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

สมชาย ธนะสิทธิชัย พ.บ.*, อรุณี ไทยะกุล ส.ม.*, ณัฐธยา สง่า วท.ม.*, ยง ภู่วรวรรณ พ.บ.**, สุธาลักษณ์ ขวัญเจริญทรัพย์ วท.ม.*, พัชริยา ยิ่งอินทร์ วท.บ.*
*สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
**ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

Abstract: Viral Infectivity of Asymptomatic or Mild Symptomatic without Risk Factors COVID-19 Case-patients at 7 and 10 Days after Diagnosis

Somchai Thanasitthichai, M.D.*, Arunee Thaiyakul, M.P.H.*, Nattaya Sanga, M.Sc.*, Yong Poovorawan, M.D.**, Suthaluk Kwanjaroensub, M.Sc.*, Patchariya Yingin, B.Sc.*
*Institute of Medical Research and Technology Assessment, Department of Medical Services, MoPH, Nonthaburi, 11000
**Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330
(E-mail: dr.somchai.t@gmail.com)
(Received: 17 March, 2022; Revised: 18 April, 2022; Accepted: 6 May, 2022)

Background: 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, we can save many resources. Objective: to assess the rate of SARS-CoV-2 (viral infectivity) in asymptomatic and mild symptomatic COVID-19 patients diagnosed on 7th day and 10th day after diagnosis. Method: This prospective descriptive study performed at the hospitel (Narai Hotel) under the supervision of Lerdsin Hospital from March to December 2021. 88 of subjects were recruited. Nasopharyngeal and throat secretion culture for SARS-CoV-2, subgenomic RNA and clotted blood for IgM and IgG using ELISA were collected. Results: We found 64.4% female, mean age 37.1 ± 12.3 years and BMI 23.1 ± 3.5 kg/m^2. Asymptomatic and mild symptomatic subjects were 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 whereas, 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 showed 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 on day 7 and day 10 were 2.42 (95%CI 1.77, 3.30) and 3.45 (95%CI 2.6, 4.6) respectively (p < .001) while anti-RBD IgG 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. Conclusion: The infection on 7th days and 10th day from diagnostic date by RT-PCR showed a large number of infections, virus culture showed very rarely "detected" report on 7th day and "not detected" on 10th day after diagnosis.

Keywords: Antibody, COVID-19, Quarantine, Virus Culture

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: ผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่ไม่มีอาการ และมีอาการไม่รุนแรงและไม่มีปัจจัยเสี่ยงร่วมด้วยจะต้องได้รับการกักตัวเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 10 วัน หากสามารถลดระยะเวลาการกักตัวลงเหลือ 7 วันได้ จะเป็นการลดทรัพยากรที่จำเป็นต้องใช้ลงได้ **วัตถุประสงค์:** เพื่อประเมินการแพร่เชื้อ SARS-CoV-2 (viral infectivity) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย **วิธีการ:** การศึกษาเชิงพรรณนาไปข้างหน้าโดยเก็บข้อมูลจากผู้ยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 ด้วย RT-PCR ที่เข้ารับการกักตัวที่หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ (โรงแรมนารายณ์) ภายใต้การกำกับดูแลของโรงพยาบาลเลิดสินในระหว่างเดือนมีนาคม-ธันวาคม 2564 อาสาสมัครจำนวน 88 คนได้รับการเก็บสารคัดหลั่งในช่องจมูกและลำคอเพื่อตรวจ RT-PCR และ subgenomic RNA รวมถึงการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 **ผล:** 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 RT-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 และไม่ใช่ทั้งสายพันธุ์ alpha และ delta ร้อยละ 35.2 ระดับแอนติบอดีชนิด anti-spike IgM ของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และวันที่ 10 มีค่า geometric mean titer (GMT) 2.42 (95%CI 1.77, 3.30) และวันที่ 10 พบค่าไตเตอร์ 3.45 (95%CI 2.6, 4.6) ตามลำดับ ($p < .001$) ส่วน anti-RBD IgG ในวันที่ 7 และวันที่ 10 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 **สรุป:** การตรวจพบเชื้อในวันที่ 7 และวันที่ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลตรวจพบเชื้อ (detected) เป็นจำนวนมาก แต่ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (virus culture) พบเชื้อ (detected) ได้น้อยมากในวันที่ 7 และไม่พบเชื้อเลยในวันที่ 10 ภายหลังได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อโควิด 19

คำสำคัญ: ภูมิคุ้มกัน, โควิด 19, การกักตัว, การเพาะเชื้อไวรัส

บทนำ

ประเทศไทยมีแนวทางการดูแลรักษา และการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 คือ แนวทางเวชปฏิบัติ การวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล กรณีที่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ COVID-19 ที่จัดทำโดยกระทรวงสาธารณสุข ฉบับปรับปรุง วันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ.2563[1] ได้กำหนดแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยตามกลุ่มอาการ โดยผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการและกลุ่มที่มีอาการเล็กน้อยที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงร่วมด้วยจะเข้าพักรักษาในโรงพยาบาล หรือสถานที่ที่รัฐจัดให้เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน นับจากวันที่ตรวจพบเชื้อ และพิจารณาการจำหน่ายผู้ป่วยออกจากโรงพยาบาลตามเกณฑ์ โดยไม่ต้องทำ swab ซ้ำก่อนจำหน่าย

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ COVID-19 ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นวิธีการที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจจับเชื้อไวรัสปริมาณน้อยในรูปแบบของสารพันธุกรรมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต แต่ไม่ได้บ่งบอกถึงความสามารถของไวรัสในการแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่น ซึ่งการหาความสามารถในการแพร่เชื้อโดยการแบ่งตัวหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสสามารถทำได้โดยวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลาและความเชี่ยวชาญเป็นอย่างมาก และต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยสูง ในขณะที่การตรวจหา RNA ในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA) เป็นวิธีการใหม่ที่สามารถตรวจการแบ่งตัวหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสอีกวิธีหนึ่งที่มีความยุ่งยากน้อย และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการเพาะเชื้อ โดยสามาถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป นอกจากนี้การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ (immune responses) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถตรวจการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อ COVID-19 ได้ จากผลการดำเนินการโครงการตรวจยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 ด้วยวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) ของกรมการแพทย์ พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) และไม่มีอาการ (asymptomatic) ที่ได้รับการยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 เข้ารับการกักตัวที่หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ (hospitel) มีระยะเวลานับจากวันที่ตรวจพบเชื้ออยู่ระหว่าง 12 ถึง 36 วัน ผลการตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไม่พบเชื้อในผู้ป่วยทุกราย แต่ยังมีผล RT-PCR เป็นบวก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเชื้อ COVID-19 มีชีวิตอยู่เพียงประมาณ 8 วัน ซึ่งสารพันธุกรรมที่ตรวจพบด้วยวิธี RT-PCR อาจเป็นซากเชื้อที่ไม่ก่อโรคและผู้ป่วยไม่สามารถแพร่เชื้อได้ อย่างไรก็ตามกลุ่มตัวอย่างจากการศึกษาที่ผ่านมามีจำนวนค่อนข้างน้อย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินอัตราการแพร่เชื้อ SARS-CoV-2 (viral infectivity) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น COVID-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัยโดยการเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ รวมถึงประเมินอัตราการตรวจพบเชื้อ SARS-CoV-2 (viral shedding) และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่เชื้อ การตรวจพบเชื้อ การตอบสนองของ

ภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 และความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัสกับการตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA)

วัตถุและวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

การวิจัยเชิงพรรณนาไปข้างหน้า (prospective descriptive study)

ประชากรศึกษา

ผู้ป่วยยืนยันติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) โดยมีเกณฑ์คัดเข้า คือ อายุ 18–60 ปีที่ไม่มีอาการ และมีอาการไม่รุนแรง เช่น มีไข้หรือวัดอุณหภูมิกายได้ตั้งแต่ 37.5 องศาเซลเซียสขึ้นไป หรือ มีอาการของระบบทางเดินหายใจอย่างน้อยหนึ่งอาการดังต่อไปนี้ ได้แก่ ไอ มีน้ำมูก เจ็บคอ ไม่ได้กลิ่น ลิ้นไม่รับรส เกณฑ์การคัดเลือกออก ได้แก่ โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) หรือโรคปอดเรื้อรังอื่น ๆ โรคไตเรื้อรัง (CKD) โรคหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคหัวใจแต่กำเนิด โรคหลอดเลือดสมอง เบาหวานที่ควบคุมไม่ได้ โรคตับแข็ง ภาวะอ้วน (BMI ≥ 35 กก./ตร.ม.) ภูมิคุ้มกันต่ำ lymphocyte น้อยกว่า 1,000 เซลล์/ลบ.มม. โดยดำเนินการตั้งแต่เดือนมีนาคม-ธันวาคม 2561 โครงการผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย กรมการแพทย์ โดยได้รับการอนุมัติโครงการลำดับที่ 1/2563 วันที่ 1 กรกฎาคม 2564 โดยคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยสูตร infinite population proportion โดยกำหนด α = .05 สัดส่วนการตรวจพบเชื้อ (p) เป็น 0.67 (จากข้อมูลโครงการตรวจยืนยันการติดเชื้อ COVID-19 ด้วยวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) ของกรมการแพทย์ เมื่อพิจารณาจากผล RT-PCR เป็นบวกในระยะเวลาที่เริ่มมีอาการ (onset time) ระหว่าง 7-14 วัน) กำหนดค่าความคลาดเคลื่อนที่ร้อยละ 10 ได้ขนาดตัวอย่างจำนวน 86 คน รวม drop out ร้อยละ 5 จะได้อาสาสมัครจำนวนทั้งสิ้น 90 คน

สถานที่ศึกษา

หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ (โรงแรมนารายณ์) ภายใต้การกำกับของโรงพยาบาลเลิดสิน

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

แบบเก็บข้อมูลการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2 ในวันที่ 7 และ 10 ภายหลังได้รับการวินิจฉัย COVID-19

ขั้นตอนดำเนินการ

1.คัดเลือกอาสาสมัครจากผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่ไม่มีอาการ และมีอาการไม่รุนแรงและไม่มีปัจจัยเสี่ยงที่ได้รับการกักตัวที่หอผู้ป่วยพาะกิจ (hospital)

2.เก็บสิ่งส่งตรวจจากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและคอ จำนวน 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 วันที่ 7 และครั้งที่ 2 วันที่ 10 ภายหลังได้รับการวินิจฉัย

การตรวจติดตามการติดเชื้อ COVID-19 จำนวน 4 วิธี ได้แก่ 1) วิธี RT-PCR โดยใช้สารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกและคอ 2) วิธี subgenomic RNA โดยใช้สารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกและคอ 3) วิธี virus culture โดยใช้สารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกและคอ 4) วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ ประมาณ 5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ข้อมูล

• ข้อมูลทั่วไปแสดงด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) นำเสนอด้วยจำนวนและร้อยละ

• ความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่เชื้อ การตรวจพบเชื้อ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 และระหว่างวิธีการเพาะเชื้อกับวิธี subgenomic RNA วิเคราะห์ด้วยสถิติ McNemar test โดยการคำนวณค่า geometric mean titer (GMT) และความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์จะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับไตเตอร์ในวันที่ 7 และ 10 โดยวิธี Wilcoxon matched-pairs signed rank test แบบจับคู่ที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับ .05

ผล

อาสาสมัครเข้าร่วมการศึกษามีจำนวน 90 ราย โดย 2 ราย ได้รับการคัดออก เนื่องจากภายหลังวันที่ 7 ผู้ป่วยมีอาการหอบเหนื่อยและจำเป็นต้องส่งต่อไปรับการรักษาที่โรงพยาบาล ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยในการศึกษามีจำนวนทั้งสิ้น 88 ราย

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยที่มีผลยืนยันว่าติดเชื้อโควิด-19 (n = 88)

ลักษณะทั่วไป	จำนวน (ร้อยละ)
เพศ	
ชาย	30 (33.3)
หญิง	58 (64.4)
อายุ, mean ± SD	37.1 ± 12.3

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยที่มีผลยืนยันว่าติดเชื้อโควิด-19 (n = 88) (ต่อ)

ลักษณะทั่วไป	จำนวน (ร้อยละ)
ดัชนีมวลกาย, mean ± SD	23.1 ± 3.5
< 18.5 (น้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์)	10 (11.4)
18.5 – 22.9 (ปกติ)	34 (38.64)
23.0 – 24.9 (น้ำหนักเกิน)	17 (19.3)
25.0 – 29.9 (อ้วนระดับ 1)	26 (29.6)
≥ 30 (อ้วนระดับ 2)	1 (1.1)
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)

อาสาสมัครเป็นเพศหญิงร้อยละ 64.4 ดัชนีมวลกาย (BMI) ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ปกติ มีผู้ป่วยร้อยละ 25 ที่มีโรคประจำตัว พบความดันโลหิตสูงมากที่สุด รองลงมาเป็นภูมิแพ้ โรคอื่น ๆ ได้แก่ ธาลัสซีเมีย เก๊าท์ ข้อเข่าเสื่อม ตับอักเสบ อาสาสมัครส่วนใหญ่เป็นกลุ่มมีอาการไม่รุนแรง (mild symptomatic) กลุ่มไม่มีอาการ (asymptomatic) พบร้อยละ 34.1 ภาพถ่ายรังสีทรวงอกครั้งแรกส่วนใหญ่มีผลปกติ ดังตารางที่ 1

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

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี rRT-PCR พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจพบเชื้อในวันที่ 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 ส่วนการตรวจพบเชื้อของกลุ่มมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 และ 10 ไม่เปลี่ยนแปลง (ร้อยละ 86.2) (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%)**

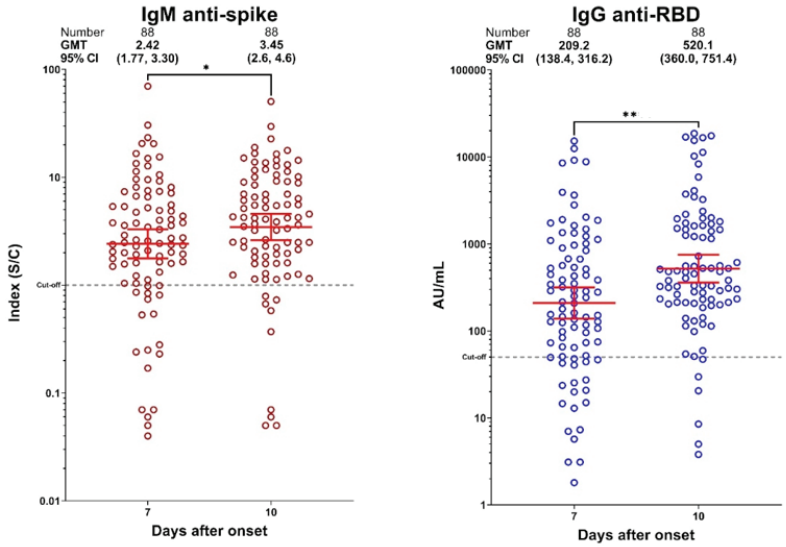
ส่วนการตรวจหาจำนวนไวรัสด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (virus isolation)

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าในวันที่ 7 ผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจไม่พบเชื้อคิดเป็นร้อยละ 98.9 (87/88) และวันที่ 10 ไม่พบเชื้อไวรัสในผู้ป่วยทุกราย

การตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA)

สายพันธุ์เชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ที่พบ ได้แก่ สายพันธุ์อังกฤษ หรือ alpha (B.1.1.7) ร้อยละ 53.4 สายพันธุ์อินเดีย หรือ delta ร้อยละ 11.4 และไม่ใช่ทั้งสายพันธุ์ alpha และ delta ร้อยละ 35.2 หากพิจารณาแยกตามกลุ่มที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SAR-CoV-2 ด้วยวิธี subgenomic RNA ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ alpha และกลุ่มที่ตรวจไม่พบเชื้อส่วนใหญ่สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ alpha และ delta

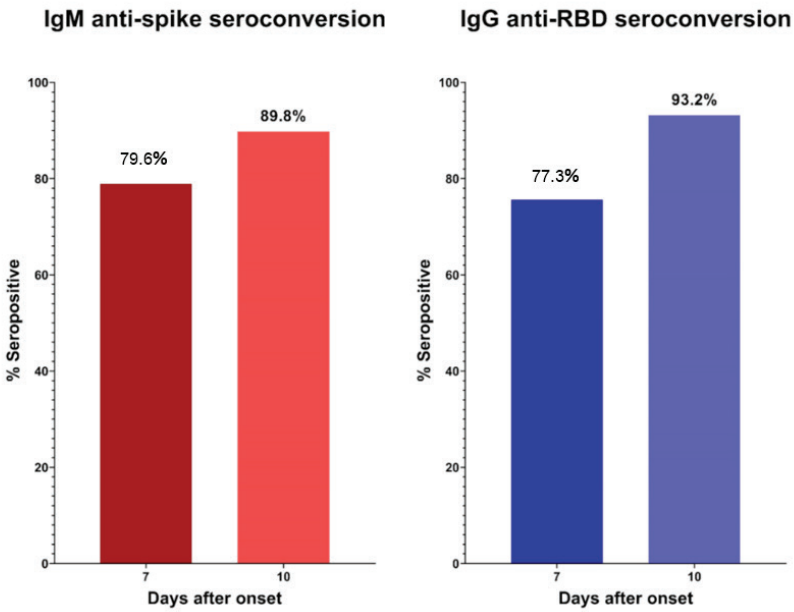
ภูมิคุ้มกันต่อ SARS-CoV-2 โดยการตรวจด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)



*p < .001 และ **p < .0001

ภาพที่ 1 ระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ และมีอาการไม่รุนแรง ในวันที่ 7 และ 10 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

ระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อโปรตีนหนามของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ และมีอาการไม่รุนแรง พบว่า anti-spike IgM จากผู้ป่วยโควิด-19 มีค่าไตเตอร์ (geometric mean titer; GMT) ของผู้ป่วยในวันที่ 7 เป็น 2.42 (95%CI 1.77, 3.30) และวันที่ 10 พบค่าไตเตอร์ 3.45 (95%CI 2.6, 4.6)) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < .001) ระดับ anti-RBD IgG ในวันที่ 10 สูงกว่าในวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < .0001) โดยมีค่าไตเตอร์ เท่ากับ 520.1 (95%CI 360.0, 751.4) และ 209.2 (95%CI 138.4, 316.2) ตามลำดับ (ภาพที่ 1) อัตรา seroconversion ทั้งระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโควิด-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงมีระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM และ IgG ในวันที่ 7 พบว่า มีอัตรา seropositive เท่ากับร้อยละ 79.6 และ 77.3 ตามลำดับ ในขณะที่ในวันที่ 10 มีอัตรา seropositive เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 89.8 และ 93.2 ตามลำดับ) ดังนั้น การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโควิด-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 10 กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าในวันที่ 7 (ภาพที่ 2)



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

ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อกับ subgenomic RNA ในผู้ป่วยโควิด-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย

เมื่อพิจารณาการตรวจเชื้อไวรัสในช่วงระยะที่มีอาการต่าง ๆ ด้วยวิธีเพาะเชื้อ RT-PCR และ subgenomic RNA พบว่าผู้ที่มีอาการตั้งแต่วันที่ 8 เป็นต้นไป ตรวจไม่พบเชื้อทั้ง 3 วิธี วิธี RT-PCR ยังให้ผลบวกทุกรายในผู้ที่มีอาการในช่วงวันที่ 4-7 ซึ่งในช่วงเวลาเดียวกันไม่พบผลบวกในกลุ่มที่ตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการแยกเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 การตรวจ RT-PCR และการตรวจ subgenomic RNA ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโควิด-19 ที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรง (n = 88)

	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
RT-PCR	23/30	36/42	14/14	0/2
Subgenomic RNA	8/30	18/42	1/14	0/2

วิจารณ์

การศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ SARS-CoV-2

ระดับภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนหนาม (anti-spike IgM และ anti-RBD IgG) ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในวันที่ 7 ภายหลังการวินิจฉัยพบร้อยละ 79.6 และ 77.3 ตามลำดับ ซึ่ง anti-spike IgM และ anti-RBD IgG เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 เป็นร้อยละ 89.8 และ 93.2 ตามลำดับ การวิจัยนี้พบว่าหลังจากที่ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-19 ในวันที่ 7 นับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย ผู้ป่วยมีระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-RBD IgG โดยเฉลี่ย 1,099.4 BAU/mL และในวันที่ 10 มีระดับค่าเฉลี่ย 2,058.6 BAU/mL ซึ่งสูงกว่าระดับภูมิคุ้มกันที่พบในวันที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในสาธารณรัฐประชาชนจีน[6] ศึกษาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-19 กลุ่มที่มีอาการเล็กน้อย/ กลุ่มที่มีอาการปานกลาง พบว่าระดับภูมิคุ้มกันชนิด anti-spike, -RBD และ -nucleocapsid IgM ขึ้นสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการ ขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการรุนแรง/ กลุ่มที่ฉุกเฉินวิกฤต จะมีค่าระดับภูมิคุ้มกันชนิดเดียวกันนี้เพิ่มสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการ นอกจากนี้ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการเล็กน้อย/ กลุ่มที่มีอาการปานกลาง เริ่มตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด

anti-spike, -RBD และ -nucleocapsid IgG ในช่วง 2 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นระดับภูมิคุ้มกันชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 3 และมีค่าสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 5 หรือ สัปดาห์ที่ 6 นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2547 มีรายงานการศึกษาในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส SARS พบว่าเริ่มตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยในช่วงวันที่ 3–6 ภายหลังจากผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการ และตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ในวันที่ 8 หลังจากผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการ[7] ระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ที่มีระดับค่อนข้างสูงในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงในช่วงสัปดาห์แรกให้ผลสอดคล้องกับรายงานในประเทศจีนและญี่ปุ่น[6,8-9] ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ได้สูงในช่วงอาทิตย์แรกหลังจากที่ได้รับการวินิจฉัย อาจเป็นเพราะวันที่ได้รับการวินิจฉัยนั้นเกิดขึ้นหลังจากวันที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อแต่ไม่ได้แสดงอาการ

การศึกษาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ก่อนหน้านี้ในกลุ่มประชากรไทยที่หายจากการติดเชื้อและกลุ่มผู้ที่ใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อ รายงานตรวจพบสารพันธุกรรมในผู้ป่วยที่หายจากการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ 6.6 ระยะเวลานานสุดที่ยังตรวจพบสารพันธุกรรมคือ 105 วัน โดยมีภูมิคุ้มกันชนิด IgM, IgG และ IgA ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 หลังจากที่ผู้ป่วยหายจากการติดเชื้อมาแล้ว 1-3 เดือน คิดเป็นร้อยละ 13.8, 88.5 และ 83.4 ตามลำดับ กลุ่มผู้ที่ใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อมีภูมิคุ้มกันชนิด IgG คิดเป็นร้อยละ 4.9[10] ในช่วงที่เริ่มมีการระบาดของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2563 รายงานพบระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgM ลดลงหลังจากสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG และ IgA นั้นยังมีค่าคงที่หลังจากเวลาผ่านไป 2 เดือน[11] การศึกษาที่เมือง Wanzhou ศึกษาการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยรวบรวมข้อมูลจากผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการจำนวน 37 ราย พบว่าระยะเวลาในการขับเชื้อออกจากร่างกาย (viral shedding) ของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีค่ากลางอยู่ที่ 19 วัน และนานที่สุด 26 วัน ระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ที่ระยะ acute phase ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการนี้มีค่าน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ร้อยละ 93.3 ของกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ลดลงในช่วงแรกของระยะพักฟื้น (convalescent phase) และร้อยละ 81.1 มีระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเทียม (pseudovirus) ลดลงในช่วงระยะเวลาเดียวกัน[12] ยิ่งไปกว่านั้น รายงานระยะเวลาในการขับเชื้อออกจากร่างกายจากอีกกลุ่มวิจัยที่ประเทศเดียวกันนี้ พบว่าผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการมีค่ากลางอยู่ที่ 28 วัน และผู้ป่วยที่มีอาการเล็กน้อยประมาณ 31 วัน[13]

รายงานการศึกษาจำนวนมากที่กล่าวถึงการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ในผู้ป่วยหลังจากติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เมื่อเวลาผ่านไปและค่าครึ่งชีวิตของระดับภูมิคุ้มกัน เช่น กลุ่มคณะวิจัยที่มณฑล Chongqing ประเทศจีน รายงานระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 6 เดือนแรกหลังจากออกจากโรงพยาบาล และยังคงอยู่อย่างน้อยเป็นเวลาอีก 6 เดือน[14] กลุ่มคณะวิจัยที่อเมริกาได้ศึกษาอัตราการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ต่อโปรตีน nucleocapsid ในผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 943 ตัวอย่างในช่วงระยะเวลา 7 เดือน พบว่าระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นและลดลงจนระดับคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือน[15] สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าการตอบสนองของระดับภูมิคุ้มกันชนิด IgG ต่อโปรตีนหนาม (anti-RBD) มีระดับลดลงเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 90 วัน[16] อย่างไรก็ตาม จากรายงานระดับภูมิคุ้มกันในเลือดในวันที่ 115 หลังจากเริ่มแสดงอาการ พบว่าค่าครึ่งชีวิตของระดับภูมิคุ้มกันเท่ากับ 49 วันจากจำนวนตัวอย่างผู้ป่วย 647 ตัวอย่าง[17]

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเชื้อไวรัส (virus isolation) กับการตรวจหาสารพันธุกรรมในจีโนมของไวรัส (subgenomic RNA)

มีการศึกษาพบว่าผู้ที่รักษาหายจากการติดเชื้อ COVID-19 บางรายและมีผลตรวจเชื้อไวรัสเป็นลบ สามารถกลับมาตรวจพบเชื้อไวรัสเป็นบวกได้อีกครั้งโดยที่ไม่มีอาการบ่งชี้แสดงใด ๆ ว่าติดเชื้อครั้งใหม่ แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าผู้ป่วยบางรายนั้นกลับมาติดเชื้อใหม่และต้องทำการกักตัวอีกครั้งหรือไม่ ในการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสที่พบนั้นเป็นเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย และสามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังบุคคลอื่น ๆ อีกได้หรือไม่ ดังนั้นในการตรวจหา sgRNA จึงมีส่วนสำคัญที่จะเข้ามาแก้ไขปัญหาเหล่านี้ได้ การศึกษานี้พบว่า กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและมีอาการไม่รุนแรงให้ผลการตรวจพบ subgenomic RNA ได้น้อยมากในวันที่ 4 และตรวจไม่พบเลยในวันที่ 5 นับจากวันที่เริ่มมีอาการเป็นต้นไป แต่ยังสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ได้จนถึงในวันที่ 7 นับจากวันที่เริ่มมีอาการ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ตรวจพบ subgenomic RNA ได้จนถึงในวันที่ 5 ในตัวอย่างผู้ป่วยที่เก็บด้วยวิธีป้ายลำคอ (throat swab)[5] เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ในกลุ่มผู้ป่วยในฮ่องกง พบว่าช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการกักตัวกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการเล็กน้อยหรือรุนแรงปานกลางอยู่ที่อย่างน้อย 8 วันหลังจากที่เริ่มมีอาการ[18] ขณะที่องค์การอนามัยโลกหรือ WHO ได้ให้แนวทางระยะเวลาในการกักตัวอยู่ที่ 10 วันหลังจากที่เริ่มมีอาการ และในกรณีที่ผู้ป่วยไม่แสดงอาการต้องเพิ่มวันที่กักตัวอีกอย่างน้อยมากกว่าหรือเท่ากับ 3 วัน[19] มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นจำนวนมากได้แสดงให้เห็นถึงการนำ subgenomic RNA มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบบ routine เพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ยังอยู่ในช่วงเวลาที่เพิ่มจำนวนได้[20-21] อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่ขัดแย้งกับงานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่าการตรวจ subgenomic RNA อาจไม่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการแพร่เชื้อของไวรัส SARS-CoV-2 ได้[22]

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่ามีหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในวันที่ 1 นับจากวันที่เริ่มมีอาการ มีค่า Ct ประมาณ 21 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้า พบสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่มีอาการเล็กน้อยหรือรุนแรง

ปานกลางได้สำเร็จในช่วง 9 วันแรกหลังจากที่เริ่มแสดงอาการ[5,23] จากงานวิจัยนี้พบว่า ตรวจพบ subgenomic RNA ในกลุ่มของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ คิดเป็นร้อยละ 27 มีการศึกษาที่รัฐจอร์เจีย ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจ subgenomic RNA เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยชุดตรวจแอนติเจน พบว่า ยังคงตรวจพบ subgenomic RNA ได้ในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบเมื่อตรวจด้วยชุดตรวจแอนติเจนคิดเป็นร้อยละ 82.1[12] นอกจากนี้ ผลการศึกษานี้และงานวิจัยก่อนหน้าทำให้สรุปได้ว่า พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle-threshold ของยีน nucleocapsid กับ ค่า cycle-threshold ของ subgenomic RNA ที่เพิ่มขึ้น[12]

สรุป

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายแพทย์สมศักดิ์ อรรฆศิลป์ อธิบดีกรมการแพทย์ นายแพทย์มานัส โพธาภรณ์ รองอธิบดีกรมการแพทย์ และนายแพทย์อรรถสิทธิ์ ศรีสุบัติ ที่ปรึกษากรมการแพทย์ ที่สนับสนุนการดำเนินงาน ขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลเลิดสิน ที่อนุญาตในการเก็บข้อมูล ณ หอผู้ป่วยเฉพาะกิจ COVID-19 โรงแรมนารายณ์ สีลม กรุงเทพฯ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในการเก็บข้อมูล ตลอดจนผู้ป่วยทุกคน

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางไวรัสวิทยา และขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนงบประมาณทำให้การศึกษาวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

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. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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. Virol J 2021;18:52.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.