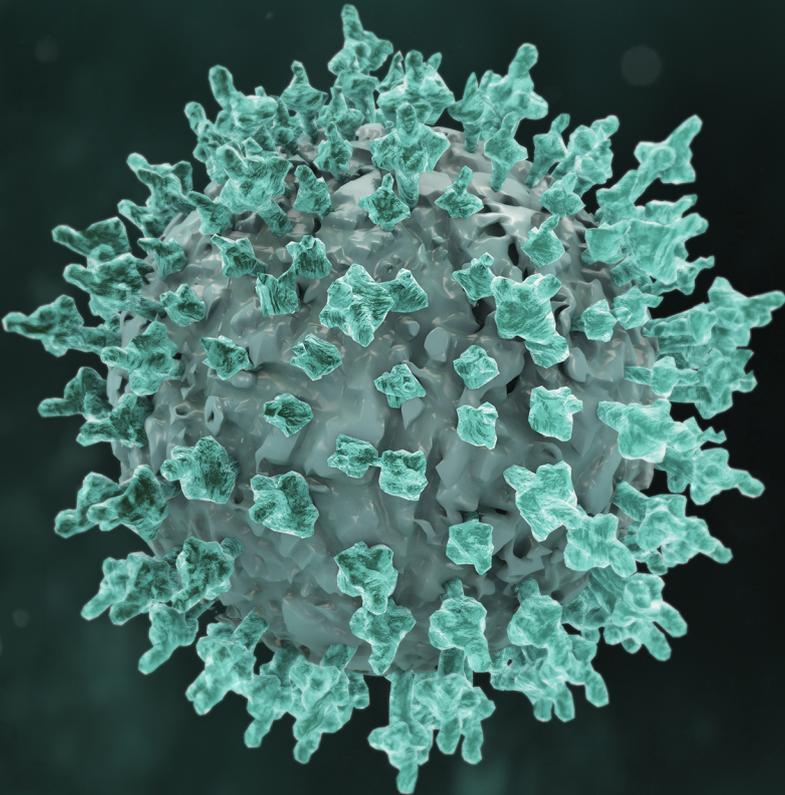


รายงานการศึกษา

อัตราการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2
ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย
ในผู้ป่วย COVID-19 ที่ไม่มีอาการ
และมีอาการไม่รุนแรงที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคร่วม



อัตราการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2
ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย
ในผู้ป่วย COVID-19 ที่ไม่มีอาการ
และมีอาการไม่รุนแรงที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคร่วม

จัดพิมพ์โดย สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์
อาคาร 3 ชั้น 4 ตึกกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ถ.ติวานนท์ อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000
โทรศัพท์: 0 2590 6218 โทรสาร : 0 2965 9844
URL : <http://www.imrta.dms.moph.go.th>

พิมพ์ครั้งที่ 1/2565

บทคัดย่อ

ผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่ไม่มีอาการ หรือมีอาการไม่รุนแรงและไม่มีปัจจัยเสี่ยงร่วมด้วยจะต้องได้รับการกักตัวเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 10 วัน หากสามารถลดระยะเวลาการกักตัวให้สั้นลงได้ โดยที่ผู้ติดเชื้อมีความปลอดภัยและไม่อยู่ในระยะแพร่กระจาย จะเป็นการประหยัดงบประมาณ รวมถึงผู้ติดเชื้อสามารถกลับไปดำเนินชีวิตได้ตามปกติ การศึกษาเชิงพรรณนาไปข้างหน้ามีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการแพร่เชื้อ SARS-CoV-2 (viral infectivity) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย โดยเก็บข้อมูลจากผู้ติดเชื้อที่ยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 ด้วย RT-PCR ที่เข้ารับการรักษาที่หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ (โรงแรมนารายณ์) ภายใต้การกำกับดูแลของโรงพยาบาลเลิดสินจำนวน 88 คนในระหว่างเดือนมีนาคม-ธันวาคม 2564 ผลการศึกษาพบว่า ผู้ติดเชื้อเป็นเพศหญิงร้อยละ 64.4 อายุเฉลี่ย 37.1 ± 12.3 ปี และดัชนีมวลกาย (BMI) เฉลี่ย 23.1 ± 3.5 กก./ม.² เป็นกลุ่มไม่มีอาการ (asymptomatic) ร้อยละ 34.1 และมีอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) ร้อยละ 65.9 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี rRT-PCR พบเชื้อในวันที่ 7 และ 10 คิดเป็นร้อยละ 82.9 (95%CI 75.1, 90.8) และ 81.8 (95%CI 73.8, 89.9) ตามลำดับ เมื่อจำแนกตามสถานะอาการ พบว่ากลุ่มไม่มีอาการตรวจพบเชื้อในวันที่ 7 และ 10 คิดเป็นร้อยละ 76.7 และ 73.3 ตามลำดับ การตรวจพบเชื้อของกลุ่มมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 ไม่เปลี่ยนแปลง (ร้อยละ 86.2) การตรวจหาสายพันธุ์เชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ด้วยวิธี subgenomic RNA พบว่าส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ alpha (B.1.1.7) ร้อยละ 53.4 สายพันธุ์ delta ร้อยละ 11.4 และไม่ใช้ทั้งสายพันธุ์ alpha และ delta ร้อยละ 35.2 ระดับแอนติบอดีชนิด anti-spike IgM ของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และวันที่ 10 มีค่า geometric mean titer (GMT) 2.42 และ 3.45 ตามลำดับ ($p < .001$) ส่วน anti-RBD IgG ในวันที่ 7 และวันที่ 10 มีค่า geometric mean titer (GMT) มีค่า geometric mean titer (GMT) 209.2 และ 520.1 ตามลำดับ ($p < .0001$) ระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG ในวันที่ 7 มีอัตรา seropositive เท่ากับร้อยละ 79.6 และ 77.3 ตามลำดับ ขณะที่ในวันที่ 10 อัตรา seropositive เพิ่มมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 89.8 และ 93.2 ตามลำดับ การตรวจด้วยวิธี RT-PCR และ subgenomic ในวันที่ 7 พบว่า RT-PCR ให้ผล detected (ร้อยละ 82.9) มากกว่าวิธีตรวจ subgenomic (ร้อยละ 30.7) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ของ subgenomic RNA และค่า Ct ของยีน N มีความสัมพันธ์กัน ($R^2 = 0.73$) สรุปผลได้ว่าการตรวจพบเชื้อในวันที่ 7 และวันที่ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลตรวจพบเชื้อ (detected) เป็นจำนวนมาก แต่ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (virus culture) พบเชื้อ (detected) ได้น้อยมากในวันที่ 7 และไม่พบเชื้อเลยในวันที่ 10 ภายหลังจากได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ COVID-19

Abstract

Asymptomatic and mild symptomatic patients with no risk of severe coronavirus disease (COVID-19) will be quarantine for 10 days as Thai guideline's recommendation. If the quarantine period can be shortened from 10 to 7 days while COVID-19 patients are safe and unable to spread, we could save the budget and infected person can return to normal life. This prospective descriptive study aimed to assess the rate of SARS-CoV-2 (viral infectivity) in patients diagnosed with asymptomatic and mild symptomatic COVID-19 on 7th day and 10th day after diagnosis. 88 of no symptom or mild symptomatic subjects were recruited at the hospital (Narai Hotel) under the supervision of Lerdsin Hospital which their secretion culture for SARS-CoV-2 were collected from nasopharyngeal and throat during March to December 2021. The results showed 64.4% female, mean age 37.1 ± 12.3 years and mean body mass index (BMI) 23.1 ± 3.5 kg/m². There were asymptomatic and mild symptomatic subjects 34.1% and 65.9% respectively. RT-PCR on 7th day and 10th day showed "detected" result 82.9% (95% CI 75.1, 90.8) and 81.8% (95% CI 73.8, 89.9) respectively. Virus culture on 7th day were "not detected" 98.9% (95 CI 96.7, 100) and no virus was found on 10th day. Subgenomic RNA method for SAR-CoV-2 viral strains were alpha (B.1.1.7) 53.4%, delta 11.4%, and neither alpha nor delta strains 35.2%. Geometric mean titer (GMT) of anti-spike IgM of asymptomatic or mildly symptomatic patients on day 7 and day 10 were 2.42 and 3.45, respectively ($p < .001$) while anti-RBD IgG on 7th day and 10th day were 209.2 and 520.1, respectively ($p < .0001$). Moreover, IgM and IgG levels on 7th day, the seropositive rates were 79.6% and 77.3% while on 10th day, were 89.8% and 93.2% respectively. RT-PCR and subgenomic on 7th day showed that RT-PCR was more detected (82.9%) than subgenomic methods (30.7%). The correlation of cycle threshold (Ct) between subgenomic RNA and N gene was high ($R^2 = 0.73$). It was concluded that although, infection at days 7 and day 10 from the date of diagnosis by RT-PCR showed a large number of infections, the virus culture showed very rarely "detected" report on 7th day and "not detected" on 10th day after diagnosis.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการวิจัยทุกท่าน ได้แก่ นายแพทย์สมศักดิ์ อรรถศิลป์ อธิบดีกรมการแพทย์ นายแพทย์มานัส โพธาภรณ์ รองอธิบดีกรมการแพทย์ และนายแพทย์อรรถสิทธิ์ ศรีสุบัติ ที่ปรึกษากรมการแพทย์ ที่สนับสนุนการดำเนินงานโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลเลิดสินที่อนุญาตในการเก็บข้อมูล ณ หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ COVID-19 โรงแรมนารายณ์ สีลม กรุงเทพฯ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในการเก็บข้อมูล ตลอดจนผู้ป่วยทุกท่านที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ขอบคุณ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานให้การศึกษาวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

| | หน้า |
|-------------------------------|------|
| บทคัดย่อ | ก |
| Abstract | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | จ |
| สารบัญภาพ | ฉ |
| บทนำ | 1 |
| การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง | 5 |
| วิธีการศึกษา | 17 |
| ผลการศึกษา | 21 |
| สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ | 33 |
| เอกสารอ้างอิง | 37 |
| ภาคผนวก | 43 |
| แบบเก็บข้อมูล | |

สารบัญตาราง

| | | หน้า |
|------------|---|------|
| ตารางที่ 1 | ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยที่มีผลยืนยันว่าติดเชื้อ COVID-19 | 21 |
| ตารางที่ 2 | ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR จำแนกตามสถานะอาการ | 23 |
| ตารางที่ 3 | ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ | 23 |
| ตารางที่ 4 | สายพันธุ์เชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ที่ตรวจด้วยวิธี Subgenomic ในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย | 23 |
| ตารางที่ 5 | ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR, Subgenomic และ Virus isolation ของผู้ป่วยในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย | 28 |
| ตารางที่ 6 | ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR และ Subgenomic ของผู้ป่วยในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย จำแนกตามระยะเวลาที่เริ่มมีอาการ | 28 |
| ตารางที่ 7 | ผลการแยกเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 การตรวจ rRT-PCR และการตรวจ subgenomic RNA ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง | 30 |

สารบัญภาพ

| | หน้า |
|-----------|---|
| ภาพที่ 1 | วงจรกิจต์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อ coronavirus 6 |
| ภาพที่ 2 | ระยะฟักตัวและการแสดงอาการของโรค COVID-19 7 |
| ภาพที่ 3 | จลนศาสตร์ของไวรัส COVID-19 และผลการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR เปรียบเทียบกับ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด IgG และ IgM 8 |
| ภาพที่ 4 | ขั้นตอนการทำ polymerase chain reaction (PCR) 10 |
| ภาพที่ 5 | กระบวนการ amplification ในรูปแบบของวิธีการ real-time PCR 11 |
| ภาพที่ 6 | หลักการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี chemiluminescent microparticle immunoassay หรือ CMIA 14 |
| ภาพที่ 7 | กลไกการเปล่งคลื่นแสงของสาร acridinium ester 15 |
| ภาพที่ 8 | สัดส่วนของระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับ การวินิจฉัย 24 |
| ภาพที่ 9 | ระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วย แต่ละรายบุคคลที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับ การวินิจฉัย 25 |
| ภาพที่ 10 | สัดส่วนของแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย 26 |
| ภาพที่ 11 | การตรวจพบภูมิต้านทาน (seropositive) ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ใน ผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย 27 |
| ภาพที่ 12 | ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ของยีน nucleocapsid, การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (viral culture) และการตรวจหา subgenomic RNA โดยเปรียบเทียบกับช่วงเวลาในผู้ป่วย ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงระหว่างวันที่ 1 ถึง วันที่ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย 29 |
| ภาพที่ 13 | ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ที่ได้จากการตรวจหาปริมาณ RNA ทั้งหมดจากยีน N และ RdRp จากตัวอย่างผู้ป่วยทำการเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบและ ตรวจไม่พบ subgenomic RNA 31 |
| ภาพที่ 14 | ความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า Cycle-Threshold (Ct) ที่ได้จากการตรวจตัวอย่าง ด้วยวิธี real-time RT-PCR ในบริเวณยีน Nucleocapsid และค่า Ct ที่ได้จาก การตรวจหา subgenomic E gene 31 |

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีแนวทางการดูแลรักษา และการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 คือ แนวทางเวชปฏิบัติ การวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล กรณีผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ COVID-19 ที่จัดทำโดยกระทรวงสาธารณสุข ฉบับปรับปรุง วันที่ 28 มกราคม พ.ศ.2564¹ ได้กำหนดแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยตามกลุ่มอาการ โดยผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการและกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรงที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงร่วมด้วยจะเข้าพักรักษาในโรงพยาบาล หรือสถานที่ที่รัฐจัดให้เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน นับจากวันที่ตรวจพบเชื้อ และพิจารณาการจำหน่ายผู้ป่วยออกจากโรงพยาบาลตามเกณฑ์ โดยไม่ต้องทำ swab ซ้ำก่อนจำหน่าย และมาตรการควบคุมการแพร่ระบาด COVID-19 สำหรับผู้ที่เดินทางมาจากต่างประเทศ โดยกำหนดให้เข้ากักตัวในสถานกักตัวที่รัฐจัดไว้เป็นเวลา 14 วัน

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ COVID-19 ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นวิธีการที่มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถตรวจจับเชื้อไวรัสปริมาณน้อยในรูปแบบของสารพันธุกรรม ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต แต่ไม่ได้บ่งบอกถึงความสามารถในการแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่น²⁻³ ซึ่งการหาความสามารถในการแพร่เชื้อโดยการแบ่งตัวหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสสามารถทำได้โดยวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลาและความเชี่ยวชาญเป็นอย่างมาก และต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยสูง ในขณะที่การตรวจหา RNA ในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA) เป็นวิธีการที่สามารถตรวจการแบ่งตัวหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสอีกวิธีหนึ่งที่มีความยุ่งยากน้อย และใช้นานน้อยกว่าวิธีการเพาะเชื้อ โดยสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป นอกจากนี้การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ (immune responses) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถตรวจการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อ COVID-19 ได้⁴ จากผลการดำเนินการโครงการตรวจยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 ด้วยวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) ของกรมการแพทย์ พบว่าผู้ป่วยกลุ่มมีอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) และไม่มีอาการ (asymptomatic) ที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 เข้ารับการกักตัวที่หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ (hospital) มีระยะเวลา นับจากวันที่ตรวจพบเชื้อ อยู่ระหว่าง 12 ถึง 36 วัน ผลการตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีการเพาะเชื้อไวรัส ไม่พบเชื้อในผู้ป่วยทุกราย แต่มีผล RT-PCR เป็นบวก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเชื้อ COVID-19 มีชีวิตอยู่เพียงประมาณ 8 วัน⁵ ซึ่งสารพันธุกรรมที่ตรวจพบด้วยวิธี RT-PCR อาจเป็นซากเชื้อที่ไม่ก่อโรค และผู้ป่วยไม่สามารถแพร่เชื้อได้ ทั้งนี้ จำนวนกลุ่มตัวอย่างจากการศึกษาที่ผ่านมา มีค่อนข้างน้อย กรมการแพทย์โดยสถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์จึงได้จัดทำโครงการศึกษาอัตราการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2 (viral infectivity) ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยในผู้ป่วย COVID-19 ที่ไม่มีอาการ (asymptomatic) และมีอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) ที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคร่วม โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่เชื้อ การตรวจพบเชื้อ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 จากผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจำนวน 4 วิธี ได้แก่ วิธีการเพาะเชื้อ วิธี subgenomic RNA วิธี RT-PCR และวิธีการตรวจหาภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อให้

ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถในการแพร่เชื้อ และระยะเวลาที่ผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อได้ และนำข้อมูลที่ได้มาสนับสนุนการปรับปรุงระยะเวลาการกักตัวในแนวทางเวชปฏิบัติการวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลของผู้ป่วย COVID-19 ต่อไป

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลัก

ประเมินอัตราการแพร่เชื้อ SARS-CoV-2 (viral infectivity) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย โดยการเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ

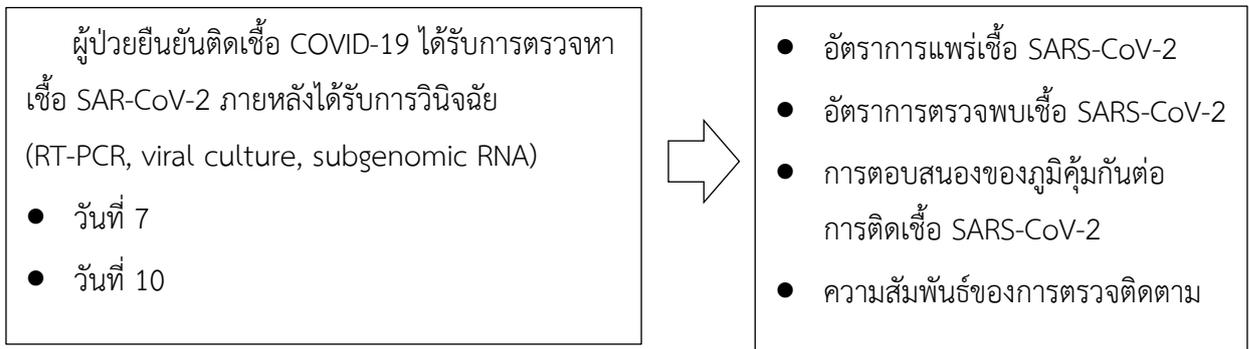
วัตถุประสงค์รอง

1. ประเมินอัตราการตรวจพบเชื้อ SARS-CoV-2 (viral shedding) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย โดยการตรวจเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR จากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ
2. ประเมินการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (immune responses) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่เชื้อ การตรวจพบเชื้อ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย
4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัสกับการตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง ในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

ขอบเขตของโครงการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 กลุ่มอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) ที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงร่วม และไม่มีอาการ (asymptomatic) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล/สถาบันในสังกัดกรมการแพทย์จำนวน 5 แห่ง โดยขออนุญาตเก็บข้อมูลจากผู้อำนวยความสะดวก และเก็บข้อมูลผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่ให้ความยินยอมและสมัครใจเข้าร่วมโครงการ

กรอบแนวคิด



สถานที่ดำเนินการ

โรงพยาบาล โรงพยาบาลสนาม หรือหอผู้ป่วยเฉพาะกิจของโรงพยาบาลและสถาบันในสังกัดกรมการแพทย์ จำนวน 6 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลราชวิถี โรงพยาบาลเลิดสิน โรงพยาบาลนพรัตนราชธานี โรงพยาบาลมหาวชิราลงกรณธัญบุรี สถาบันโรคทรวงอก และสถาบันประสาทวิทยา

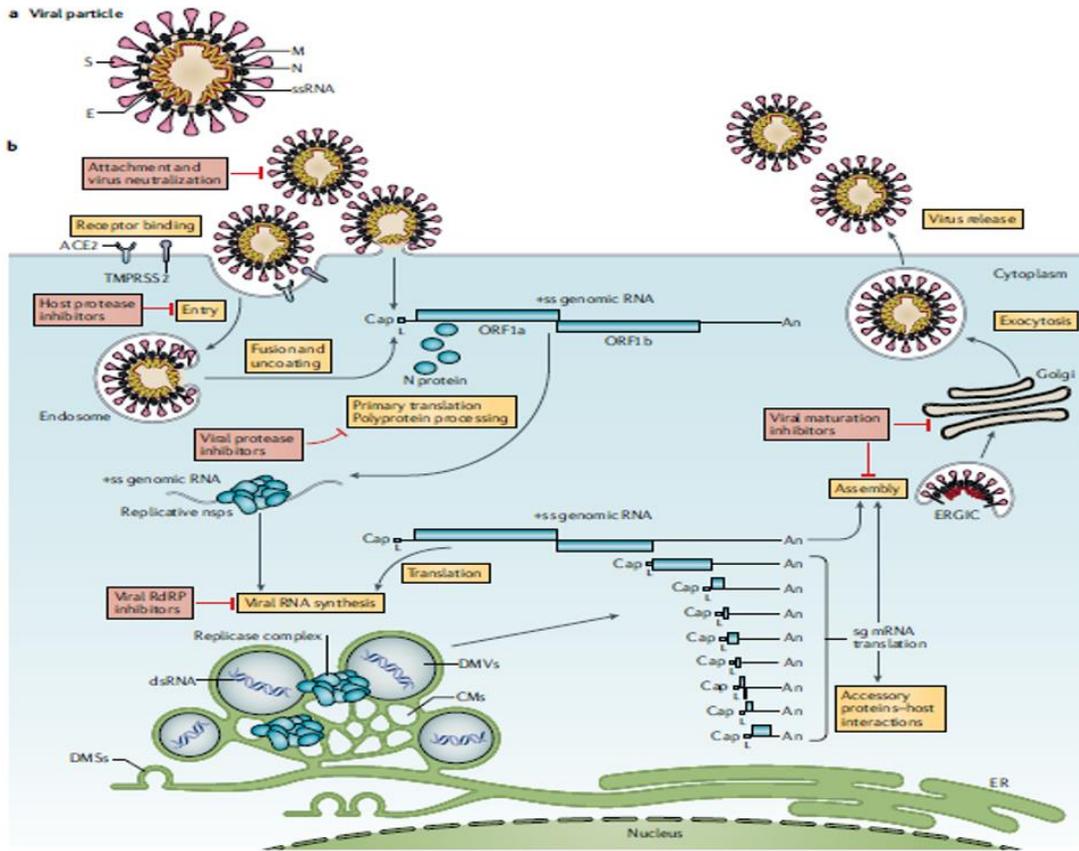
คำนิยามเชิงปฏิบัติการ

1. ผู้ป่วย COVID-19 ที่มีอาการไม่รุนแรง ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรครุนแรง/ โรคร่วมสำคัญ (symptomatic COVID-19 without pneumonia and no risk factors for severe disease)¹ หมายถึง ผู้ป่วยที่มีอาการ เช่น มีไข้หรือวัดอุณหภูมิกายได้ตั้งแต่ 37.5 องศาเซลเซียสขึ้นไป และ/ หรือมีอาการของระบบทางเดินหายใจอย่างน้อยหนึ่งอาการ ดังต่อไปนี้ ไอ มีน้ำมูก เจ็บคอ ไม่ได้กลิ่น หายใจเร็ว หายใจเหนื่อย หรือหายใจลำบาก และภาพถ่ายรังสีปอดปกติ ไม่มีภาวะเสี่ยง/ ภาวะร่วม/ โรคร่วมสำคัญ
2. ผู้ป่วย COVID-19 ไม่มีอาการ (asymptomatic COVID-19)¹ หมายถึง ผู้ที่มีผลตรวจทางห้องปฏิบัติการพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี PCR จากห้องปฏิบัติการห้องปฏิบัติการตามที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประกาศอย่างน้อย 1 แห่ง หรือด้วยวิธี sequencing หรือเพาะเชื้อแต่ไม่มีอาการหรืออาการแสดงใด ๆ
3. ผลการตรวจที่ไม่สามารถสรุปผลได้ (inconclusive tests) หมายถึง ผลการวิเคราะห์ยืนยันที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 อย่างน้อย 2 ตำแหน่งให้ผลไม่ตรงกัน เช่น พบผลบวกเพียง 1 ตำแหน่ง หรือพบผลบวกไม่ครบทุกยีนตามที่ระบุไว้ในการแปลผลบวกของชุดน้ำยา
4. การแพร่เชื้อ (viral infectivity)⁶ หมายถึง ความสามารถของเชื้อไวรัสในการเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ และถ่ายทอดสารพันธุกรรมโดยการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อและโรคที่ตามมาในโฮสต์

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus Disease 2019; COVID-19) เกิดจากเชื้อไวรัส severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) จัดอยู่ในตระกูล *Coronaviridae* ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในตระกูลนี้โดยใช้หลักเกณฑ์ความหลากหลายของพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (genetic diversity) สามารถจัดแบ่งไวรัสออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, และ *Deltacoronavirus* เชื้อ SARS-CoV จัดอยู่ในกลุ่ม *Betacoronavirus*⁷⁻⁹ ซึ่งก่อโรคสำคัญหลายชนิดทั้งในมนุษย์และสัตว์ เชื้อ SARS-CoV-2 ก่อให้เกิดโรคที่มีลักษณะอาการคล้ายกับเชื้อ SARS-CoV ในปี พ.ศ. 2546 และเชื้อ Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) ในปี พ.ศ. 2555 ลักษณะอาการที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 ได้แก่ ไอแห้ง ๆ มีไข้ ปวดศีรษะ หายใจลำบากและปอดบวม ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 3-5¹⁰⁻¹² ภายในอนุภาคของไวรัส SARS-CoV-2 บรรจุด้วยสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นตรงสายเดี่ยวที่มี polarity เป็นบวก (positive single strand) คือ มีคุณสมบัติสามารถทำหน้าที่เป็น mRNA ที่สร้างโปรตีนได้ สารพันธุกรรมมีขนาดประมาณ 29 กิโลเบส ลักษณะจีโนมของไวรัส SARS-CoV-2 มีประมาณ 14 open reading frame (ORF) ORF1a และ ORF1ab จะสร้างโปรตีนขนาดยาวออกมาตลอดสารพันธุกรรม 2 สาย โปรตีนที่สร้างนี้ต่อมาจะถูกเอนไซม์ย่อยให้เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) ทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ NSP1–NSP16 โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมของไวรัสและการสังเคราะห์ subgenomic RNA (sgRNA)¹³

ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ RNA (RNA-dependent RNA synthesis) ของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สำคัญ ได้แก่ 1) การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (genome replication) เป็นขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ genomic RNA (gRNA) ของเชื้อไวรัส และ 2) เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จะสร้าง sgRNA อย่างน้อย 9 ชนิด ที่มี ORFs เพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนโครงสร้างหลักทั้ง 4 ชนิด (spike, membrane, envelope และ nucleocapsid) และสร้างโปรตีน accessory อื่น ๆ (โปรตีน 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8 และ 10) (ภาพที่ 1) ในการสร้าง sgRNA เกิดขึ้นผ่านกระบวนการที่เรียกว่า discontinuous transcription เริ่มจากการสร้างสารพันธุกรรมที่เป็นสายลบเพื่อทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการผลิตสารพันธุกรรมที่เป็นสายบวก โครงสร้างของ sgRNA ประกอบด้วยลำดับเบสที่สำคัญ 2 ส่วนคือ leader sequence เป็นส่วนที่ได้มาจากบริเวณ 5' UTR ของ gRNA และ transcription regulating sequence (TRS) มีตำแหน่งอยู่ด้าน 5' ของบริเวณ ORF ของ sgRNA



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ Coronavirus¹³

sgRNA มีบทบาทสำคัญในการเกิดวิวัฒนาการของไวรัสในกลุ่ม coronaviruses และการสังเคราะห์ sgRNA นั้นต้องอาศัยการปรับเปลี่ยน polarity ของสายพันธุกรรมแม่แบบจากสายลบเป็นสายบวก จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีอัตราการเกิด recombination ที่สูงเพื่อทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุในกลุ่ม coronaviruses มีรายงานการศึกษาพบว่า sgRNA มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน¹⁵ มีรายงานการศึกษาพบเชื้อ SARS-CoV-2 มีช่วงเวลาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่ active ที่บริเวณลำคอในช่วง 5 วันแรกหลังจากที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการจะตรวจพบ sgRNAs เฉพาะในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ SARS-CoV-2 โดย sgRNAs เหล่านี้จะไม่ถูกนำไป pack ใน virions ในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงนำมาเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าเซลล์ใดกำลังมีการติดเชื้อไวรัสที่กำลังมีการเพิ่มจำนวนตัวเองอยู่ในขณะนั้น⁵

การแพร่เชื้อของโรค COVID-19 (transmission of COVID-19)

เชื้อไวรัสโคโรนาสามารถแพร่จากคนสู่คนได้หลายลักษณะ เช่น จากสิ่งคัดหลั่งจากระบบหายใจของผู้ป่วย (น้ำลาย เสมหะ น้ำมูก) ของผู้ป่วยมาสัมผัสเยื่อต่างๆ เช่น เยื่อทางเดินหายใจ เยื่อตา หรือแพร่ผ่านทางฝอยละอองน้ำลายขนาดใหญ่ (droplet transmission) จากการไอ และจาม ในบางกรณีอาจแพร่ผ่านทางฝอยละอองขนาดเล็กที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมครอน (aerosol transmission) ขณะที่มีการทำหัตถการที่ทำให้เกิดฝอยละอองขนาดเล็ก และยังสามารถแพร่ผ่านสิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ (transmission via fomite) ได้ด้วย¹⁶

ระยะฟักตัวของโรค COVID-19 (incubation period; IP)

COVID-19 มีระยะฟักตัวตั้งแต่ได้รับเชื้อจนถึงช่วงที่เริ่มมีอาการอยู่ในช่วง 1-14 วัน โดยเฉลี่ย 5-6 วัน ส่วนใหญ่ COVID-19 สามารถแพร่โรคได้เมื่อมีอาการและอาการแสดงแล้วเท่านั้น จึงเป็นเหตุผลที่แนะนำให้ผู้ที่สัมผัสโรคควรกักกันตัวจากผู้อื่นเป็นระยะเวลา 14 วันเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส¹⁷ (ภาพที่ 2)

ปัจจัยที่มีผลต่อระยะฟักตัว¹⁸ ได้แก่

1. ปริมาณของเชื้อไวรัสที่ได้รับ ถ้าได้รับเชื้อไวรัสในปริมาณมากจะทำให้เกิดโรคเร็ว มีหมายถึงระยะฟักตัวสั้น
2. ลักษณะการได้รับเชื้อ เช่น ไวรัส COVID-19 หากเข้าสู่ปอดโดยตรงทางจมูก และปาก จะเกิดโรคเร็วกว่าการรับเชื้อทางเยื่อบุตา
3. ความเร็วของการเพิ่มจำนวนไวรัสในร่างกายมนุษย์
4. สุขภาพของผู้ที่ได้รับเชื้อ
5. ปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อต่อไวรัส ซึ่งมีผลทั้งในการกำจัดเชื้อ และการอักเสบซึ่งมีผลให้เกิดอาการของโรค เช่น ไข้ ไอ หอบ



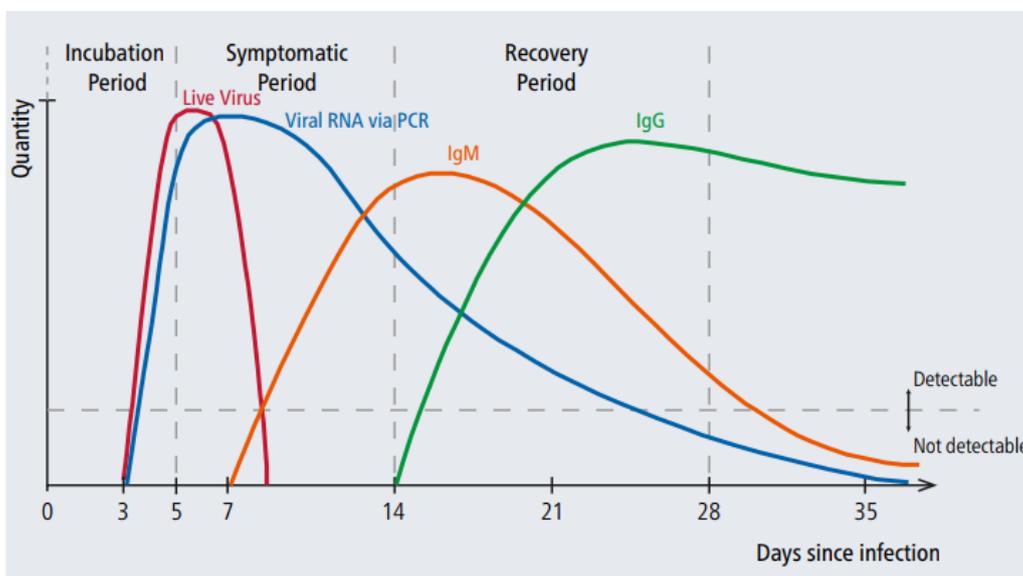
ภาพที่ 2 ระยะฟักตัวและการแสดงอาการของโรค COVID-19¹⁹

การขับเชื้อไวรัส (viral shedding)

เมื่อเชื้อไวรัส COVID-19 เข้าสู่ร่างกาย การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสจะเกิดขึ้นในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและในปอด ปริมาณเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนบนจะมีปริมาณมากที่สุดภายใน 7 วันหลังจากเริ่มมีอาการ และช่วงที่ร่างกายมีการขับเชื้อไวรัสออกจากทางเดินหายใจมากที่สุดจะเกิดขึ้นในช่วงแรกที่แสดงอาการและลดลงหลังจากนั้น อย่างไรก็ตาม การแพร่เชื้อก่อนที่ร่างกายจะแสดงอาการอาจเกิดขึ้นได้ แต่หากไม่มีอาการใด ซึ่งเป็นกลไกหลักในการขับเชื้อไวรัสออกมา อาจจำกัดการแพร่เชื้อในช่วงนั้นได้ โดยปริมาณเชื้อไวรัสและระยะเวลาในการขับเชื้อไวรัสออกจากร่างกายเป็นปัจจัยที่สำคัญในการแพร่เชื้อ⁶ จากการศึกษา meta-analysis ของ Cevik และคณะ⁶ รายงานว่าระยะเวลาเฉลี่ยของการขับเชื้อไวรัส COVID-19 ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนเท่ากับ 17 วัน (ระยะเวลามากที่สุด 83 วัน) ระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเท่ากับ 14.6 วัน (ระยะเวลามากที่สุด 59 วัน) อุจจาระเท่ากับ 17.2 วัน (ระยะเวลามากที่สุด 35 วัน) และตัวอย่างซีรัมเท่ากับ 16.6 วัน (ระยะเวลามากที่สุด 60 วัน) โดยวันที่ 9 ภายหลังจากวันที่เริ่มมีอาการไม่พบเชื้อไวรัสที่มีชีวิตแล้ว แม้จะตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในปริมาณมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ Wölfel⁵ ที่รายงานว่าภายหลังจากวันที่ 7 นับจากวันที่ผู้ป่วยมีอาการ ผลการเพาะเชื้อของผู้ป่วยทั้งหมดไม่พบเชื้อ COVID-19

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัส COVID-19 (immune responses in COVID-19)

เมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัส COVID-19 ภูมิคุ้มกันที่มักพบในเลือดในช่วง 5-7 วันแรกหลังจากเริ่มมีอาการ คือ ภูมิคุ้มกันชนิด IgM⁵ ซึ่งภูมิคุ้มกัน IgM ทำหน้าที่ในการป้องกันแบคทีเรียแกรมลบเป็นหลัก และยังเป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อจากเชื้อโรคส่วนใหญ่ โดยปริมาณของแอนติบอดีชนิด IgM จะเพิ่มขึ้นและลดลงเร็วกว่าภูมิคุ้มกันชนิด IgG²⁰ สำหรับภูมิคุ้มกันชนิด IgG จะสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 11 หลังจากเริ่มมีอาการ และคงอยู่นานประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ¹² โดยภูมิคุ้มกันชนิด IgG เป็นภูมิคุ้มกันที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ (neutralizing antibody) ซึ่งร่างกายของผู้ป่วย COVID-19 บางรายอาจไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด IgG²¹ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 จลนศาสตร์ของไวรัส COVID-19 และผลการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR เมื่อเวลาผ่านไปเปรียบเทียบกับ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด IgG และ IgM²⁰

การตรวจวินิจฉัยโรค COVID-19

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรค COVID-19 มี 4 วิธี ได้แก่

1. การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

หลักการของ real-time polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีการที่อาศัยเทคนิคพื้นฐานในการทำ PCR โดยได้มีการพัฒนาให้มีการตรวจที่สะดวกรวดเร็วขึ้น ปัจจัยที่สำคัญของการทำ polymerase chain reaction (PCR) (ภาพที่ 4) คือ ต้องรู้ลำดับเบสของที่ปลายทั้งสองด้านของยีนหรือชิ้น DNA ส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อที่จะสามารถสร้างสายนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดประมาณ 20-30 เบส ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) จำนวน 2 เส้น โดยไพรเมอร์แต่ละชนิดจะมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบแต่ละเส้น แต่ละตำแหน่งการจับคู่จะอยู่ด้านข้าง (flanking) ของชิ้น DNA เป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน นั่นคือขนาดและตำแหน่งของ DNA เป้าหมายสามารถกำหนดได้โดยการกำหนดลักษณะ

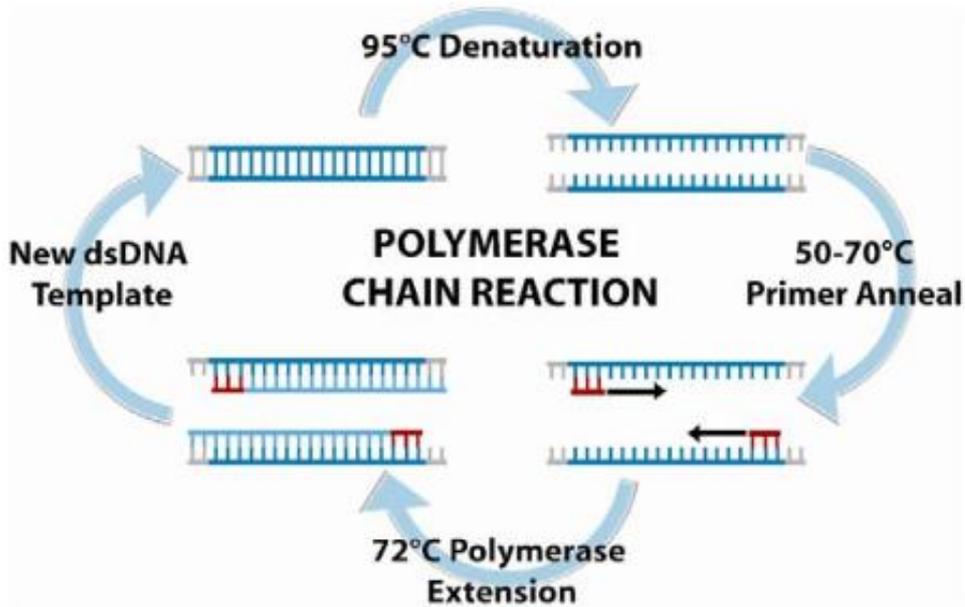
และตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้งสอง นอกจากนี้ PCR ยังต้องมีเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งทนต่อความร้อน (thermostable) เป็นตัวช่วยสร้างสาย DNA ใหม่ โดยที่เอนไซม์ DNA polymerase ที่นิยมใช้สกัดได้จากแบคทีเรียที่เติบโตได้ในน้ำพุร้อน แบคทีเรียชนิดนี้มีชื่อเรียกว่า *Thermus aquaticus* จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq polymerase* ซึ่งต้องการใช้ Mg^{2+} เป็นปัจจัยร่วม และนอกจากนี้การทำ PCR ยังต้องการนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) เป็นสารตั้งต้น และมีบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมให้ระบบอยู่ในภาวะที่เหมาะสม²²⁻²⁴

ปฏิกิริยา PCR เป็นปฏิกิริยาที่เป็นรอบ (cycle) โดยนำ DNA ที่มียีนที่เราต้องการเพิ่มจำนวน และปัจจัยที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำลงในเครื่องที่สามารถปรับอุณหภูมิขึ้นลง และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ได้ตามเวลาที่เรากำหนด ปริมาณชิ้น DNA ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของ PCR จะประมาณเท่ากับตัวเลข 2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของ PCR ซึ่งแต่ละรอบของ PCR นั้นประกอบด้วยขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

- Denaturation ขั้นตอนนี้เป็นเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อเข้าไปแยกสายคู่ของ DNA เพื่อให้ DNA สายเดี่ยวที่เกิดขึ้นเป็นแม่แบบที่สายไพรเมอร์จะเข้ามาเกาะได้ในขั้นตอนต่อไป

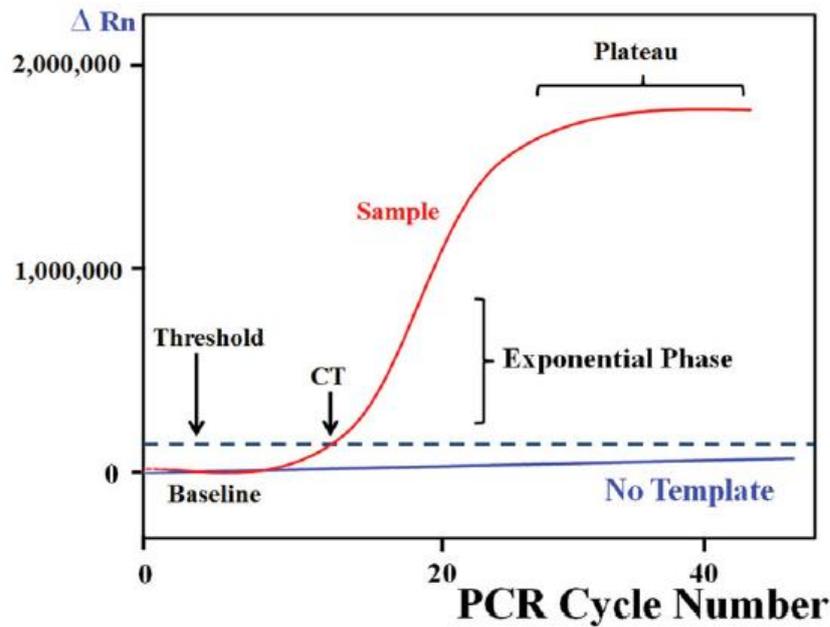
- Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับสาย DNA แม่แบบทั้งสองเส้น ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อลดอุณหภูมิของระบบลงมาที่ประมาณ 55°C อาจมากหรือน้อยกว่านี้ได้ ขึ้นอยู่กับความยาวและจำนวนเบส G และ C (GC content) ของไพรเมอร์ สาย DNA แม่แบบทั้งสองสายก็สามารถกลับเข้ามาจับคู่กันได้ (reanneal) แต่เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับสาย DNA แม่แบบ และมีปริมาณมากกว่ามาก จึงจับคู่กับสาย DNA แม่แบบได้ก่อน โดยจะเกาะที่ตำแหน่งที่เป็นคู่สมกันระหว่างไพรเมอร์กับ DNA แม่แบบ

- Extension เป็นขั้นตอนการต่อเติมนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันกับสาย DNA ต้นแบบ โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจากปลาย 3' ของไพรเมอร์ทั้งสองออกไปขั้นตอนนี้เกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะทำได้ DNA สายใหม่สร้างจากทิศ 5' ไป 3' หลังจากปล่อยให้เอนไซม์ทำงานได้ช่วงเวลาหนึ่ง ปฏิกิริยา PCR จะวนกลับไปเริ่มต้นที่ขั้นตอนแรกใหม่ และทำซ้ำ ๆ กันไปอย่างนี้ ประมาณ 40-45 รอบก็จะได้ชิ้น DNA ที่ต้องการศึกษาในจำนวนที่มากพอ²²⁻²⁴



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการทำ polymerase chain reaction (PCR)²²

หลักการของเทคนิค real-time PCR อาศัยการติดตามฟลูออเรสเซนซ์เข้าไปที่สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของโพรบหรือไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมาให้จำเพาะกับบริเวณที่ต้องการตรวจสอบ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์นั้นจะแปรผันตรงกับปริมาณผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วน PCR ที่ทำการ amplified ได้ในแต่ละรอบนั้น โดยผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงในรูปแบบที่เป็น real-time วิธีที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันคือ การออกแบบติดตามฟลูออเรสเซนซ์เข้ากับโพรบ เพราะมีความจำเพาะสูงกับผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วน PCR ที่เราต้องการ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ผลนั้นซอฟต์แวร์ของคอมพิวเตอร์จะสร้างกราฟที่ได้ในรูปแบบที่เป็น exponential plot จะทำการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจจับได้ในแต่ละรอบของการทำ amplification ของผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วน PCR ค่า Threshold cycle (Ct) ที่ได้บ่งบอกถึงปริมาณสารพันธุกรรม DNA เริ่มต้น ซึ่งถ้ามีสารพันธุกรรม DNA ตั้งต้นในปริมาณต่ำ ค่า Ct จะมีค่าค่อนข้างสูง²⁵ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 กระบวนการ amplification ในรูปแบบของวิธีการ real-time PCR²⁵

การตรวจด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถทราบผลภายใน 3-5 ชั่วโมง และสามารถตรวจจับเชื้อไวรัสในปริมาณน้อย ๆ ได้ ดังนั้น ไม่ว่าจะเชื้อไวรัสนั้นคือเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย การตรวจด้วยวิธีนี้สามารถตรวจจับได้หมดจากสารคัดหลั่งทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของผู้สงสัยติดเชื้อ จัดว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อการรักษาที่รวดเร็ว ตั้งแต่ระยะแรกของการเกิดโรค และใช้ติดตามผลการรักษาได้ ส่วนวิธีการเก็บตัวอย่างนั้น แพทย์จะทำการป้ายเอาเยื่อในคอ หรือเนื้อเยื่อหลังโพรงจมูก หรือนำเสมหะที่อยู่ในปอด ออกมาตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งการตรวจวิธีนี้ต้องระวังการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จึงต้องทำในห้องแล็บที่ได้รับมาตรฐานเท่านั้น สำหรับการเก็บน้ำลายส่งตรวจ RT-PCR มีข้อควรระวังคือ ไม่ควรแปรงฟันใช้น้ำยาบ้วนปาก ตื่นน้ำ หรือเคี้ยวหมากฝรั่งก่อนเก็บน้ำลาย แม้ว่าวิธี RT-PCR จะเป็วิธีที่มีความไวและมีประสิทธิภาพ แต่อาจมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การใช้เจ้าหน้าที่เก็บส่งตรวจจำนวนมาก และใช้เวลาในการเก็บส่งตรวจค่อนข้างนาน

2. การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี subgenomic RNA

sgRNA มีบทบาทสำคัญในการเกิดวิวัฒนาการของไวรัสในกลุ่ม coronaviruses และการสังเคราะห์ sgRNA นั้นต้องอาศัยการปรับเปลี่ยน polarity ของสารพันธุกรรมแม่แบบจากสายลบเป็นสายบวก จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีอัตราการเกิด recombination ที่สูงเพื่อทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ในกลุ่ม coronaviruses มีรายงานการศึกษาพบว่า sgRNA มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน¹⁵ มีรายงานการศึกษาพบเชื้อ SARS-CoV-2 มีช่วงเวลาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่ active ที่บริเวณลำคอในช่วง 5 วันแรกหลังจากที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการ จะตรวจพบ sgRNAs เฉพาะในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ SARS-CoV-2 โดย sgRNAs เหล่านี้จะไม่ถูกนำไป pack ใน virions ในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงนำมาเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าเซลล์ใดกำลังมีการติดเชื้อไวรัสที่กำลังมีการเพิ่มจำนวนตัวเองอยู่ในขณะนั้น⁵

การตรวจวิเคราะห์หา sgRNA ของเชื้อ SARS-CoV-2 ในตัวอย่างผู้ป่วยนั้น เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่อยู่ในระหว่างกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (replication) ของเชื้อไวรัส วิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ การตรวจหา sgRNA ของเชื้อ SARS-CoV-2 โดยตรงด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (PCR) มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นจำนวนมากได้แสดงให้เห็นถึงการนำ subgenomic RNA มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบบ routine เพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ยังอยู่ในช่วงเวลาที่เพิ่มจำนวนได้ หรือเพื่อบ่งบอกได้ว่าผู้ป่วยยังสามารถแพร่เชื้อไปให้บุคคลอื่นได้หรือไม่^{5,26-27} และมีรายงานการศึกษาเพื่อที่พิสูจน์ทั้ง subgenomic E และ subgenomic N gene เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเป็นตัวบ่งชี้ถึงกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส²⁸

3. การเพาะเชื้อไวรัส (viral culture)

การเพาะเชื้อไวรัสมีวัตถุประสงค์เพื่อการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส (diagnostic virology) และเพื่อเตรียมเป็นวัคซีนและแอนติเจน เป็นต้น โดยเป็นการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของไวรัส ส่วนใหญ่ไวรัสจะยังมีชีวิตอยู่ในช่วงก่อนมีอาการและหลังมีอาการแล้วระยะหนึ่งอาจจะเป็น 7-10 วัน หลังจากนั้นโอกาสที่จะแพร่กระจายโรคจะเริ่มลดลง แม้จะยังตรวจพบ RNA ของไวรัสอยู่อีกระยะหนึ่ง ซึ่งปัจจุบันการเพาะเชื้อไวรัสไม่ได้ใช้เพื่อการวินิจฉัย COVID-19 เนื่องจากยังไม่มีชนิดของเซลล์สำหรับเพาะเชื้อที่แน่ชัด ทั้งนี้การเพาะเชื้อไวรัสเป็นวิธีการต้องใช้เวลาและความเชี่ยวชาญมาก รวมถึงเหตุผลด้านชีวจริย⁴

4. การตรวจภูมิคุ้มกันต่อไวรัสด้วยวิธีทาง serology

การตรวจวัดระดับแอนติบอดีหรือตรวจด้วยวิธีทาง serology มีส่วนช่วยที่สำคัญในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยก่อนและ/หรือหลังการติดเชื้อไวรัสได้ อย่างไรก็ตาม ความคลาดเคลื่อนของระยะเวลาที่แสดงอาการ และช่วงเวลาที่เกิดขึ้นอย่างซีรั่มส่งผลต่อความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจด้วยวิธีทาง serology²⁹ มีรายงานการศึกษา พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของระดับแอนติบอดีกับ seroprotection ในตัวอย่างสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมนุษย์ จากผลการทดลองนี้มีส่วนสนับสนุนการคิดค้นวัคซีนในช่วงระยะเริ่มต้นต่อเชื้อ SARS-CoV-2³⁰ ปัจจุบันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างชัดเจนว่าระดับแอนติบอดีที่จะสามารถป้องกันการติดเชื้อ SARS-CoV-2 มีค่าเท่าใดหรือระยะเวลาในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด humoral อยู่ได้นานแค่ไหนหลังจากที่มีการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

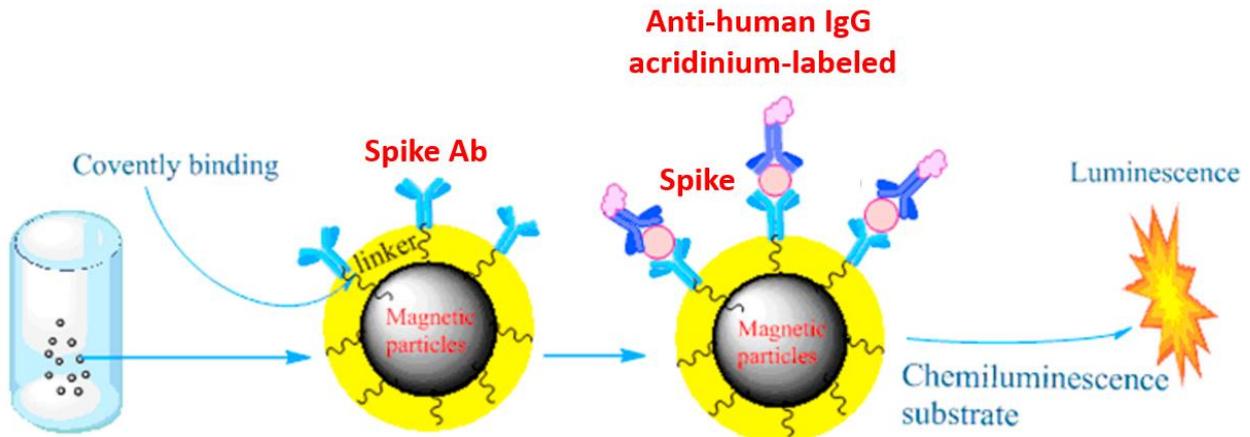
โปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของเชื้อ SARS-CoV-2 คือ โปรตีน spike (S), nucleocapsid (N), envelope (E), และ membrane (M) มีรายงานการศึกษาพบว่า โปรตีน N เป็นโปรตีนโครงสร้างที่ถูกผลิตออกมามากที่สุดและมีความอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนสูง รวมถึงยังมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้สูง (immunogenicity)³¹ นอกจากนี้ มีหลากหลายบทความทางวิชาการได้รายงานว่าการตรวจระดับแอนติบอดีต่อโปรตีน N มีความไวกว่าการตรวจต่อโปรตีนหนามหรือ spike glycoprotein³²⁻³³ อย่างไรก็ตาม วัคซีนต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นมาโดยอาศัยส่วนที่เป็นโปรตีน spike ดังนั้น ในการตรวจระดับแอนติบอดีทั้งชนิด IgM และ IgG จะมีประโยชน์อย่างมากในการแยกระหว่างภูมิคุ้มกันที่พบนั้นมาจากการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือมาจากการฉีดวัคซีน³⁴⁻³⁵

ในการศึกษาค่าครึ่งชีวิตของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ในแต่ละการศึกษาแต่ละที่นั้น มีความหลากหลาย โดยผลการศึกษาที่ได้ขึ้นอยู่กับอายุ เชื้อชาติ และความรุนแรงของโรค^{29,36} โดยทั่วไป

จะตรวจพบการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน spike และ โปรตีน nucleocapsid ได้ภายใน 1–3 สัปดาห์ หลังจากผู้ป่วยติดเชื้อ³⁷⁻³⁸ มีรายงานการศึกษาช่วงระยะเวลาในการตรวจพบภูมิคุ้มกันชนิด IgM ได้เร็วที่สุด 3-6 วันหลังจากเริ่มมีอาการ ขณะที่ตรวจพบภูมิคุ้มกันชนิด IgG ได้หลังจากวันที่ 8³⁹ นอกจากนี้ มีการศึกษาความสัมพันธ์ kinetics ของระดับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันและความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 พบว่า ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงของโรคมักจะมีระดับแอนติบอดีชนิด IgG ที่สูง⁴⁰ ในการศึกษาในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำ พบว่าผู้ป่วยที่มีการกลับมาติดเชื้อซ้ำภายใน 1 ปีหลังจากการติดเชื้อครั้งแรกมีจำนวนไม่มาก อาจเป็นมาจากการป้องกันของระบบภูมิคุ้มกันเนื่องมาจากการติดเชื้อทางธรรมชาติ⁴¹

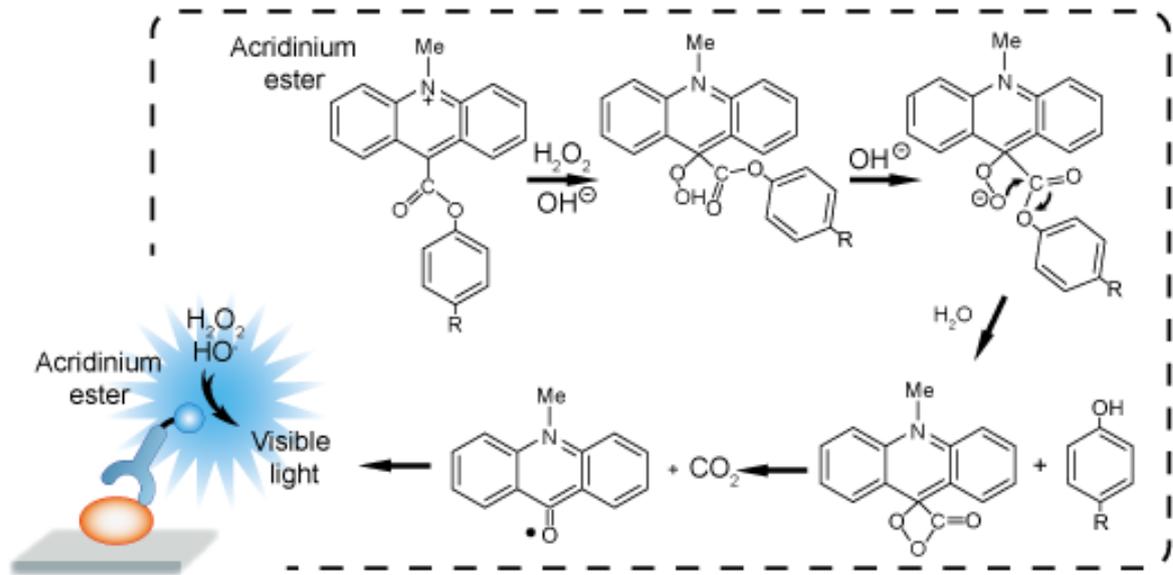
การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM ของผู้ป่วย COVID-19 ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ในงานวิจัยนี้เป็นวิธีการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี chemiluminescent microparticle immunoassay หรือ CMIA (Abbott Laboratory, Illinois, USA) เป็นการวัดเชิงคุณภาพ หลักการของวิธีนี้คือ เป็นการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีชนิด IgM ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยกับแอนติเจนของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ถูกออกแบบเคลือบอยู่กับ paramagnetic microparticle เป็น solid phase เมื่อผสมตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยลงไป แอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 จะเข้าจับกับแอนติเจนของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่เคลือบอยู่บน microparticle จากนั้นสารละลายผสมดังกล่าวถูกนำไปล้าง เพื่อล้างแอนติเจนและแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกไป จากนั้น complex ที่เกิดขึ้นดังกล่าวก็จะทำปฏิกิริยากับ conjugate ที่ติดฉลากด้วยสาร acridinium เมื่อเติมน้ำยาที่กระตุ้นหรือเร่งให้สาร acridinium เปล่งแสงออกมา เครื่องก็จะทำการวัดปริมาณแสงที่ได้ซึ่งสัมพันธ์กับแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 (ภาพที่ 6) น้ำยานี้สามารถวัด IgM ต่อส่วนของ spike protein ถ้าตัวอย่างมีระดับ $IgM \geq 1.0$ sample/cut off (index S/C) หมายความว่าตัวอย่างนั้นพบ IgM ต่อ spike protein ของไวรัส แต่ถ้าตัวอย่างมีระดับ $IgM < 1.0$ index S/C หมายความว่าตัวอย่างนั้นให้ผลลบต่อ spike protein ของไวรัส

ในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี CMIA เช่นเดียวกัน (Abbott Laboratory, Illinois, USA) ซึ่งวิธีนี้จะใช้เป็นโปรตีนส่วน receptor binding domain (RBD) ของโปรตีนหนาม (spike protein) เป็นการวัดเชิงปริมาณ น้ำยานี้สามารถวัดระดับ IgG ต่อส่วน RBD protein ได้ตั้งแต่ 50.0 AU/ml ขึ้นไป และปริมาณที่มากที่สุดที่น้ำยาจะสามารถวัด IgG ได้คือ 25,000 AU/ml ถ้ามีระดับ IgG ต่อส่วนของ RBD protein < 50.0 AU/ml หมายความว่าตัวอย่างนั้นไม่พบ IgG ต่อส่วนของ RBD protein ในกรณีที่มีภูมิคุ้มกันสูงมากกว่า 25,000 AU/ml จะทำการเจือจางเป็น 1:2 เพื่อวัดปริมาณที่แท้จริงของภูมิคุ้มกันตามคำแนะนำของทางบริษัท การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันนี้บอกได้ว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อในอดีตหรือเพิ่งมีการติดเชื้อ และสามารถบอกได้ถึงความชุกของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ของประชากรไทย มีรายงานการศึกษาจำนวนมากพบว่าการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย COVID-19 ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธีเดียวกันนี้ พบว่าช่วงระยะเวลาที่ผู้ป่วยเริ่มมีการสร้างภูมิคุ้มกัน คือ ในช่วง 2-3 วันหลังจากติดเชื้อไปจนถึง 2-3 สัปดาห์หลังจากติดเชื้อ และพบว่าช่วงระยะเวลาที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันได้สูงที่สุดเป็นช่วงที่มีการตรวจวัดระดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ลดน้อยลง⁴²⁻⁴⁵



ภาพที่ 6 การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี chemiluminescent microsphere immunoassay หรือ CMIA ดัดแปลงภาพจาก⁴⁶

หลักการโดยทั่วไปของ chemiluminescence immunoassay (CLIA) เป็นวิธีการที่อาศัยเทคนิคการเปล่งแสงเนื่องมาจากปฏิกิริยาทางเคมี (chemiluminescence) ร่วมกันกับการเกิดปฏิกิริยาทางระบบภูมิคุ้มกัน กลไกการเปล่งคลื่นแสงของสารเคมีที่ใช้คือ acridinium ester ที่นำมาใช้ในการติดตามในวิธี CMIA แสดงดังภาพที่ 7 ในการเกิดการเปล่งแสงของสาร acridinium ester นั้นจะเกิดขึ้นจากการออกซิเดชันในสารประกอบแอลคาไลน์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมีสารละลายประเภทต่าง ๆ เป็นตัวทำละลาย เมื่อสาร acridinium ester ได้รับพลังงานจากปฏิกิริยาเคมีจากการเข้าจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะทำให้อยู่ในสถานะเร้า (excited state) โมเลกุลในสถานะเร้าจะสามารถปล่อยแสงโดยที่ตัวมันเองสูญเสียพลังงานลงสู่สถานะปกติ หรืออาจจะส่งผ่านพลังงานไปยังโมเลกุลอื่น นอกจากนี้สารเคมีตัวอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในการนำมาใช้ทาง chemiluminescence ที่สำคัญ ได้แก่ luminal และ AMPPD เป็นต้น⁴⁷



ภาพที่ 7 กลไกการเปล่งคลื่นแสงของสาร acridinium ester⁴⁷

วิธีการศึกษา

รูปแบบการวิจัย (research design)

การศึกษาเชิงพรรณนาไปข้างหน้า (prospective descriptive study)

ประชากรศึกษา

ผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 และเข้ารับการรักษา ณ หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ (โรงพยาบาลนารายณ์) ภายใต้การกำกับของโรงพยาบาลเลิดสิน

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมการศึกษา (inclusion criteria)

1. มีสัญชาติไทย
2. อายุ 18–60 ปี
3. เป็นผู้ป่วย COVID-19 ที่ไม่มีอาการหรืออาการแสดง
4. เป็นผู้ป่วย COVID-19 ที่มีอาการไม่รุนแรง เช่น มีไข้หรือวัดอุณหภูมิร่างกายได้ตั้งแต่ 37.5 องศาเซลเซียสขึ้นไป และ/หรือ มีอาการของระบบทางเดินหายใจอย่างน้อยหนึ่งอาการ ดังต่อไปนี้ ไอ มีน้ำมูก เจ็บคอ ไม่ได้กลิ่น ลิ้นไม่รับรส หายใจเร็ว หายใจเหนื่อย หรือหายใจลำบาก
5. มีผลภาพถ่ายรังสีปอดปกติ
6. สนใจเข้าร่วมการคัดกรองและยินยอมเข้าร่วมวิจัย

เกณฑ์การคัดเลือกรอกจากการศึกษา (exclusion criteria)

1. เป็นโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) และ/หรือ โรคปอดเรื้อรังอื่น ๆ
2. เป็นโรคไตเรื้อรัง (CKD)
3. เป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด และ/หรือ โรคหัวใจแต่กำเนิด
4. เป็นโรคหลอดเลือดสมอง
5. เป็นโรคเบาหวานที่ควบคุมไม่ได้
6. เป็นโรคตับแข็ง
7. มีภาวะอ้วน (BMI \geq 35 กก./ตร.ม.)
8. มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ
9. มีค่า lymphocyte น้อยกว่า 1,000 เซลล์/ลบ.มม.

เกณฑ์การยุติการเข้าร่วมการวิจัยของอาสาสมัคร (discontinuation criteria)

1. อาสาสมัครขอถอนความยินยอมการเข้าร่วมการวิจัย
2. มีการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีอาการ เป็นมีอาการไม่รุนแรง ในระยะเวลาระหว่างการเข้าร่วมศึกษา 10 วัน
3. มีการเปลี่ยนแปลงจากมีอาการไม่รุนแรง เป็นมีอาการที่รุนแรงมากขึ้น ในระยะเวลาระหว่างการเข้าร่วมศึกษา 10 วัน

การกำหนดขนาดตัวอย่าง

จากข้อมูลเบื้องต้นของโครงการตรวจยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 ด้วยวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) ของกรมการแพทย์ เมื่อพิจารณาจากความชุกของผู้ป่วยที่มีผล RT-PCR เป็นบวกในระยะเวลาที่เริ่ม

มีอาการ (onset time) ระหว่าง 7-14 วัน พบว่ามีผู้ป่วยที่มีผล RT-PCR เป็นบวก จำนวน 2 ราย จากทั้งหมด 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.6 ผู้วิจัยกำหนดค่าความคลาดเคลื่อนที่ร้อยละ 10 ของค่าสัดส่วนประชากร (proportion, p) คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้สูตร infinite population proportion ดังนี้

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}$$

กำหนด $\alpha = 0.05$, $Z_{\alpha/2} = 1.96$

$p = 0.666$

$1-p = 0.5$

$d = 0.10$ (กำหนดที่ร้อยละ 10 ของค่า p)

คำนวณขนาดตัวอย่างได้ 86 ราย ทั้งนี้กำหนด drop out ร้อยละ 5 ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยเท่ากับ 90 ราย

การสุ่มตัวอย่าง

ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างโดยการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling)

ระยะเวลาดำเนินการ

10 เดือน (มีนาคม - ธันวาคม 2564)

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ผู้ป่วยที่มีอาการเปลี่ยนแปลงก่อน 10 วัน จะยุติการเข้าร่วมโครงการวิจัย และจะมีการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยจนครบตามจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่กำหนดไว้
2. ผู้ป่วยที่มีผลการเพาะเชื้อ และ/หรือ RT-PCR ที่ไม่สามารถสรุปผลได้ในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย จะได้รับการเก็บส่งตรวจอีกครั้งในวันที่ 10
3. ผู้ป่วยมีผลการเพาะเชื้อ และ/หรือ RT-PCR เป็นบวกหรือไม่สามารถสรุปผลได้ในวันที่ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ผู้ป่วยจะได้รับการดูแลรักษาตามแนวทางเวชปฏิบัติการวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยจะนำข้อมูลที่ได้อามาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อไป

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ประชุมทีมวิจัยร่วมกับผู้รับผิดชอบจากแต่ละหน่วยงานของกรมการแพทย์ เพื่อกำหนดขอบเขตและรายละเอียดการดำเนินการ
2. สร้างเครื่องมือในการเก็บข้อมูล
3. ตรวจสอบคุณภาพของเครื่องมือเก็บข้อมูลโดยผู้เชี่ยวชาญ
4. ขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย กรมการแพทย์ โดยได้รับการอนุมัติโครงการลำดับที่ 1/2563 วันที่ 1 กรกฎาคม 2564
5. ขออนุญาตเก็บข้อมูลในพื้นที่เป้าหมาย
6. คัดเลือกอาสาสมัครจากผู้ป่วย COVID-19 ที่เข้ารับการรักษา และอธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจและยินยอมเข้าร่วมการวิจัยด้วยความสมัครใจ

7. เก็บสิ่งส่งตรวจจากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ จำนวน 2 ครั้ง ดังนี้
 - ครั้งที่ 1 วันที่ 7 หลังได้รับการวินิจฉัย
 - ครั้งที่ 2 วันที่ 10 หลังได้รับการวินิจฉัย
 โดยตรวจติดตามการติดเชื้อ COVID-19 จำนวน 4 วิธี ได้แก่
 - 1) วิธี RT-PCR โดยใช้สารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกและคอ
 - 2) วิธี subgenomic RNA โดยใช้สารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกและคอ
 - 3) วิธี viral culture โดยใช้สารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกและคอ
 - 4) วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ ประมาณ 5 มิลลิลิตร
8. ตรวจสอบข้อมูล และวิเคราะห์ผล
9. จัดทำรายงานการศึกษา

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

แบบเก็บข้อมูลโครงการวิจัยอัตราการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2 ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยในผู้ป่วย COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคร่วม

การรวบรวมข้อมูล

1. ข้อมูลส่วนบุคคลและข้อมูลประวัติสุขภาพ เช่น เพศ อายุ วันที่เริ่มมีอาการ การวินิจฉัยระดับความรุนแรงของโรค COVID-19 และประวัติการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เป็นต้น เก็บข้อมูลจากบันทึกเวชระเบียน
2. สิ่งส่งตรวจ ได้แก่ สารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ และเลือดจากเส้นเลือดดำ (clotted blood) เก็บในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้
 - การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี subgenomic RNA จากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ และการตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG ด้วยวิธี ELISA โดยใช้เลือดจากเส้นเลือดดำ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 - การเพาะเชื้อไวรัส และการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR จากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ ตรวจวิเคราะห์โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ข้อมูลทั่วไปวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive data) นำเสนอด้วยร้อยละ ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
2. ความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่เชื้อ การตรวจพบเชื้อ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 และระหว่างวิธีการเพาะเชื้อกับวิธี subgenomic RNA วิเคราะห์ด้วยสถิติ McNemar test โดยการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นจะมีการคำนวณค่า geometric mean titer (GMT) และความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% confidence interval) สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์จะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับไคเตอร์ในวันที่ 7 และ 10 โดยวิธี Wilcoxon matched-pairs signed rank test แบบจับคู่ที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับ .05 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ GraphPad เวอร์ชัน 9.02 (<https://www.graphpad.com>)

ผลการศึกษา

การศึกษาอัตราการแพร่เชื้อ SARS-CoV-2 ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยในผู้ป่วย COVID-19 ที่ไม่มีอาการ และมีอาการไม่รุนแรงที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคร่วม โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่เชื้อ การตรวจพบเชื้อ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ผู้ป่วยที่สมัครใจเข้าร่วมการศึกษามีจำนวน 90 ราย โดยผู้ป่วยจำนวน 2 ราย ได้รับการคัดออกเนื่องจากหลัง 7 วัน ผู้ป่วยมีอาการหอบเหนื่อยและส่งต่อไปรับการรักษาที่โรงพยาบาล ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยในการศึกษามีจำนวนทั้งสิ้น 88 ราย ผลการศึกษามีดังนี้

1. ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่มีผลยืนยันว่าติดเชื้อ COVID-19

ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศหญิงร้อยละ 64.4 (58/30) อายุเฉลี่ย 37.1 ± 12.3 ปี และดัชนีมวลกาย (BMI) เฉลี่ย 23.1 ± 3.5 ส่วนใหญ่มีค่าปกติ (18.5–22.9) ร้อยละ 38.6 (34/88) รองลงมา มีภาวะอ้วนระดับ 1 (25.0–29.9) น้ำหนักเกิน (23.0–24.9) และน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์ (น้อยกว่า 18.5) ร้อยละ 29.6 (26/88), 19.3 (17/88) และ 11.4 (10/88) ตามลำดับ อาสาสมัคร 1 คนที่มีภาวะอ้วนระดับ 2 (BMI ≥ 30) มีผู้ป่วยจำนวน 22 รายที่มีโรคประจำตัว ส่วนใหญ่เป็นโรคความดันโลหิตสูงจำนวน 7 ราย รองลงมาคือ โรคภูมิแพ้จำนวน 4 ราย หอบหืดจำนวน 2 ราย อีก 9 รายเป็นโรคอื่น ๆ ได้แก่ ธาลัสซีเมีย เก๊าท์ ข้อเข่าเสื่อม ตับอักเสบ เป็นต้น แบ่งประเภทผู้ป่วยตามอาการ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มมีอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) ร้อยละ 65.9 (58/88) กลุ่มไม่มีอาการ (asymptomatic) ร้อยละ 34.1 (30/88) โดยกลุ่มมีอาการไม่รุนแรงส่วนใหญ่มีอาการ ไอ รองลงมา มีไข้ และเจ็บคอ ร้อยละ 58.6 (34/58), 34.5 (20/58) และ 25.9 (15/58) ตามลำดับ ผลจากภาพถ่ายรังสีทรวงอกครั้งแรกพบว่าส่วนใหญ่มีผลปกติ ร้อยละ 87.5 (77/88) มีภาวะปอดอักเสบ (pneumonia) ร้อยละ 12.5 (11/88) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยที่มีผลยืนยันว่าติดเชื้อ COVID-19 (n = 88)

| ลักษณะทั่วไป | จำนวน (ร้อยละ) |
|--|-----------------|
| เพศ | |
| ชาย | 30 (33.3) |
| หญิง | 58 (64.4) |
| อายุ, mean \pm SD | 37.1 ± 12.3 |
| ดัชนีมวลกาย, mean \pm SD | 23.1 ± 3.5 |
| < 18.5 (น้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์) | 10 (11.4) |
| 18.5 – 22.9 (ปกติ) | 34 (38.6) |
| 23.0 – 24.9 (น้ำหนักเกิน) | 17 (19.3) |
| 25.0 – 29.9 (อ้วนระดับ 1) | 26 (29.6) |
| ≥ 30 (อ้วนระดับ 2) | 1 (1.1) |

| ลักษณะทั่วไป | จำนวน (ร้อยละ) |
|---|------------------|
| โรคประจำตัว | 22 (25) |
| ความดันโลหิตสูง | 7 |
| ภูมิแพ้ | 4 |
| หอบหืด | 2 |
| อื่น ๆ | 9 |
| อาการและอาการแสดง | 58 (65.9) |
| ไอ | 34 |
| ไข้ | 20 |
| เจ็บคอ | 15 |
| ปวดศีรษะ | 10 |
| มีน้ำมูก | 9 |
| ไม่ได้กลิ่น | 7 |
| หายใจเหนื่อย | 6 |
| ลิ้นไม่รับรส | 6 |
| ถ่ายเหลว | 4 |
| ผลตรวจภาพถ่ายรังสีทรวงอกครั้งแรก | |
| ปกติ | 77 (87.5) |
| มีภาวะปอดอักเสบ (pneumonia) | 11 (12.5) |

2. ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี real-time RT-PCR (rRT-PCR), การเพาะเลี้ยงเชื้อ (virus isolation), subgenomic RNA และเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ และตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย COVID-19 ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ได้ผลดังนี้

2.1 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR (rRT-PCR)

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี rRT-PCR พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจพบเชื้อในวันที่ 7 และ 10 คิดเป็นร้อยละ 82.9 (73/88) 95%CI 75.1, 90.8 และ 81.8 (72/88) 95%CI 73.8, 89.9 ตามลำดับ เมื่อจำแนกตามสถานะอาการ พบว่ากลุ่มไม่มีอาการตรวจพบเชื้อในวันที่ 7 และ 10 คิดเป็นร้อยละ 76.7 (23/30) และ 73.3 (22/30) ตามลำดับ ส่วนการตรวจพบเชื้อของกลุ่มมีอาการไม่รุนแรง ในวันที่ 7 และ 10 ไม่เปลี่ยนแปลงคิดเป็นร้อยละ 86.2 (50/58) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR จำแนกตามสถานะอาการ (n=88)

| Status | RT-PCR (day7) | | RT-PCR (day 10) | |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Detected | Not detected | Detected | Not detected |
| Asymptomatic (n=30) | 23 (76.7%) | 7 (23.3%) | 22 (73.3%) | 8 (26.7%) |
| Mild Symptomatic (n=58) | 50 (86.2%) | 8 (13.8%) | 50 (86.2%) | 8 (13.8%) |
| Total | 73 (82.9%) | 15 (17.1%) | 72 (81.8%) | 16 (18.2%) |

2.2 การเพิ่มจำนวนไวรัสด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (virus isolation)

ผลการเพิ่มจำนวนไวรัสด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าในวันที่ 7 ผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจไม่พบเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 98.9 (87/88) ส่วนในวันที่ 10 ไม่พบเชื้อไวรัสในผู้ป่วยทุกราย (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (n=88)

| | Detected | Not Detected |
|--------|----------|--------------|
| Day 7 | 1 (1.1%) | 87 (98.9%) |
| Day 10 | 0 (0%) | 88 (100%) |

2.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA)

ผลการตรวจหาสายพันธุ์เชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ด้วยวิธี subgenomic RNA พบว่าส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์อังกฤษ หรือ alpha (B.1.1.7) ร้อยละ 53.4 (47/88) สายพันธุ์อินเดีย หรือ delta ร้อยละ 11.4 (10/88) และไม่ใช่ทั้งสายพันธุ์ alpha และ delta ร้อยละ 35.2 (31/88) โดยที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ alpha และที่ตรวจไม่พบเชื้อส่วนใหญ่ไม่ใช่ทั้งสายพันธุ์ alpha และ delta (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 สายพันธุ์เชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ที่ตรวจด้วยวิธี subgenomic ในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย (n = 88)

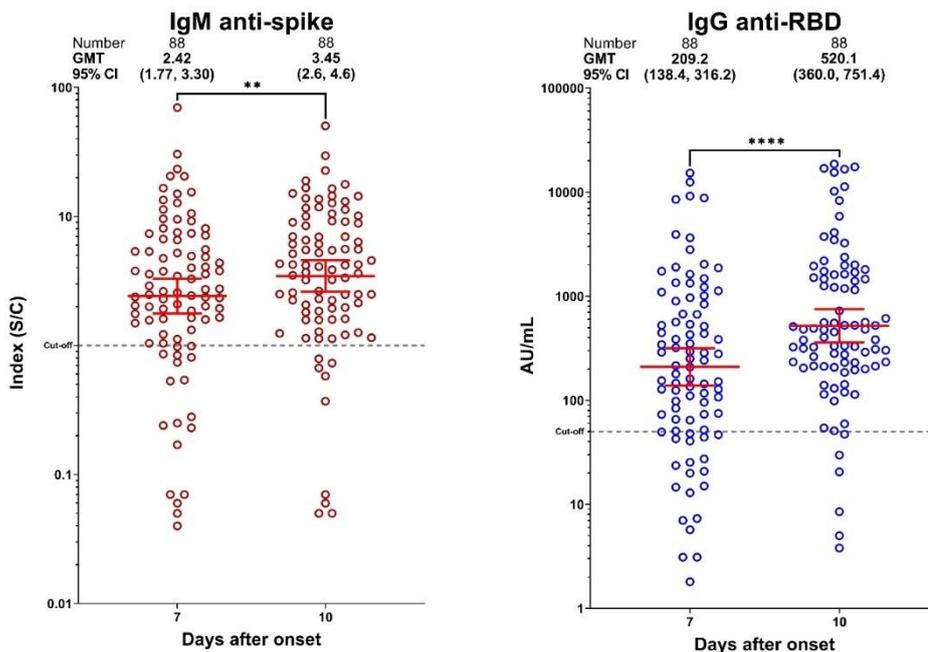
| Subgenomic Result | Species | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Alpha (B.1.1.7) | Delta | Non alpha & Delta |
| Detected | 24 | 3 | 0 |
| Not detected | 23 | 7 | 31 |
| Total | 47 (53.4%) | 10 (11.4%) | 31 (35.2%) |

2.4 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

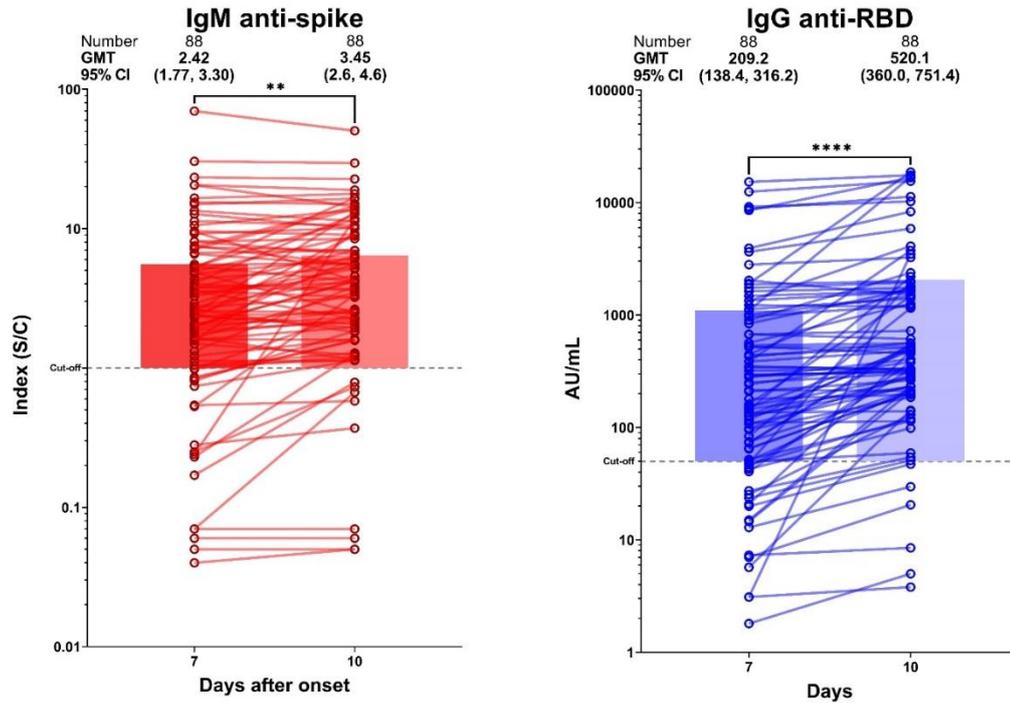
ระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2

การศึกษานี้ได้วัดระดับภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโปรตีนหนาม (anti-spike IgM และ anti-receptor binding domain; anti-RBD IgG) โดยวิธี chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA; Abbott Laboratories, Ltd.) กลุ่มประชากรจำนวน 88 ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจซีรัมในวันที่ 7 และวันที่ 10

ผลการศึกษาระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย พบว่าจากผลการตรวจหา ระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-spike IgM จากผู้ป่วย COVID-19 พบว่าค่าไตเตอร์ (geometric mean titer; GMT) ของผู้ป่วยในวันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 2.42 ขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วยช่วงวันที่ 10 พบค่าไตเตอร์สูงกว่าในช่วงวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 3.45 ($p < .001$) (ภาพที่ 8 และ 9) นอกจากนี้ พบว่าผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 10 มีระดับ anti-RBD IgG ขึ้นสูงกว่าในช่วงวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .0001$) โดยมีค่าไตเตอร์ เท่ากับ 520.1 และ 209.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 8) โดยระดับ anti-RBD IgG ผู้ป่วยในช่วงวันที่ 7 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,099 BAU/mL ผู้ป่วยในช่วงวันที่ 10 มีระดับค่าเฉลี่ย 2,059 BAU/mL (ภาพที่ 10) จากตัวอย่างซีรัม 88 ตัวอย่างใน 90 ตัวอย่างที่มีครบทั้ง 2 ช่วงเวลาคือวันที่ 7 และวันที่ 10 เมื่อนำมาสร้างกราฟเพื่อแสดงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในแต่ละรายบุคคล พบว่า ระดับภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิด IgM และ IgG มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 (ภาพที่ 11)

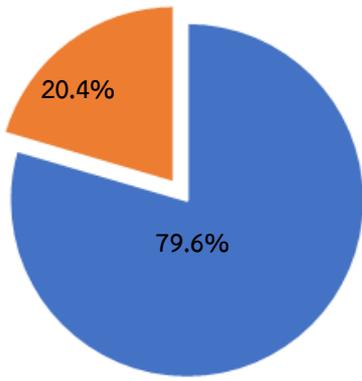


ภาพที่ 8 ระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย (** $p < .001$ และ **** $p < .0001$)



ภาพที่ 9 ระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยแต่ละรายบุคคลที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย (** $p < .001$ และ **** $p < .0001$)

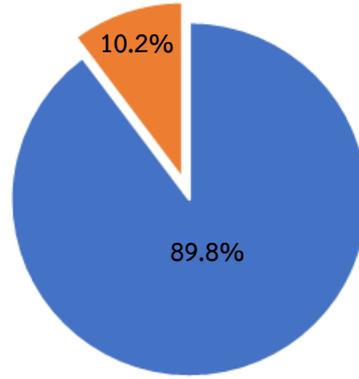
รูปแบบของอัตรา seroconversion ทั้งระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 10 และ 11) พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง มีระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG ในวันที่ 7 พบว่า มีอัตรา seropositive เท่ากับร้อยละ 79.6 และ 77.3 ตามลำดับ ขณะที่ในวันที่ 10 อัตรา seropositive เพิ่มมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 89.8 และ 93.2 ตามลำดับ กล่าวโดยสรุป เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าในวันที่ 7



IgM day 7

Median = 2.60

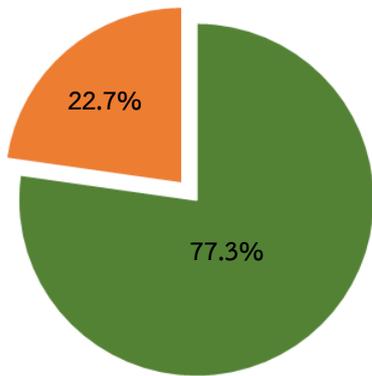
Average = 5.53, SD = 8.95



IgG day 10

Median = 4.14

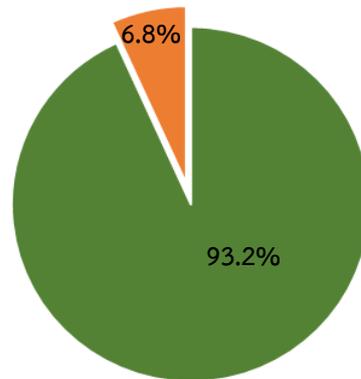
Average = 6.43, SD = 7.41



IgG day 7

Median = 212.15

Average = 1,099.39, SD = 2,599.04



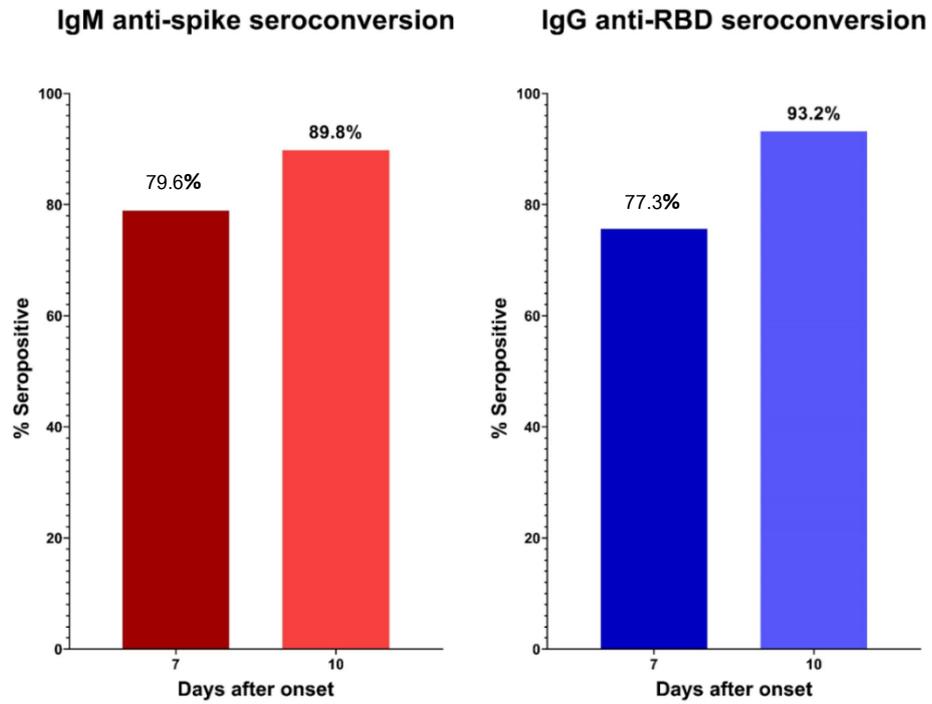
IgG day 10

Median = 464.5

Average = 2,058.61, SD = 4,196.34

หมายเหตุ: ■, ■ = Positive และ ■ = Negative

ภาพที่ 10 สัดส่วนของแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย



ภาพที่ 11 การตรวจพบภูมิต้านทาน (seropositive) ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR, subgenomic และ virus isolation ของผู้ป่วยในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย พบว่าการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ผู้ป่วยมีผล detected มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 80.4 (45/88) ในขณะที่วิธีการเพาะเชื้อไวรัสผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจไม่พบเชื้อคิดเป็นร้อยละ 98.9 (87/88) (ตารางที่ 5) การเปรียบเทียบระยะเวลาที่มีอาการจนถึงการตรวจพบเชื้อ COVID-19 ครั้งแรกกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR และ subgenomic ในผู้ป่วยจำนวน 88 ราย พบว่าที่ 7 วันผู้ป่วยที่ตรวจด้วย RT-PCR จะได้ผล detected มากกว่าวิธีตรวจ subgenomic คิดเป็นร้อยละ 82.9 (73/88) และ 30.7 (27/88) ตามลำดับ โดย RT-PCR ส่วนใหญ่ได้ผล detected ในกลุ่มไม่มีอาการ ส่วน subgenomic ส่วนใหญ่ตรวจไม่พบเชื้อในกลุ่มไม่มีอาการ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR, subgenomic และ virus isolation ของผู้ป่วยในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย (n=88)

| Lab | Detected | Not Detected |
|-----------------|------------|--------------|
| RT-PCR | 45 (80.4%) | 11 (19.64%) |
| Subgenomic | 14 (25%) | 42 (75%) |
| Virus isolation | 1 (1.14%) | 87 (98.9%) |

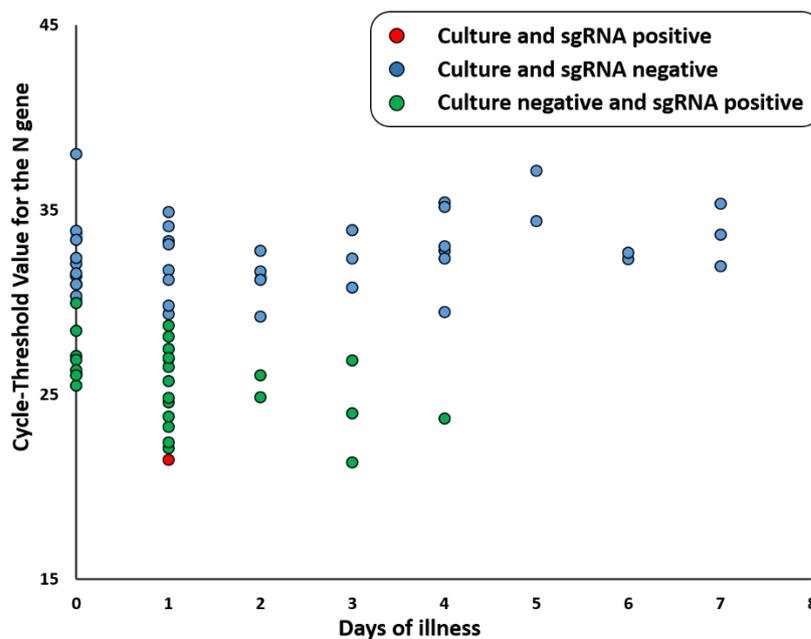
ตารางที่ 6 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี RT-PCR และ subgenomic ของผู้ป่วยในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย จำแนกตามระยะเวลาที่เริ่มมีอาการ (n = 88)

| Symptom duration (day) | RT-PCR | | Subgenomic | | n |
|------------------------|------------|--------------|------------|--------------|----|
| | Detected | Not detected | Detected | Not detected | |
| 0 | 36 | 9 | 15 | 30 | 45 |
| 1-3 | 25 | 4 | 12 | 17 | 29 |
| 4-7 | 12 | 0 | 0 | 12 | 12 |
| 8-10 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| Total | 73 (82.9%) | 15 (17.1%) | 27 (30.7%) | 61 (69.3%) | 88 |

2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (virus isolation) กับการตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

การวิเคราะห์ตรวจหา subgenomic RNA นั้นเป็นหลักฐานที่ใช้บ่งบอกถึงว่าสารพันธุกรรมที่ตรวจพบนั้นเป็นตัวกลางที่บอกได้ว่าไวรัสกำลังอยู่ในขั้นของการเพิ่มจำนวนตัวเอง จากผลงานวิจัยนี้ในจำนวน 88 ตัวอย่าง พบว่ามี 73 ตัวอย่าง (73/88) ที่ให้ผลตรวจเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เมื่อตรวจโดยวิธี rRT-PCR ทั้งสองยีน ได้แก่ ยีน nucleocapsid (N) และ RNA dependent RNA polymerase (RdRp)

ช่วงระยะเวลาที่เริ่มทำการเก็บตัวอย่างคือวันที่ 0 จนถึงวันที่ 10 นับจากวันที่เริ่มแสดงอาการ จากจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 73 ตัวอย่าง ได้นำมาตรวจหา subgenomic RNA ในส่วนของ E gene โดยวิธี real-time RT-PCR (rRT-PCR) และนำมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งการตรวจ subgenomic RNA และการเพาะเลี้ยงเชื้อมีจำนวน 1 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ถูกเก็บในวันที่ 1 หลังจากผู้ป่วยเริ่มมีอาการและมีค่า cycle threshold ของยีน N เท่ากับ 21.5 ตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งการตรวจ subgenomic RNA และการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีจำนวน 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 63.0 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการตรวจ subgenomic RNA แต่ให้ผลลบในการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีจำนวน 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 35.6 และไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ให้ผลลบในการตรวจ subgenomic RNA จากผลการวิจัยนี้ พบว่า การตรวจ subgenomic RNA จะให้ผลเป็นบวกในตัวอย่างที่มีค่า cycle threshold ของยีน N น้อยกว่าหรือเท่ากับ 31.0 (ภาพที่ 12)



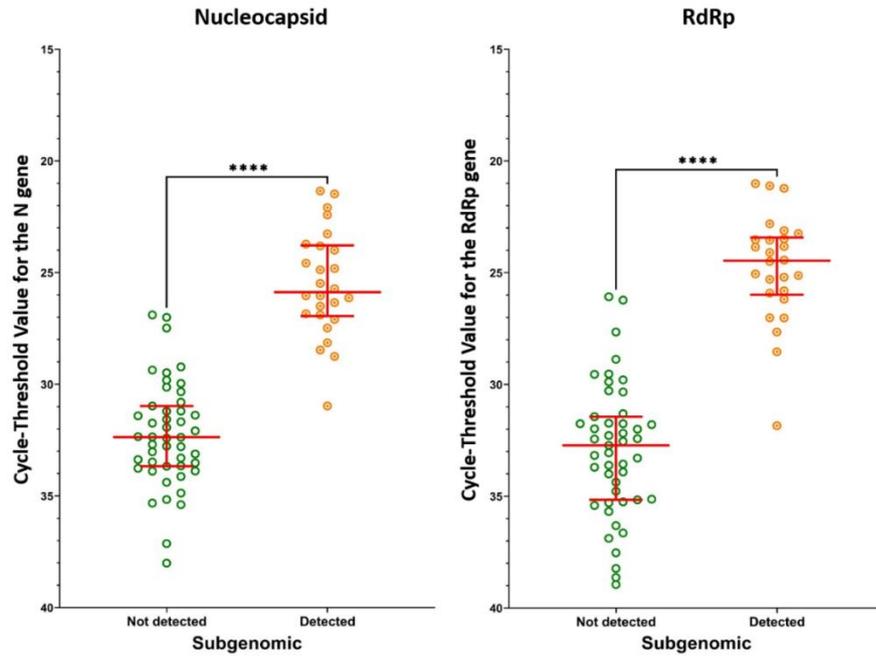
ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ของยีน nucleocapsid, การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (virus culture) และการตรวจหา subgenomic RNA โดยเปรียบเทียบกับช่วงวันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

จากผลการตรวจ subgenomic RNA พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการให้ผลบวกในการตรวจ subgenomic RNA คิดเป็นร้อยละ 26.7 (8/30) ตัวอย่างที่ถูกเก็บในวันที่ ≤ 3 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ให้ผลบวกในการตรวจ subgenomic RNA มีจำนวน 18 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 42 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.9) และ ตัวอย่างที่ถูกเก็บในวันที่ ≥ 4 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ให้ผลบวกในการตรวจ subgenomic RNA คิดเป็น ร้อยละ 6.3 (1/16) (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง 73 ตัวอย่าง มาทำการตรวจเพื่อทำ การคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี rRT-PCR ในส่วนของยีน spike (S) พบว่า สายพันธุ์หลักที่เป็นสาเหตุของโรค COVID-19 ในช่วงระยะเวลาของการศึกษาวิจัยนี้ คือ สายพันธุ์แอลฟาคิดเป็นร้อยละ 64.4 (47/73) สายพันธุ์เดลต้าคิดเป็นร้อยละ 13.7 (10/73) และสายพันธุ์อื่น ๆ คิดเป็นร้อยละ 21.9 (16/73)

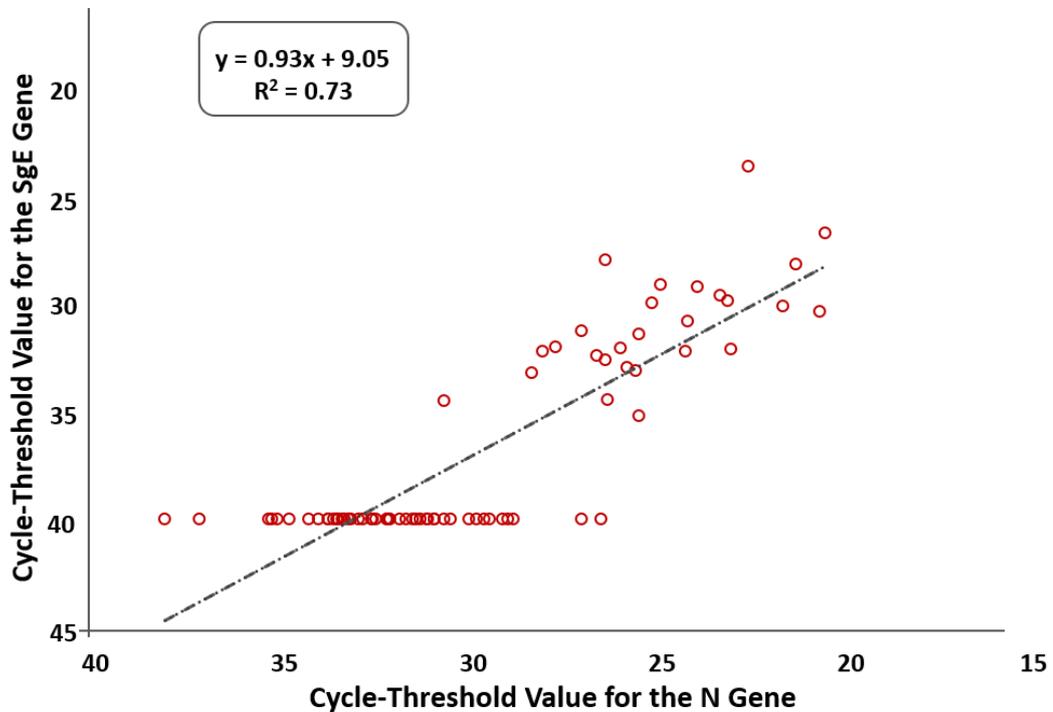
ตารางที่ 7 ผลการแยกเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 การตรวจ rRT-PCR และการตรวจ subgenomic RNA ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง

| | Days after onset of illness, (no. positive/ no. tested) | | | |
|--------------------|---|-------|-------|------|
| | Asymptomatic | 1-3 | 4-7 | 8-10 |
| การเพาะเลี้ยงเชื้อ | 0/30 | 1/42 | 0/14 | 0/2 |
| rRT-PCR | 23/30 | 36/42 | 14/14 | 0/2 |
| subgenomic RNA | 8/30 | 18/42 | 1/14 | 0/2 |

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์จะทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle-threshold (Ct) ของ subgenomic RNA และปริมาณ RNA ทั้งหมดที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี linear regression จากผล การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง subgenomic RNA และปริมาณ RNA ทั้งหมดที่ตรวจพบในแต่ละ ตัวอย่าง (ภาพที่ 13) พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบ subgenomic RNA จะมีค่า Ct ที่ต่ำกว่ากลุ่มตัวอย่าง ที่ตรวจไม่พบ subgenomic RNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (mean Ct 25.5 ± 2.4 vs mean Ct 32.4 ± 2.2 ; $p < .0001$) กลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบ subgenomic RNA จำนวน 25 ตัวอย่างจากทั้งหมด 26 ตัวอย่าง พบว่า ค่า Ct ของยีน N และ RdRp มีค่าน้อยกว่า 30 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ subgenomic RNA คิดเป็นร้อยละ 83.0 (39/47) พบมีค่า Ct ของยีน N และ RdRp มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 30 ($p < .0001$) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพหรือความไวในการตรวจวัด subgenomic RNA ด้วยวิธี rRT-PCR มีค่า ที่น้อยกว่าการตรวจวัดยีน N ด้วยวิธีเดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ของทั้ง subgenomic RNA และ ค่า Ct ของยีน N พบว่า ค่า Ct ทั้งสองให้ความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างกัน ($R^2 = 0.73$) (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct ที่ได้จากการตรวจหาปริมาณ RNA ทั้งหมดจากยีน N และ RdRp จากตัวอย่างผู้ป่วย เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบและตรวจไม่พบ subgenomic RNA



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle-threshold (Ct) ที่ได้จากการตรวจตัวอย่างด้วยวิธี real-time RT-PCR ในบริเวณยีน nucleocapsid และค่า Ct ที่ได้จากการตรวจหา subgenomic E gene

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 โดยพิจารณาระดับภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนหนาม (anti-spike IgM และ anti-RBD IgG) ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย พบว่าร้อยละ 79.6 และ 77.3 ในกลุ่มผู้ป่วยวันที่ 7 มีระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-spike IgM และ anti-RBD IgG ให้ผลเป็นบวก (seropositive) ตามลำดับ และพบว่าระดับภูมิคุ้มกัน anti-spike IgM และ anti-RBD IgG ให้ผลเป็นบวกเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 10 คิดเป็น 89.8 และ 93.2 ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ พบว่าหลังจากที่ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสก่อโรค COVID-19 ในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ผู้ป่วยมีระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-RBD IgG โดยเฉลี่ย 1,099 BAU/mL และในวันที่ 10 มีระดับค่าเฉลี่ย 2,059 BAU/mL ซึ่งสูงกว่าระดับภูมิคุ้มกันที่พบในวันที่ 7

ในการศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับรายงานในสาธารณรัฐประชาชนจีน⁴⁸ ศึกษาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสก่อโรค COVID-19 กลุ่มที่มีอาการเล็กน้อย/ กลุ่มที่มีอาการปานกลาง พบว่าระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-spike, -RBD และ -nucleocapsid IgM ขึ้นสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 หลังจาก que ผู้ป่วยเริ่มมีอาการ ขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการรุนแรง/ กลุ่มที่ถูกฉีกรักษา จะมีการระดับภูมิคุ้มกันชนิดเดียวกันนี้เพิ่มสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 หลังจาก que ผู้ป่วยเริ่มมีอาการ นอกจากนี้ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการเล็กน้อย/ กลุ่มที่มีอาการปานกลาง เริ่มตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-spike, -RBD และ -nucleocapsid IgG ในช่วง 2 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นระดับภูมิคุ้มกันชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 3 และมีค่าสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 5 หรือ สัปดาห์ที่ 6 ในปี พ.ศ. 2547 มีรายงานการศึกษาในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส SARS พบว่าเริ่มตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยในช่วงวันที่ 3 – 6 ภายหลังจากผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการ และตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ในวันที่ 8 หลังจากผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการ⁴⁹ ในงานวิจัยนี้ พบว่าระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG มีระดับค่อนข้างสูงในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในช่วงสัปดาห์แรก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานในประเทศจีนและญี่ปุ่น^{48,50-51} ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรง พบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ได้สูงในช่วงอาทิตย์แรกหลังจากที่ได้รับการวินิจฉัยนั้น อาจเป็นเพราะวันที่ได้รับการวินิจฉัยนั้นเกิดขึ้นหลังจากวันที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อแต่ไม่ได้แสดงอาการ

มีรายงานการศึกษาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ก่อนหน้านี้ในกลุ่มประชากรไทยที่หายจากการติดเชื้อและกลุ่มผู้ที่ใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อ รายงานตรวจพบสารพันธุกรรมในผู้ป่วยที่หายจากการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ 6.6 ระยะเวลาสูงสุดที่ยังตรวจพบสารพันธุกรรมคือ 105 วัน โดยมีภูมิคุ้มกันชนิด IgM, IgG และ IgA ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 หลังจาก que ผู้ป่วยหายจากการติดเชื้อมาแล้ว 1-3 เดือน คิดเป็นร้อยละ 13.8, 88.5 และ 83.4 ตามลำดับ กลุ่มผู้ที่ใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อมีภูมิคุ้มกันชนิด IgG คิดเป็นร้อยละ 4.9⁵² ในช่วงที่เริ่มมีการระบาดของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2563 รายงานพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM ลดลงหลังจากสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG และ IgA นั้นยังมีค่าคงที่หลังจากเวลาผ่านไป 2 เดือน⁵³ ในการศึกษาที่เมือง Wanzhou ศึกษาการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยรวบรวม

ข้อมูลจากผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการจำนวน 37 ราย พบว่า ระยะเวลาในการขับเชื้อออกจากร่างกาย (viral shedding) ของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีค่ากลางอยู่ที่ 19 วัน และยาวนานที่สุดถึง 26 วัน ที่ระยะ acute phase ระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการนี้มีค่าน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ร้อยละ 93.3 ของกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ลดลงในช่วงแรกของระยะพักฟื้น (convalescent phase) และร้อยละ 81.1 มีระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเทียม (pseudovirus) ลดลงในช่วงระยะเวลาเดียวกัน²⁹ นอกจากนี้ มีรายงานระยะเวลาในการขับเชื้อออกจากร่างกายจากอีกกลุ่มวิจัยที่ประเทศเดียวกันนี้ พบว่าผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีค่ากลางอยู่ที่ 28 วัน และผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงประมาณ 31 วัน⁵⁴

รายงานการศึกษาจำนวนมากที่กล่าวถึงการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ในผู้ป่วยหลังจากติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เมื่อเวลาผ่านไปและค่าครึ่งชีวิตของระดับภูมิคุ้มกัน เช่น กลุ่มคณะวิจัยที่มณฑล Chongqing ประเทศจีน รายงานระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 6 เดือนแรกหลังจากออกจากโรงพยาบาล และยังคงอยู่อย่างน้อยเป็นเวลาอีก 6 เดือน⁵⁵ กลุ่มคณะวิจัยที่อเมริกาได้ศึกษาอัตราการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ต่อโปรตีน nucleocapsid ในผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 943 ตัวอย่างในช่วงระยะเวลา 7 เดือน พบว่าระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นและค่อย ๆ ลดลงจนระดับคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือน⁵⁶ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าการตอบสนองของระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ต่อโปรตีนหนาม (anti-RBD) มีระดับลดลงเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 90 วัน⁵⁷ อย่างไรก็ตาม จากรายงานระดับภูมิคุ้มกันในเลือดในวันที่ 115 หลังจากเริ่มแสดงอาการ พบว่าค่าครึ่งชีวิตของระดับภูมิคุ้มกันเท่ากับ 49 วันจากจำนวนตัวอย่างผู้ป่วย 647 ตัวอย่าง⁵⁸

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (virus isolation) กับการตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA)

เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่าผู้ที่รักษาหายจากการติดเชื้อ COVID-19 บางรายและมีผลตรวจเชื้อไวรัสเป็นลบ สามารถกลับมาตรวจพบเชื้อไวรัสเป็นบวกได้อีกครั้งโดยที่ไม่มีอาการบ่งชี้แสดงใด ๆ ว่าติดเชื้อใหม่ แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าผู้ป่วยบางรายนั้นกลับมาติดเชื้อใหม่และต้องทำการกักตัวอีกครั้งหรือไม่ ในการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสที่พบนั้นเป็นเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย และสามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังบุคคลอื่น ๆ อีกได้หรือไม่ ดังนั้นในการตรวจหา sgRNA จึงมีส่วนสำคัญที่จะเข้ามาแก้ไขปัญหาเหล่านี้ได้ ในศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (virus isolation) การตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR กับการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ (subgenomic RNA) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

งานวิจัยนี้ได้รายงานพบว่า ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรง ให้ผลการตรวจพบ subgenomic RNA ได้น้อยมากในวันที่ 4 และตรวจไม่พบเลยในวันที่ 5 นับจากวันที่เริ่มมีอาการเป็นต้นไป แต่ยังสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ได้จนถึงในวันที่ 7 นับจากวันที่เริ่มมีอาการ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ตรวจพบ subgenomic RNA ได้จนถึงในวันที่ 5 ในตัวอย่างผู้ป่วยที่

เก็บด้วยวิธีป้ายลำคอ (throat swab)⁵ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ในกลุ่มผู้ป่วยในฮ่องกง ได้รายงานแนวทางช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการกักตัวกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงหรือรุนแรงปานกลาง อยู่ที่อย่างน้อย 8 วันหลังจากที่เริ่มมีอาการ⁵⁹ ขณะที่องค์การอนามัยโลกหรือ WHO ได้ให้แนวทางระยะเวลาในการกักตัวอยู่ที่ 10 วันหลังจากที่เริ่มมีอาการ และในกรณีที่ผู้ป่วยไม่แสดงอาการต้องเพิ่มวันที่กักตัวอีกอย่างน้อยมากกว่าหรือเท่ากับ 3 วัน⁶⁰ มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นจำนวนมากได้แสดงให้เห็นถึงการนำ subgenomic RNA มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบบ routine เพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ยังอยู่ในช่วงเวลาที่เพิ่มจำนวนได้²⁶⁻²⁷ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่ขัดแย้งกับงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าในการตรวจ subgenomic RNA อาจไม่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการแพร่เชื้อของไวรัส SARS-CoV-2 ได้⁶¹

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่ามีเพียงหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในวันที่ 1 นับจากวันที่เริ่มมีอาการ มีค่า Ct ประมาณ 21 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้า พบสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงหรือรุนแรงปานกลางได้สำเร็จในช่วง 9 วันแรกหลังจากที่เริ่มแสดงอาการ^{5,62} จากงานวิจัยนี้พบว่า ตรวจพบ subgenomic RNA ในกลุ่มของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ คิดเป็นร้อยละ 27 มีการศึกษาที่รัฐจอร์เจีย ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจ subgenomic RNA เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยชุดตรวจแอนติเจน พบว่า ยังคงตรวจพบ subgenomic RNA ได้ในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบเมื่อตรวจด้วยชุดตรวจแอนติเจน คิดเป็น 82.1²⁶ นอกจากนี้ จากผลการศึกษาและงานวิจัยก่อนหน้านี้²⁶ ทำให้สรุปได้ว่าพบความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle-threshold ของยีน nucleocapsid กับ ค่า cycle-threshold ของ subgenomic RNA ที่เพิ่มขึ้น

ข้อจำกัดบางประการของการศึกษามีดังนี้ การตรวจหาระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อไวรัสเท่านั้น (spike) และช่วงระยะเวลาที่ดำเนินการไม่ได้เป็นแบบระยะยาว (long-term study) รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัสกับการตรวจหา subgenomic RNA มีจำนวนขนาดตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อ COVID-19 จำนวนไม่มาก ดังนั้น ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นและเพิ่มความหลากหลายของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย อาทิ รวบรวมตัวอย่างผู้ป่วยจากภูมิภาคต่าง ๆ และการตรวจหา subgenomic RNA ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจในบริเวณยีน E เท่านั้น การศึกษาที่เปรียบเทียบปริมาณการสร้าง subgenomic E gene (sgE) เทียบกับ subgenomic N gene (sgN) พบว่ามีระดับการสร้าง sgE ในปริมาณที่ต่ำกว่า sgN⁶³⁻⁶⁴ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของงานวิจัยไม่ได้ส่งผลต่อการศึกษานี้

สรุป กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงมีระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG เพิ่มขึ้นตามวันที่เพิ่มขึ้นนับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย และสามารถตรวจพบ subgenomic RNA ได้ในช่วง 4 วันแรกนับจากวันที่ผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างที่มีค่า Ct ของยีน nucleocapsid น้อยกว่า 30 เมื่อตรวจด้วยวิธี rRT-PCR

เอกสารอ้างอิง

1. กรมการแพทย์. แนวทางเวชปฏิบัติการวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล กรณีโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ฉบับปรับปรุง วันที่ 28 มกราคม พ.ศ. 2564 สำหรับแพทย์และบุคลากรสาธารณสุข [Internet]. 2021; [cited 3 January 2021]. Available from: http://covid19.dms.go.th/Content/Select_Landding_page?contentId=109.
2. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. [cited 1 December 2020]. Available from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf>
3. Center for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). [cited 1 December 2020]. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
4. สมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย. คู่มือ COVID สำหรับกุมารแพทย์ [Internet]. 2021; [cited 9 March 2021]. Available from: <https://pidst.or.th/A880.html>.
5. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange SW, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nat Cell Biol* 2020;581:465–9.
6. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2021;2:e13–22.
7. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270–3.
8. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020;579:265–9.
9. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N.Engl J Med* 2019;382:727-33.
10. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506.
11. Liu K, Fang YY, Deang Y, Liu W, Wang MF, Ma JP, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J (Engl)* 2020;133(9):1025-31.

12. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020;323:1061–9.
13. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2021;19(3):155-70.
14. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu Rev Virol* 2015;2(1):265–88.
15. Patel KP, Burnham AJ, Gebhart NN, Sokoloski KJ, Hardy RW. Role for subgenomic mRNA in host translation inhibition during Sindbis virus infection of mammalian cells. *Virology* 2013;441:171–81.
16. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 2020;382(16):1564-7.
17. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) [Internet]. 2020; [cited 3 January 2021]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>.
18. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. ความรู้พื้นฐาน COVID-19 ตอนที่ 1 โรค โควิด-19 การติดเชื้อ การป่วย การดูแลรักษา การป้องกันการแพร่เชื้อและการติดเชื้อ [Internet]. 2020; [cited 3 January 2021]. Available from: https://www.niems.go.th/1/UploadAttachFile/2020/EBook/49793_20200325095718.pdf
19. World Health Organization in Thailand. โรคโควิด 19 คืออะไร [Internet]. 2020; [cited 3 January 2021]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/searo/thailand/update-28-covid-19-what-we-know---june2020---thai.pdf?sfvrsn=724d2ce3_0
20. Denning DW, Kilcoyne A, Ucer C. Non-infectious status indicated by detectable IgG antibody to SARS-CoV-2. *Br Dent J*. 2020 Oct 01;229(8):521-524.
21. Marklund E, Leach S, Axelsson H, Nyström K, Norder H, Bemark M. Serum-IgG responses to SARS-CoV-2 after mild and severe COVID-19 infection and analysis of IgG non-responders. *PLoS One* 2020;15(10):e0241104.
22. Lui C, Cady NC, Batt CA. Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems. *Sensors (Basel)* 2009;9(5):3713-44.
23. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol* 2014;1099:65-75.

24. Green MR, Sambrook J. The basic polymerase chain reaction (PCR). Cold Spring Harb Protoc 2018;2018(5).
25. Nassiri M, Torshizi ME, Ghowati S, Doosti M. Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data. Journal of Applied Statistics 2018;45(2):306-19.
26. Immergluck K, Gonzalez MD, Frediani JK, Levy JM, Figueroa J, Wood A, et al. Correlation of SARS-CoV-2 subgenomic RNA with antigen detection in nasal midturbinate swab specimens. Emerg Infect Dis 2021;27(11):2887-91.
27. Dagotto G, Mercado NB, Martinez DR, Hou YJ, Nkolola JP, Carnahan RH, et al. Comparison of Subgenomic and Total RNA in SARS-CoV-2 Challenged Rhesus Macaques. J Virol 2021;95:e02370-20.
28. Zollo M, Ferrucci V, Izzo B, Quarantelli F, Domenico CD, Comegna M, et al. SARS-CoV-2 Subgenomic N (sgN) Transcripts in Oro-Nasopharyngeal Swabs Correlate with the Highest Viral Load, as Evaluated by Five Different Molecular Methods. Diagnostics (Basel) 2021;11:288.
29. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Nat Med 2020;26:1200-4.
30. Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He WT, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. Science 2020;369:956-63.
31. Tilocca B, Soggiu A, Sanguinetti M, Musella V, Britti D, Bonizzi L, et al. Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses. Microbes Infect 2020;22:188-94.
32. Caini S, Bellerba F, Corso F, Diaz-Basabe A, Natoli G, Paget J, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. Euro Surveill 2020;25:2000980.
33. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. J Infect Dis 2020;222:206-13.
34. Narasimhan M, Mahimainathan L, Araj E, Clark AE, Markantonis J, Green A, et al. Clinical Evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays among Infected, Recovered, and Vaccinated Groups. J Clin Microbiol 2021;59:e0038821.

35. Bradley T, Grundberg E, Selvarangan R, LeMaster C, Fraley E, Banerjee D, et al. Antibody Responses after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *N Engl J Med* 2021;384:1959-61.
36. Lumley SF, Wei J, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, et al. The Duration, Dynamics, and Determinants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Antibody Responses in Individual Healthcare Workers. *Clin Infect Dis* 2021;73:e699-e709.
37. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:845-8.
38. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020;20:565-74.
39. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020;92:1518-24.
40. Luo H, Jia T, Chen J, Zeng S, Qiu Z, Wu S, et al. The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Front Immunol* 2021;12:632814.
41. Vitale J, Mumoli N, Clerici P, De Paschale M, Evangelista I, Cei M, et al. Assessment of SARS-CoV-2 Reinfection 1 Year After Primary Infection in a Population in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med* 2021;181:1407-8.
42. Ng DL, Goldgof GM, Shy BR, Levine AG, Balcerak J, Bapat SP, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence and neutralizing activity in donor and patient blood from the San Francisco Bay Area. *medRxiv [Preprint]* 2020;11:4698.
43. Bryan A, Pepper G, Wener MH, Fink SL, Morishima C, Chaudhary A, et al. Performance Characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG Assay and Seroprevalence in Boise, Idaho. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00941-20.
44. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis* 2020;26:1467-88.
45. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Oteo J, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* 2020;396:535-44.

46. Zhang QY, Chen H, Lin Z, Lin JM. Comparison of chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic microparticles with traditional colorimetric ELISA for the detection of serum α -fetoprotein. *J Pharm Anal* 2012;2:130-5.
47. CD Creative Diagnostic. Chemiluminescence Immunoassay Guide. [Internet]. 2021[cited 2021 Oct 31]. Available from: <https://www.creative-diagnostics.com/Chemiluminescence-Immunoassay-guide.htm>
48. Li K, Huang B, Wu M, Zhong A, Li L, Cai Y, et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat Commun* 2020;11:6044.
49. di Mauro G, Scavone C, Rafaniello C, Rossi F, Capuano A. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. *Int Immunopharmacol* 2020;84:106519.
50. Xu X, Sun J, Nie S, Li H, Kong Y, Liang M, et al. Seroprevalence of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in China. *Nat Med* 2020;26:1193–5.
51. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill* 2020;25:2000180.
52. Chirathaworn C, Sripramote M, Chalongviriyalert P, Jirajariyavej S, Kiatpanabhikul P, Saiyarin J, et al. SARS-CoV-2 RNA shedding in recovered COVID-19 cases and the presence of antibodies against SARS-CoV-2 in recovered COVID-19 cases and close contacts, Thailand, April-June 2020. *PLoS One* 2020;15:e0236905.
53. Chansaenroj J, Yorsaeng R, Posuwan N, Puenpa J, Sudhinaraset N, Chirathaworn C, et al. Detection of SARS-CoV-2-specific antibodies via rapid diagnostic immunoassays in COVID-19 patients. *Virology* 2021;18:52.
54. Li W, Su YY, Zhi SS, Huang J, Zhuang CL, Bai WZ, et al. Virus shedding dynamics in asymptomatic and mildly symptomatic patients infected with SARS-CoV-2. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1556.e1-1556.e6.
55. Xiao K, Yang H, Liu B, Pang X, Du J, Liu M, et al. Antibodies Can Last for More Than 1 Year After SARS-CoV-2 Infection: A Follow-Up Study From Survivors of COVID-19. *Front Med (Lausanne)* 2021;8:684864.
56. Xia W, Li M, Wang Y, Kazis LE, Berlo K, Melikechi N, et al. Longitudinal analysis of antibody decay in convalescent COVID-19 patients. *Sci Rep* 2021;11:16796.

57. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020;5:eabe0367.

58. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell* 2020;183:1024-1042.e21.

59. Perera RAPM, Tso E, Tsang OTY, Tsang DNC, Fung K, Leung YWY, et al. SARS-CoV-2 Virus Culture and Subgenomic RNA for Respiratory Specimens from Patients with Mild Coronavirus Disease. *Emerg Infect Dis* 2020;26:2701-4.

60. World Health Organization. Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation. [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 4]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/criteria-for-releasing-covid-19-patients-from-isolation>.

61. Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun* 2020;11:6059.

62. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clin Infect Dis* 2020;71:2663-6.

63. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell* 2020; 181:914–21.e10.

64. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH, et al. SARS-CoV-2 reverse genetics reveals a variable infection gradient in the respiratory tract. *Cell* 2020; 182:429–46.

ภาคผนวก

แบบเก็บข้อมูล

โครงการวิจัย อัตราการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2 ในวันที่ 7 และ 10

นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยในผู้ป่วย COVID-19

ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อความรุนแรงของโรคร่วม

1. ข้อมูลทั่วไป

- 1.1 เพศ 1. ชาย 2. หญิง
- 1.2 อายุ ปี
- 1.3 วันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ COVID-19 วันที่ เดือน พ.ศ. 2564
- 1.4 วันที่เข้ารับการรักษาพยาบาล วันที่ เดือน พ.ศ. 2564
- 1.5 วันที่ขอความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย วันที่ เดือน พ.ศ. 2564

2. ข้อมูลประวัติสุขภาพ

- 2.1 โรคประจำตัว 1. ไม่มี 2. มี (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)
- 1) เบาหวาน 2) ความดันโลหิตสูง
- 3) หลอดเลือดหัวใจ 4) อื่นๆ (ระบุ)
- 2.2 อาการแสดง ใดๆอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้ 1. ไม่มี 2. มี (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)
- 1) มีไข้ 2) ไอ 3) เจ็บคอ
- 4) มีน้ำมูก 5) ปวดศีรษะ 6) ปวดกล้ามเนื้อ
- 7) มีตุ่มน้ำใส 8) ไม่ได้กลิ่น 9) ลิ้นไม่รับรส
- 10) หายใจเหนื่อย/หายใจเร็ว 11) อื่นๆ (ระบุ)
- วันที่เริ่มมีอาการ เดือน พ.ศ. 2564

2.3 การวินิจฉัยระดับความรุนแรงของโรค COVID-19

1. Symptomatic กรณีที่มีอาการไม่รุนแรง ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรครุนแรง/โรคร่วมสำคัญ และภาพถ่ายรังสีปอดปกติ
2. Asymptomatic

2.4 ผลภาพถ่ายรังสีปอด 1. ผิดปกติ 2. ปกติ

3. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

| Detection Method | การเก็บสิ่งส่งตรวจในวันที่ 7 | การเก็บสิ่งส่งตรวจในวันที่ 10 |
|------------------|---|---|
| | □□ / □□ / 2564 | □□ / □□ / 2564 |
| RT-PCR | <input type="checkbox"/> Detected Ct. | <input type="checkbox"/> Detected Ct. |
| | <input type="checkbox"/> Not detected | <input type="checkbox"/> Not detected |
| | <input type="checkbox"/> Inconclusive | <input type="checkbox"/> Inconclusive |
| Viral culture | <input type="checkbox"/> Detected Ct. | <input type="checkbox"/> Detected Ct. |
| | <input type="checkbox"/> Not detected | <input type="checkbox"/> Not detected |
| | <input type="checkbox"/> Inconclusive | <input type="checkbox"/> Inconclusive |
| Subgenomic RNA | <input type="checkbox"/> Detected Ct. | <input type="checkbox"/> Detected Ct. |
| | <input type="checkbox"/> Not detected | <input type="checkbox"/> Not detected |
| | <input type="checkbox"/> Inconclusive | <input type="checkbox"/> Inconclusive |
| ELISA | <input type="checkbox"/> Reactive | <input type="checkbox"/> Reactive |
| | <input type="checkbox"/> IgM positive | <input type="checkbox"/> IgM positive |
| | <input type="checkbox"/> IgG positive | <input type="checkbox"/> IgG positive |
| | <input type="checkbox"/> IgM + IgG positive | <input type="checkbox"/> IgM + IgG positive |
| | <input type="checkbox"/> Non reactive | <input type="checkbox"/> Non reactive |
| | <input type="checkbox"/> Inconclusive | <input type="checkbox"/> Inconclusive |

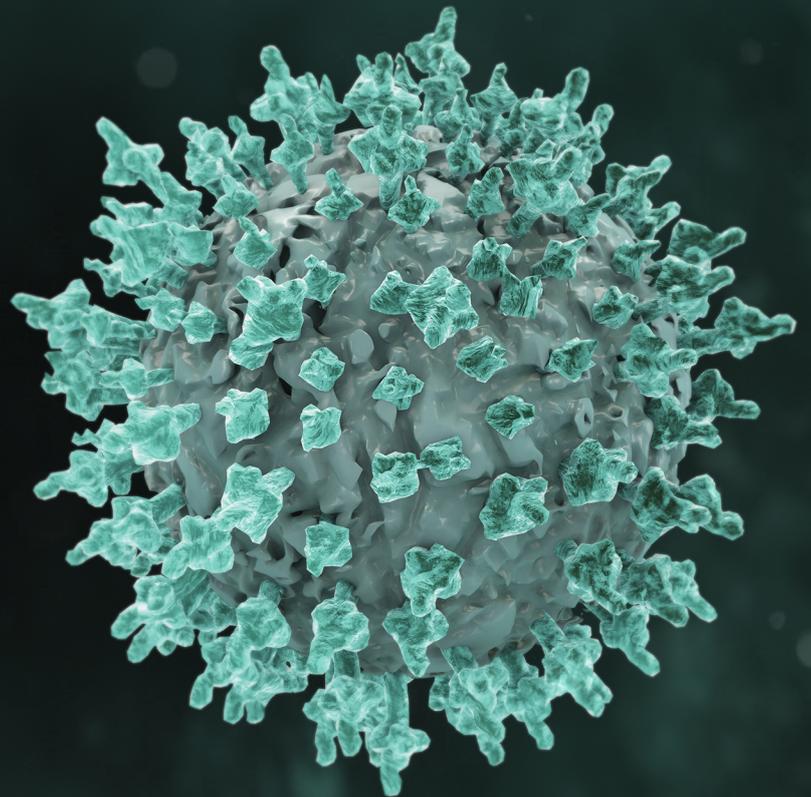
.....

ผู้บันทึกข้อมูล (ชื่อ - นามสกุล)..... ตำแหน่ง.....

วันที่บันทึก □□ เดือน □□ พ.ศ. 2564

ผู้ตรวจสอบข้อมูล (ชื่อ - นามสกุล)..... ตำแหน่ง.....

(ผู้ลงผลตรวจคนสุดท้าย) วันที่ตรวจสอบ □□ เดือน □□ พ.ศ. 2564



สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์
กรมการแพทย์
www.imrta.dms.moph.go.th

