The optimal concentrations of primers and probes used in reference singleplex real-time PCR.	75
10 The sensitivity test of CMV singleplex real-time PCR	77
11 The sensitivity test of HSV-1 singleplex real-time PCR (targeting to RL2 immediate early protein)	77
12 The sensitivity test of HSV-2 singleplex real-time PCR (targeting to RL2 immediate early protein)	78
13 The sensitivity test of HSV-1 singleplex real-time PCR (targeting to UL30: DNA polymerase)	78
14 The sensitivity test of HSV-2 singleplex real-time PCR (targeting to UL30: DNA polymerase)	79
15 The sensitivity test of <i>T. gondii</i> singleplex real-time PCR	79

16	The sensitivity test of VZV singleplex real-time PCR	80
17	Summary of the sensitivity of singleplex real-time PCR	80
18	General characteristics of 240 uveitis patients in Northern Thailand	82
19	Detection of interested infectious agents in intraocular fluid of uveitis patients by reference singleplex real-time PCR.	83
20	Detection of interested infectious agents in intraocular fluid of HIV positive patients with uveitis by reference singleplex real-time PCR.	83
21	Detection of interested infectious agents in intraocular fluid of non-HIV patients with uveitis by reference singleplex real-time PCR.	84
22	Results of CMV/HSV-1 duplex real-time PCR investigation. Mixing of fixed concentration of CMV DNA control and various concentration of HSV-1 DNA control determination using CMV/HSV-1 duplex real-time PCR.	86
23	Results of CMV/HSV-1 duplex real-time PCR reaction. Mixing of fixed concentration of HSV-1 DNA control and various concentration of CMV DNA control determination using CMV/HSV-1 duplex real-time PCR.	87
24	Results of CMV/HSV-2 duplex real-time PCR reaction. Mixing of fixed concentration of CMV DNA control and various concentration of HSV-2 DNA control determination using CMV/HSV-2 duplex real-time PCR.	89

25	Results of CMV/ <i>T.gondii</i> duplex real-time PCR reaction.	91
	Mixing of fixed concentration of CMV DNA control and various concentration of <i>T.gondii</i> DNA control determination using CMV/ <i>T.gondii</i> duplex real-time PCR.	
26	Results of CMV/VZV duplex real-time PCR reaction.	92
	Mixing of fixed concentration of CMV DNA control and various concentration of VZV DNA control determination using CMV/ VZV duplex real-time PCR.	
27	Diagnostic efficiency determination of CMV/VZV via duplex real-time PCR.	94
28	The results of HSV singleplex real-time PCR optimization	96
29	The sensitivity of HSV singleplex real-time PCR	97
30	The sensitivity test of multiplex real-time PCR	98
31	The average C <sub>T</sub> value of multiplex real-time PCR compared to CMV singleplex real-time PCR.	98
32	The average C <sub>T</sub> value of multiplex real-time PCR compared to HSV singleplex real-time PCR.	99
33	The average C <sub>T</sub> value of multiplex real-time PCR compared to VZV singleplex real-time PCR.	99
34	Diagnostic efficiency determination of multiplex real-time PCR.	101
35	Diagnostic results of non-HIV patients with uveitis analyzed by real-time PCR and GWC analysis.	102

## LIST OF FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
1 The eye compartments	13
2 Anatomy of human eye	14
3 TaqMan hydrolysis probe principles	39
4 pGEM-T Easy Vector map and Sequence Reference Points	48
5 The confirmation of the present of PhHV-1 DNA fragment in purified plasmid DNA after large scale production.	65
6 The confirmation of the present of CMV DNA fragment in purified plasmid DNA after large scale production.	66
7 The confirmation of the present of HSV-1 DNA fragment (using the specific primers and probe targeting to RL2 immediate early protein) in purified plasmid DNA after large scale production.	67
8 The confirmation of the present of HSV-2 DNA fragment (using the specific primers and probe targeting to RL2 immediate early protein) in purified plasmid DNA after large scale production.	68
9 The confirmation of the present of HSV-1 and HSV-2 DNA fragments (using the specific primers and probe targeting to UL30: DNA polymerase) in purified plasmid DNA after large scale production.	69
10 The confirmation of the present of VZV DNA fragment in purified plasmid DNA after large scale production.	70

11 The confirmation of the present of <i>T.gondii</i> DNA fragment in purified plasmid DNA after large scale production.	71
---	----

**ABBREVIATIONS AND SYMBOLS**

%	percent
μ	micro
μg	microgram
μL	microliter
°C	degree Celsius
A	adenine
C	cytosine
G	guanine
T	thymine
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AU	anterior uveitis
bp	base pair
conc.	concentration
CMV	cytomegalovirus
C <sub>T</sub>	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	deoxyribosadenosine triphosphate
dCTP	deoxyribocytosine triphosphate
dGTP	deoxyriboguanine triphosphate

dTTP	deoxyribothymine triphosphate
dsDNA	double stranded deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
fg	femtogram
FHI	Fuchs heterochromic iridocyclitis
FHUS	Fuchs heterochromic uveitis syndrome
FWD	forward
g	gravity
gm	gram
gB	glycoprotein B
GWC	Goldmann-Witmer coefficient
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1
HSV	herpes simplex virus
HSV-1	herpes simplex virus type 1
HSV-2	herpes simplex virus type 2
IgG	immunoglobulin G
KPs	keratic precipitates
LB agar	Luria-Bertani agar
LB medium	Luria-Bertani medium
M	molar
mg	microgram
min.	minute

mL	milliliter
mM	millimolar
MW	molecular weight
ng	nanogram
nm	nanometer
O.D.	optical density
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PhHV-1	Phocid herpesvirus type 1
pmol	picomolar
pg	picogram
PU	posterior uveitis
rpm	revolution per minute
RWD	reward
SD	Standard of deviation
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T.gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
U	unit
UNG	uracil-N-glycosylase
UV	ultraviolet
vs.	versus
VZV	varicella zoster virus
w/v	weight per volume