

## ความสัมพันธ์ระหว่างผล cycle threshold ของ RT-PCR และการตรวจเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยโควิด 19 ซึ่งได้รับยาสเตอรอยด์ในการรักษา

ภาณุวัฒน์ วงษ์กุหลาบ พ.บ., ส.ม.\*\*\*, วรณกร หอมสุวรรณ ส.ม.\*\*\*, สุชาดา สุพรรณพยัคฆ์ วท.ม.\*\*\*\*, ชัยชาญ ดีโรจนวงศ์ พ.บ.\*

\*กลุ่มงานอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ 10400

\*\*สถาบันร่วมผลิตแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต กรุงเทพฯ 10400

\*\*\*กลุ่มงานวิจัยและสารสนเทศ โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ 10400

\*\*\*\*งานอนุชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ 10400

## The Association among Cycle Threshold Value of RT-PCR, Viral Culture in Hospitalized COVID-19 Patients Receiving Corticosteroid Treatment

Panuwat Wongkulab, M.D., M.P.H.\*\*\*, Wannakorn Homsuwan, M.P.H.\*\*\*, Suchada Suphanpayak, M.Sc.\*\*\*\*, Chaicharn Deerochanwong, M.D.\*

\*Internal Medicine Department, Rajavithi Hospital, Bangkok, 10400, Thailand

\*\*College of Medicine, Rangsit University, Bangkok, 10400, Thailand

\*\*\*Research and Technology information, Rajavithi Hospital, Bangkok, 10400, Thailand

\*\*\*\*Biomolecular Laboratory, Department of Clinical Pathology and Medical Technology, Rajavithi Hospital, Bangkok, 10400, Thailand

(E-mail: wongpanuwat@gmail.com)

(Received: 17 May, 2023; Revised: 3 July, 2023; Accepted: 26 October, 2023)

### Abstract

**Background:** During the COVID-19 pandemic era, the isolation period is a critical issue for bed management in hospitals. The cut-off time for isolation is controversy in COVID-19 patients receiving steroid treatment because the shedding time might be longer than patients who did not receive. The purpose of this study was to determine the infectivity period of SARS-CoV-2 by detecting cultivable virus. **Objectives:** The primary endpoint was the correlation between viral culture result and cycle threshold (Ct) value from the RT-PCR test. The secondary aim was the different of Ct values in each group. **Methods:** The cross-sectional study was conducted in Rajavithi Hospital, Bangkok, Thailand. We collected nasopharyngeal swabs (NPS) from COVID-19 infected patients, having symptoms at least 2 weeks, received steroid treatment as immunomodulator and performed virus culture during August to September 2021. We categorized patients into 3 groups by symptom duration. **Results:** Nasopharyngeal swabs (NPS) from 27 patients were eligible. 15 (55.6%) were female patients. The age was  $64.7 \pm 15.7$  year-old. Their symptom's duration was  $29.7 \pm 11.6$  days. All patients received the dexamethasone or equivalent to  $12.4 \pm 4.4$  mg/day, with duration at  $18.6 \pm 8.3$  days. Also, 55.5% of patient received the methylprednisolone  $404.2 \pm 154.3$  mg/day, with  $2.8 \pm 1.6$  days. 23 (85%) patients had symptoms for over 20 days. All patients had SARS-CoV2- viral culture negatively. The value of Ct N gene ( $p = .27$ ) and Ct ORF1ab gene ( $p = .17$ ) were not difference among groups. IgM was detected in patients with symptom over 2 weeks. **Conclusion:** Our study showed the all patients had negative by viral culture. RT-PCR could be detected for more than 4 weeks and the Ct's value were not difference. All patients had seroconversion since infection more than 2 weeks. Therefore, the duration of illness with seroconversion might be useful for stop isolation.

**Keywords:** SARS-CoV-2shedding, Immunosuppressive drug, RT-PCR, Ct value, Isolation precaution

## บทคัดย่อ

**ภูมิหลัง:** ในช่วงการระบาดของโรคโควิด-19, เวลาในการยุติการกักตัวในผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตอร์รอยด์ในการรักษาโควิดยังไม่ชัดเจน เนื่องจากสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมไวรัสได้นานมากขึ้นและอาจส่งผลกระทบต่อการแพร่เชื้อ **วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของผลการเพาะเชื้อไวรัสและค่า cycle threshold (Ct) จาก RT-PCR และค่า Ct ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม **วิธีการ:** การศึกษาตัดขวาง ในโรงพยาบาลราชวิถี ช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน พ.ศ. 2564 โดยเก็บ NPS ส่งตรวจ RT-PCR และเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยโควิด-19 ที่มีอาการตั้งแต่ 14 วันขึ้นไป และรักษาด้วยยาสเตอร์รอยด์ โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่ม ตามระยะเวลาป่วย **ผล:** NPS จำนวน 27 รายที่เข้าเกณฑ์การศึกษา ผู้ป่วย 15 ราย (ร้อยละ 55.6) เป็นเพศชาย โดยมีค่าอายุเฉลี่ย  $64.7 \pm 15.7$  ปี มีอาการเฉลี่ย  $29.7 \pm 11.6$  วัน ผู้ป่วยทุกรายได้รับยาเดกซาเมทาโซนหรือเทียบเท่าเฉลี่ย  $12.4 \pm 4.4$  มก.ต่อวัน นาน  $18.6 \pm 8.3$  วัน ผู้ป่วยร้อยละ 55.5 ได้รับเมทิลพรีดนิโซโลนเฉลี่ย  $404.2 \pm 154.3$  มก.ต่อวัน นาน  $2.8 \pm 1.6$  วัน ผู้ป่วย 23 ราย (ร้อยละ 85) มีอาการป่วยมากกว่า 20 วัน ผลการเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จากผู้ป่วยทุกรายมีผลเป็นลบ ค่า Ct จากการตรวจ RT-PCR ไม่พบมีความแตกต่างกันทั้งสามกลุ่ม ผู้ป่วยที่มีอาการมากกว่า 2 สัปดาห์จะตรวจพบภูมิคุ้มกันโปรตีนหนามชนิดเอ็ม **สรุป:** จากการศึกษาพบว่าผลเพาะเชื้อไวรัสเป็นลบทุกราย การตรวจ RT-PCR สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยมีอาการมากกว่า 4 สัปดาห์ ค่า Ct ไม่ช่วยแยกระยะเวลาป่วย การตรวจพบภูมิคุ้มกันอาจนำมาใช้พิจารณาหยุดการกักตัวร่วมกับระยะเวลาป่วย

**คำสำคัญ:** แพร่กระจายของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2, สเตอรอยด์, RT-PCR, Ct value, การแยกผู้ป่วย

## unำ ( Introduction )

จากรายงานขององค์การอนามัยโลกช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2564 ที่มีจำนวนผู้ป่วยใหม่ที่เป็นโรคโควิด 19 มากขึ้นในชุมชนและส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่มีอาการหนัก ส่งผลให้จำนวนเตียงในโรงพยาบาลไม่เพียงพอต่อการรักษาผู้ป่วย จนทำให้มีการเปิดโรงพยาบาลสนามเพื่อทำให้การรักษาและการป้องกันการแพร่เชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น<sup>1</sup> การให้ผู้ป่วยกลับไปยังชุมชนเมื่ออาการดีขึ้นเพื่อทำให้มีจำนวนเตียงเพื่อรองรับผู้ป่วยแต่ในขณะเดียวกันต้องมีความมั่นใจว่าผู้ป่วยไม่สามารถแพร่เชื้อให้แก่บุคคลใกล้ชิดได้ มีคำแนะนำของ European Centre for Disease Prevention and Control เกี่ยวกับการยุติการกักตัวในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 ว่าระยะเวลาที่ควรยุติการกักตัวในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอย่างน้อย 14 ถึง 20 วัน นับจากวันที่เริ่มมีอาการหรือผลการตรวจ SARS-CoV-2 โดยวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมควรให้ผลลบน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชั่วโมง<sup>2</sup> แต่การตรวจหาสารพันธุกรรมสามารถให้ผลบวกได้นานเฉลี่ย 28 วัน จากเสมหะ<sup>3</sup> ซึ่งการใช้ข้อบ่งชี้ที่ 2 จึงเป็นไปได้น้อยในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง

ระยะเวลาในการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR เฉลี่ย 11-17 วัน โดยพบว่าปัจจัยที่มีทำให้ผลบวกนานขึ้น คือ ผู้ป่วยมีไข้สูง ได้รับยาสเตอร์รอยด์ ระยะเวลา ก่อนที่จะที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ผู้ป่วยเพศชาย ผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง ได้รับการรักษาที่ช่วยหายใจ และพบว่าอาจจะตรวจพบนานถึง 22 วันในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ<sup>4-6</sup> อย่างไรก็ตาม การศึกษาส่วนใหญ่ประเมินจากการผลตรวจ RT-PCR แต่การเพาะเชื้อไวรัสและให้ผลบวกจะมีความแม่นยำมากกว่า มีรายงานการตรวจไวรัสจากการเพาะเชื้อจะให้ผลเป็นลบในผู้ป่วยที่มีอาการนานกว่า 9 วัน แต่มีบางรายงานอาจตรวจพบไวรัสได้นานถึง 19 วันนับจากวันที่ได้รับการวินิจฉัย<sup>5,7</sup> อย่างไรก็ตาม การศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตอร์รอยด์ที่ตรวจการเพาะเชื้อไวรัสและเปรียบเทียบกับค่า Ct ของ target gene จากชุดน้ำยาที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ยังไม่ชัดเจน

เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเพาะเชื้อไวรัส การใช้ค่า cycle threshold (Ct) จากการตรวจ RT-PCR ได้นำมาใช้เพื่อช่วยพิจารณา ยุติการกักตัวผู้ป่วย พบว่าค่า Ct มากกว่า 33-34 ขึ้นไป สัมพันธ์กับการตรวจไม่พบเชื้อไวรัสจากการเพาะเชื้อ<sup>8</sup> คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดระดับค่า Ct เท่าไรที่จะปลอดภัยในการที่หยุดการกักตัว ในผู้ป่วยที่มีอาการตั้งแต่ 2 สัปดาห์และได้รับการรักษาด้วยยาสเตอร์รอยด์ เพื่อช่วยในการบริหารจัดการเตียงรักษาผู้ป่วยที่มีอาการหนักได้ดียิ่งขึ้นรวมทั้งเพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อเมื่อยุติการกักตัวในการย้ายผู้ป่วยไปยังหอผู้ป่วยสามัญ

## วัตถุประสงค์และวิธีการ (Materials and Methods)

การวิจัยนี้เป็นเป็นการศึกษาภาคตัดขวาง (cross-sectional study) ในลักษณะการพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย (routine to research) ซึ่งเกิดจากการดูแลผู้ป่วยโควิดที่มีอาการหนักส่งผลต่อ อัตราการครองเตียงและการจัดการเตียงผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชวิถี ที่ได้รับการตรวจการเพาะเชื้อไวรัสเพื่อประเมินความสามารถในการแพร่เชื้อ โดยเก็บรวบรวมข้อมูลจากเวชระเบียนย้อนหลัง มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า cycle threshold (Ct) จากการตรวจ RT-PCR ของเชื้อ SARS-CoV-2 กับผลการเพาะเชื้อ SARS-CoV-2 และปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อค่า Ct กับผลการเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยการศึกษาไม่ได้ศึกษาการแพร่เชื้อในผู้ป่วยกลุ่มเป้าหมาย ทำการศึกษาช่วงระหว่างเดือนสิงหาคมถึงกันยายน พ.ศ. 2564 ในผู้ป่วยโควิด-19 อายุ 18 ปีขึ้นไป มีอาการตั้งแต่ 14 วันขึ้นไปและได้รับการรักษาด้วยยาสเตอร์รอยด์ในการรักษาโควิด เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลราชวิถี โดยทำการเก็บสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกด้านหลัง (nasopharyngeal swab; NPS) และส่งตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และส่งตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR ที่ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา โรงพยาบาลราชวิถี ซึ่งใช้ชุดน้ำยา Bioperfectus Technologies SARS-CoV-2 Real

time PCR kit โดยมียื่นเป้าหมาย 2 ยีน ได้แก่ ORF1ab และ N (ตามมาตรฐานของ China CDC และตามข้อกำหนดของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ในกรณีที่ผลเป็นบวก จะนำ NPS ส่งตรวจเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยจะเก็บรวบรวมสิ่งส่งตรวจในช่วง 1 สัปดาห์ที่เข้าเกณฑ์ ณ วันที่ส่งจะแบ่งส่งตรวจบรรจุลงในภาชนะตามมาตรฐานความปลอดภัยและรักษาอุณหภูมิที่ 4-8 องศาเซลเซียส และจัดส่งภายใน 4-6 ชั่วโมง

สำหรับการเพาะเชื้อไวรัส จะใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Vero E6 TMPRSS2 อายุ 18-24 ชั่วโมงหรือเซลล์ที่เติบโตมากกว่าร้อยละ 80 ขึ้นไป โดยจะบ่มสิ่งส่งตรวจลงในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 5% CO<sub>2</sub> นาน 1 ชั่วโมง และบ่มเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 5-7 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม และประเมินการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) ทุก 24 ชั่วโมงโดยการเปรียบเทียบกับลักษณะเซลล์ปกติ (cell control) ในกรณีที่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะนำมาทดสอบด้วยวิธี RT-PCR เพื่อยืนยันอนุภาคไวรัส และรายงานผลเป็นบวก ในกรณีที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จะทำการเพาะเชื้อซ้ำ 3 รอบถ้ายังไม่พบการเปลี่ยนแปลงจะรายงานว่าเป็นลบ

นอกจากนี้ได้ส่งตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเพื่อทำการตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิดเอ็ม (IgM) ต่อโปรตีนหนาม (spike protein) ของไวรัส SARS-CoV-2 โดยชุดการตรวจ 6R87 ของบริษัท Abbott และภูมิคุ้มกันที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (neutralizing antibody) ชนิดจี (IgG) โดยชุดการตรวจ 6S60 ของบริษัท Abbott ที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี

การคำนวณขนาดตัวอย่าง อ้างอิงจากการศึกษาของ Fang Z และคณะ พบว่าอัตราการตรวจไม่พบเชื้อไวรัสโควิด 19 ที่ 15.2 วัน เท่ากับร้อยละ 95 ใช้สูตรคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อต้องการความชุกคือ  $Z^2_{\alpha/2} p(1-p)/d^2$  โดยกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ .05 โดยคาดว่าความชุกร้อยละ 5.2-25.2% จะต้องใช้กลุ่มตัวอย่างในการศึกษารวมทั้งหมด 73 คน แต่ในโครงการนี้สามารถเก็บข้อมูลที่ตรวจครบสมบูรณ์จำนวนประมาณ 30 ราย ที่มีการส่งเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในโรงพยาบาลราชวิถี

การเก็บข้อมูลโดยสืบค้นจากเวชระเบียนประกอบด้วย ข้อมูล 3 ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย เพศ อายุ โรคประจำตัว ส่วนที่ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อ ระยะเวลาในการรักษา ความรุนแรงของโรค ชนิดของยาที่ใช้ในการรักษา ยาสเตอรอยด์ ขนาดและระยะเวลาการได้รับยาสเตอรอยด์ ส่วนที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR, ค่า Ct ของ N gene, ผลการเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 และผลการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อไวรัส SARS-CoV-2 (IgM & IgG)

วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยด้วยสถิติเชิงพรรณนาโดยรายงานเป็นความถี่, ร้อยละ, mean  $\pm$ SD, median และ IQR ตามลักษณะของตัวแปรและการกระจายข้อมูล ค่าความชุก (prevalence) เป็นร้อยละ และ 95%CI เปรียบเทียบข้อมูลของผู้ป่วยกลุ่มที่ผลเพาะเชื้อเป็นบวกและกลุ่มที่ให้ผลเป็นลบ และค่า Ct ในแต่ละช่วงเวลาด้วยสถิติ Fisher's exact, t-test, Mann Whitney U-test และนำตัวแปรที่มีระดับนัยสำคัญน้อยกว่า .1 และตัวแปรที่คาดว่าจะปัจจัยของการให้ผลบวก หรือค่า Ct แต่ละช่วงเวลาเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วยสถิติ multiple logistic regression

การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในคน โรงพยาบาลราชวิถี เลขที่ 290/2564 ลงวันที่ 23 ธันวาคม พ.ศ. 2564

## ผล (Result)

กลุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีอาการตั้งแต่ 14 วัน และได้รับยาภูมิคุ้มกัน ได้ทำการคัดกรองในการศึกษาจำนวน 33 ราย พบว่า NPS จากคนไข้ 3 รายให้ผลเป็นลบจากการตรวจ RT-PCR จึงไม่ได้ส่งเพาะเชื้อ และ 3 รายที่ไม่ได้รับสเตอรอยด์ จึงมีผู้ป่วยที่เป็นไปตามเกณฑ์การคัดเข้าร่วมโครงการ จำนวน 27 ราย พบว่าเป็นผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้หญิง 15 คน (ร้อยละ 55.6) อายุเฉลี่ยเท่ากับ  $64.7 \pm 15.7$  ปี และมีโรคประจำตัว ร้อยละ 74.1 โดยพบว่าผู้ป่วยมีโรคประจำตัวเป็นเบาหวาน ร้อยละ 55 โรคไตวายเรื้อรัง ร้อยละ 30 ในด้านความรุนแรงของโรคผู้ป่วยต้องได้รับการช่วยเหลือด้วยออกซิเจน ร้อยละ 92.6 โดยส่วนใหญ่ได้รับการรักษาด้วย high flow nasal cannular (HFNC) ร้อยละ 52

ระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีอาการจนถึงได้รับการตรวจเพาะเชื้อ  $29.7 \pm 11.6$  วัน ระยะเวลาตั้งแต่ผู้ป่วยตรวจพบการติดเชื้อครั้งแรกถึงได้รับการเพาะเชื้อไวรัส  $26.8 \pm 12.7$  วัน และผู้ป่วยยังได้รับยาสเตอรอยด์ ในขณะที่ตรวจ ร้อยละ 88.9

การรักษาโรคโควิด ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ตามแนวทางการรักษาของกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขทุกรายได้รับการรักษาด้วยยาฟาวิพิราเวียร์ (flavipiravir) ร้อยละ 92.6 รองลงมาได้รับการรักษาด้วยโลพินาเวียร์/ริโทนาเวียร์ (lopinavir/ritonavir) และ เรมเดสซิเวียร์ (remdesivir) ร้อยละ 29.6 เท่ากัน ได้รับยาภูมิคุ้มกัน dexamethasone หรือ prednisolone ทุกราย ร้อยละ 100.0 และได้รับ methylprednisolone ร่วมด้วยร้อยละ 55.6 ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค โดยขึ้นอยู่กับดุลยพินิจในการรักษาของแพทย์ ผู้ป่วยได้สเตอรอยด์เทียบเท่า dexamethasone คือ  $12.4 \pm 4.4$  มิลลิกรัมต่อวัน ระยะเวลาเฉลี่ย  $18.6 \pm 8.3$  วัน และได้รับ methylprednisolone ร่วมด้วย  $40.4 \pm 15.3$  มิลลิกรัมต่อวัน และได้รับยาเฉลี่ย  $2.8 \pm 1.6$  วัน ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** คุณลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลร่วมกับการได้รับยาสเตอรอยด์ (n = 27)

ลักษณะทั่วไป	ผลลัพธ์
เพศหญิง (n, %)	15 (55.6)
อายุ (ปี)	64.7 ± 15.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) (n=28)	27.3 ± 5.2
โรคประจำตัว (n, %)	20 (74.1)
โรคเบาหวาน	11 (55.0)
โรคไตเรื้อรัง	6 (30.0)
โรคหัวใจ	2 (10.0)
อื่นๆ	17 (85.0)
<b>ความรุนแรงของโรค*</b>	
ไม่ได้รับการรักษาด้วยออกซิเจน	2 (7.4)
ได้รับการรักษาด้วยออกซิเจน	25 (92.6)
HFNC	13 (52.0)
Nasal cannular	6 (24.0)
ET tube with ventilator	6 (24.0)
ระยะเวลาที่มีอาการจนถึงได้รับการเพาะเชื้อ (วัน)	29.7 ± 11.6
ระยะเวลาตั้งแต่วินิจฉัยถึงได้รับการเพาะเชื้อ (วัน)	26.8 ± 12.7
วันนอนโรงพยาบาล (วัน)	33.1 ± 14.3
ได้รับยาสเตอรอยด์ในขณะที่ตรวจ (n,%)	24 (88.9)
ระยะเวลาของยาด้านไวรัสที่รักษา (วัน)	
Flavipiravir (n=25)	14 (11 - 14)
Boosted Lopinavir (n=8)	10 (8.5 - 14)
Remdesivir (n=8)	0 (0 - 5)
<b>จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับยาควบคุมภูมิคุ้มกัน (n,%)</b>	
Dexamethasone	27 (100)
Methylprednisolone	15(55.6)
Baricitinib	1 (3.7)
Dexamethasone	
dose (mg/days)	12.4 ± 4.4
duration (days)	18.6 ± 8.3
<b>Methylprednisolone</b>	
Dose (mg/days)	404.2 ± 154.3
Duration (days)	2.8 ± 1.6

ตารางแสดงด้วยจำนวน (ร้อยละ), Mean±SD, Median (Q1 – Q3), ET= endotracheal intubation, HFNC= High flow nasal cannular,

\*ความรุนแรงสูงสุดที่ระหว่างเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล

จากการศึกษาี้ ผู้ป่วยจำนวน 27 คน ตรวจไม่พบไวรัส SARS-CoV-2 จากการเพาะเชื้อไวรัสทุกราย โดยจำแนกผู้ป่วยตามระยะเวลาดังแต่มีอาการจนถึงได้ทำการเพาะเชื้อ ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) ผู้ป่วยที่มีอาการมา 14-20 วัน 2) ผู้ป่วยที่มีอาการมา 21-27 วัน และ 3) ผู้ป่วยที่มีอาการตั้งแต่ 28 วันขึ้นไป เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยจำแนกตามระยะเวลาดังแต่มีอาการ

จนถึงได้ทำการเพาะเชื้อพบว่า ระยะเวลาที่ได้รับยาเดกซามิทาโซล ในแต่ละกลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = .006) โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีอาการตั้งแต่ 4 สัปดาห์ขึ้นไปได้รับยานานเฉลี่ยนานมากที่สุดคือ 24.9±9.9 วัน มากกว่าผู้ป่วยที่มีอาการตั้งแต่ 2 - 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยจำแนกตามระยะเวลาตั้งแต่มีอาการจนถึงได้ทำการเพาะเชื้อ (n = 27)

คุณลักษณะทั่วไป	A: 14-20 วัน (n=4)	B: 21-27 วัน (n=13)	C: ≥ 28 วัน (n=10)	p-value
อายุ (ปี)	65.3±23.0	61.0±15.4	69.4±13.0	.459
เพศหญิง	2 (40)	8 (61.5)	5 (55.6)	.834
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.8±4.1	28.2±6.8	26.8±3.5	.700
จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับ สเตอรรอยด์ขณะตรวจ	4 (100.0)	13 (100.0)	7 (70.0)	.057
การรักษาด้วยออกซิเจน	4 (100.0)	12 (100.0)	9 (90.0)	.753
HFNC	2 (50.0)	6 (50.0)	5 (50.0)	
Nasal cannular	2 (50.0)	2 (16.7)	2 (25.0)	
ET-Tube	0 (0.0)	4 (33.3)	2 (25.0)	
ระยะเวลาป่วยก่อนเข้ารับ การรักษาในรพ. (วัน)	2.0±1.2	7.1±4.3	9.9±15.1	.400
ระยะเวลาการรักษาในรพ.(วัน)	28.0±15.0	29.1±13.0	40.5±14.0	.120
Dexamethasone	4 (100.0)	13 (100.0)	10 (100.0)	N/A
Duration (days)	14.8 ± 1.3	14.9 ± 4.9	24.9 ± 9.9	.006*
Dose (mg/day)	14.1 ± 3.9	13.8 ± 3.9	9.8 ± 4.3	.063
Methylprednisolone	1 (25)	9 (69.2)	5 (50.0)	.270
Duration (days)	3.0±0.0	3.1±1.9	2.2±0.8	.611
Dose (mg/day)	250±0.0	451.4±158.0	350±136.9	.314
Flavipiravir (n,%)	4 (100)	11 (84.6)	10 (100)	.313
Duration (days)	12.0 ± 2.3	11.4 ± 5.2	14.4 ± 5.0	.340
Remdesivir (n,%)	1 (25)	4 (30.8)	3 (30.0)	.975
Duration (days)	0 (0-7.5)	0 (0-5)	0 (0-5.0)	.961
Ct of ORF lab gene	27.6 ± 8.6	32.6 ± 3.8	33.4 ± 3.7	.166
Ct of N gene	27.5 ± 6.2	31.8 ± 4.1	31.2 ± 4.5	.266
ระดับของ Ig G (x 10 <sup>3</sup> AU/ml)	3.8 (1.0 – 14.3)	10.9 (2.38.9 – 2)	2.6 (22.2 – 1.1)	.453
การตรวจพบ Ig M	4 (100)	13 (100)	9 (90.0)	.414

ตารางแสดงด้วยจำนวน (ร้อยละ), Mean±SD, Median (Q1 – Q3), \*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<.05

ค่าเฉลี่ย Ct ของ ORF lab and Ct-N gene จากการตรวจ RT-PCR ทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p = .166, p = .266 ตามลำดับ) ระดับของ IgG จะตรวจพบสูงสุดในผู้ป่วยติดเชื้อในช่วงสัปดาห์ที่ 3-4 รองลงมาเป็นผู้ที่ติดเชื้อในสัปดาห์ที่ 2-3 แต่ต่ำสุดในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมากกว่า 4 สัปดาห์ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p = .453) การตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนหนามชนิดเอ็มสามารถตรวจพบได้ทุกรายในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมากกว่า 2 สัปดาห์ไปจนถึง 4 สัปดาห์ และการพบลดลงเหลือร้อยละ 90.0 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมากกว่า 4 สัปดาห์

## วิจารณ์ (Discussion)

ในการศึกษานี้เป็นงานวิจัยตัดขวาง ทำการเก็บสืบค้นข้อมูลย้อนหลัง ในการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธีการเพาะเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับยาด้วยสเตอรรอยด์และได้รับการรักษาเป็นเวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ โดยระยะเฉลี่ยนับจากมีอาการ 29.7±11.6 วัน และแบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่มตามระยะเวลาตั้งแต่มีอาการ พบว่า ผู้ป่วยทั้ง 27 ราย ไม่มีผู้ป่วยรายใดให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ World Health Organization พบว่าสามารถเพาะเชื้อในผู้ป่วยที่มีอาการ 5-11 วัน ในบางรายอาจจะมีมากถึง 20 วันที่มีผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ จากการศึกษานี้ผู้ป่วยมีอาการตั้งแต่ 14 วัน ไม่สามารถตรวจพบไวรัสได้จากการเพาะเชื้อ



แต่อย่างไรก็ตามประชากรส่วนใหญ่ในการศึกษานี้คือผู้ป่วยที่มีอาการ 3-4 สัปดาห์

จากการศึกษาของ Suire D. และคณะทำการศึกษาในผู้ป่วยโควิดในสถานดูแลผู้สูงอายุ ที่มีอายุเฉลี่ย 82 ปี จำนวน 17 ราย มีเพียง 9 ราย (52.9%) ที่ให้ผลเพาะเชื้อไวรัสเป็นบวก โดยส่วนใหญ่ร้อยละ 89 จะเพาะเชื้อขึ้นเมื่อได้รับการวินิจฉัยน้อยกว่า 8 วัน มีเพียง 1 คนที่สามารถเพาะเชื้อได้หลังจากวินิจฉัยได้ 19 วัน<sup>5</sup> ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่ระยะเวลาที่ได้รับการวินิจฉัยเฉลี่ย 26.8 วัน แม้ว่าจะมีอายุเฉลี่ยน้อยกว่า แต่ผู้ป่วยได้รับสเตอรอยด์ในขนาดที่สูงซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน

เนื่องจากการเพาะเชื้อไวรัสมีข้อจำกัดในเรื่องเครื่องมือและระยะเวลา จึงไม่เหมาะที่จะทำในผู้ป่วยทุกรายที่จะประเมินเรื่องแพร่เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ได้ การศึกษาส่วนใหญ่จะใช้การตรวจค่า cycle threshold (Ct) จากการตรวจ RT-PCR ในการประเมินเพื่อหยุดการกักตัว โดยให้คำแนะนำว่าผลการตรวจ RT-PCR 2 ครั้งให้ผลเป็นลบ ห่างกันอย่างน้อย 24 ชั่วโมงจึงจะสามารถหยุดกักตัว<sup>2</sup> ซึ่งทำให้เป็นอุปสรรคในการดูแลผู้ป่วยแก่บุคลากรทางการแพทย์ และตัวผู้ป่วยที่จะกังวลในการแพร่กระจายเชื้อให้บุคคลข้างเคียงจากการศึกษาของ Bernard LS และคณะ พบว่า ค่า Ct E gene (ซึ่งเป็น Enveloped protein ของเชื้อ SARS-CoV-2) จากการตรวจ RT-PCR เท่ากับ 33-34 ให้ผลการเพาะเชื้อไวรัสเป็นลบซึ่งไม่สามารถแพร่กระจาย ส่งผลให้สามารถจำหน่ายผู้ป่วยได้<sup>8</sup> แต่ในการศึกษานี้พบว่า ค่าเฉลี่ย Ct ของ ORF lab จะมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 33 ในผู้ป่วยที่อาการน้อยกว่า 4 สัปดาห์ ในขณะที่ค่าเฉลี่ย N gene มีค่าน้อยกว่า 33 ในผู้ป่วยทุกกลุ่ม แม้ผลการเพาะเชื้อไวรัสให้ผลเป็นลบ

จากคำแนะนำของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกาศวันที่ 23 กรกฎาคม พ.ศ. 2563 ได้แนะนำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ RT-PCR ในการตรวจหาชิ้น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ถ้าใช้การตรวจ E-gene ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม Sarboecoviruses ต้องตรวจชิ้นตำแหน่งที่ 2 ที่จำเพาะต่อ SARS-CoV-2ไวรัสด้วย เช่น ORF1a, ORF1b, N และ S gene หรือแบบที่ 2 ตรวจหาชิ้นจำเพาะต่อ SARS-CoV-2 อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง<sup>10</sup> จึงทำให้ไม่ได้ตรวจ E-gene ตามการศึกษา Bernard LS และคณะ ซึ่งอาจจะทำให้ค่ามีความแตกต่างกันได้

จากการศึกษาของ Tong-Zeng Li และคณะ ในการหาระยะเวลาในการตรวจพบ SARS-CoV-2 จาก RT-PCR และปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจพบ พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจพบที่ 8-14.3 วันนับจากวันที่มีอาการ โดยที่ปัจจัยที่มีผลทำให้ตรวจพบไวรัสได้นานขึ้นคือ ผู้ป่วยมีไข้มากกว่า 38.5°C การได้รับสเตอรอยด์และระยะเวลาที่มีอาการจนถึงเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล<sup>6</sup> และจากการศึกษาของ Yanfei Chen และคณะ พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา

corticosteroid ขนาดกลาง 1.0-2.0 mg/kg และขนาดสูง 200-400 mg เป็นระยะเวลา 3 วันจะตรวจพบเชื้อไวรัสจากการตรวจ RT-PCR 21 และ 20 วันตามลำดับซึ่งนานกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับสเตอรอยด์หรือได้ขนาดน้อยกว่า 1.0 mg/kg ที่ตรวจพบที่ 15 และ 18 วันตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ<sup>11</sup> ซึ่งในการศึกษานี้พบว่ายังสามารถตรวจพบได้แม้ว่าผู้ป่วยจะมีอาการมากกว่า 4 สัปดาห์ ซึ่งระยะเวลาในการตรวจพบนานกว่าการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งอาจจะเป็นผลจากที่ผู้ป่วยได้รับสเตอรอยด์เป็นระยะเวลานานเฉลี่ย 18.6 วัน

จากงานวิจัยของ Surie D และคณะที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าผู้ป่วยที่ให้ผลเป็นบวกต่อการเพาะเชื้อจะตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนหนาม (spike protein) ของไวรัสโควิด<sup>5</sup> ซึ่งผลของงานวิจัยนี้สนับสนุนการศึกษาวิจัยดังกล่าว คือ ตรวจพบภูมิคุ้มกันชนิดเอ็ม (Ig M) ต่อโปรตีนหนาม (spike protein) ทุกรายในช่วงเวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไปจนถึง 4 สัปดาห์ที่ให้ผลเป็นลบต่อการเพาะเชื้อไวรัส และตรวจไม่พบร้อยละ 10 ในผู้ป่วยที่มีอาการนานกว่า 4 สัปดาห์

ข้อจำกัดในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ งานวิจัยเป็นงานวิจัยเชิงสังเกต งานวิจัยตัดขวาง ซึ่งมีข้อจำกัดเรื่องไม่ทราบระยะเวลาแน่ชัดที่การตรวจเพาะเชื้อไวรัสให้ผลเป็นลบที่แน่นอน เนื่องจากการเก็บสิ่งส่งตรวจเพียงครั้งเดียว ไม่ได้เก็บส่งตรวจเพาะเชื้อเป็นระยะ จำนวนประชากรที่น้อยกว่าที่ได้คำนวณไว้ ที่มีผลต่ออำนาจในการตรวจสอบสมมติฐาน แต่งานวิจัยนี้มีข้อเด่นคือ ผู้ป่วยทุกรายได้รับการเพาะเชื้อ เป็นผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตอรอยด์ขนาดสูงจากการรักษาจริง และทำการศึกษาในสถานการณักรักษาจริงแต่มีข้อจำกัดในการส่งตรวจเพาะเชื้อเป็นระยะ อย่างไรก็ตามทางผู้จัดทำมีข้อเสนอแนะให้มีการศึกษาต่อไปในอนาคตโดยมีการออกแบบวิจัยแบบการติดตามไปข้างหน้า และเพิ่มจำนวนผู้ป่วยมากขึ้น

## สรุป (Conclusion)

จากการศึกษานี้พบว่า ผลเพาะเชื้อไวรัสเป็นลบทุกราย การตรวจ RT-PCR สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยมีอาการมากกว่า 4 สัปดาห์ ค่า Ct ไม่ช่วยแยกระยะเวลาป่วย จึงไม่ควรใช้ผลค่า Ct การตรวจ RT-PCR ในการตัดสินว่าผู้ป่วยไม่แพร่เชื้อเพียงอย่างเดียวในการยุติการกักตัว การตรวจพบภูมิคุ้มกันอาจจะเอามาใช้พิจารณาหยุดการกักตัวร่วมกับระยะเวลาป่วย

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.พิไลลักษณ์ อัครไพฑูริย์ โอภาส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่อนุเคราะห์การตรวจเพาะเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 แพทย์ประจำบ้านอายุรกรรม และแพทย์ประจำบ้านอายุรกรรมโรคติดเชื้อ ที่ช่วยในการเก็บสิ่งส่งตรวจ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี ที่ช่วยในการตรวจวิเคราะห์หาภูมิคุ้มกันต่อไวรัส SARS-CoV-2

## เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization Country Office for Thailand. Coronavirus disease 2019 (COVID-19), Thailand situation update No.198 [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 1]. Available from: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/searo/thailand/2021\\_08\\_26\\_eng-sitrep-198-covid19.pdf?sfvrsn=465abbe5\\_6](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/searo/thailand/2021_08_26_eng-sitrep-198-covid19.pdf?sfvrsn=465abbe5_6)
2. Guidance for discharge and ending of isolation of people with COVID-19. Tech Rep.[Internet].2021 [cited 2021 Nov 12]:Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Guidance-for-discharge-and-ending-of-isolation-of-people-with-COVID-19.pdf>.
3. Mallett S, Allen AJ, Graziadio S, Taylor SA, Sakai NS, Green K, et al. At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data. *BMC Med* 2020;18(1):346.
4. Xu K, Chen Y, Yuan J, Yi P, Ding C, Wu W, et al. Factors associated with prolonged viral RNA shedding in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2020;71(15):799–806.
5. Surie D, Huang JY, Brown AC, Gable P, Biedron C, Gilbert SE, et al. Infectious period of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 in 17 nursing home residents—Arkansas, June–August 2020. *Open Forum Infect Dis* 2021;8(3):48.
6. Li TZ, Cao ZH, Chen Y, Cai MT, Zhang LY, Xu H, et al. Duration of SARS-CoV-2 RNA shedding and factors associated with prolonged viral shedding in patients with COVID-19. *J Med Virol* 2021;93(1):506-12.
7. 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 Microbe* 2021;2(1):e13-e22.
8. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020;39(6):1059-61.
9. Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation [Internet]. [cited 2021 Nov 3]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/criteria-for-releasing-covid-19-patients-from-isolation>
10. Department of Medical Sciences. Guidelines for the management of laboratory testing and reporting of COVID-19 with a single laboratory system [Internet]. 2020. [cite 2021 Nov 12]. Available from: <https://www3.dmsc.moph.go.th/post-view/862>
11. Chen Y, Li L. Influence of corticosteroid dose on viral shedding duration in patients with COVID-19. *Clin Infect Dis* 2021;72(7):1298-300.