

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19

<https://www.nature.com/articles/s41467-021-22034-1>

## การติดเชื้อ SARS-CoV-2 เหนียวนานำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสารน้ำในระยะยาวในผู้ป่วยระยะฟื้นตัวหลังจากป่วยด้วยโควิด 19 แบบแสดงอาการ

### บทคัดย่อ

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและกัมมันตภาพรังสีการกำจัดเชื้อในระยะยาวซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นเรื่องที่ยังไม่ทราบแน่ชัด ในที่นี้เราทำการระบุปริมาณของสารภูมิต้านทานอิมมูโนโกลบูลิน M (IgM) และ G (IgG) ซึ่งระบุส่วนยึดจับตัวรับ (RBD) ของโปรตีนส่วนหนาม (S) หรือนิวคลีโอแคปซิด (N) ของ SARS-CoV-2 และสารภูมิต้านทานกำจัดเชื้อในระหว่างช่วง 6 เดือนนับจากเริ่มเป็นโรคโควิด 19 ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการจำนวน 349 คน ซึ่งเป็นผู้ติดเชื้อกลุ่มแรกๆ จากทั่วโลก อัตราผลบวกและระดับการตอบสนองของ IgM-S และ IgG-N เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ระดับของ IgM-S/N และ IgG-S/N ที่สูงในช่วง 2-3 สัปดาห์หลังจากเริ่มเป็นโรคมีความสัมพันธ์กับการควบคุมไวรัส และค่าไตเตอร์ IgG-S มีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับความสามารถในการกำจัดเชื้อ SARS-CoV-2 แม้ไม่สามารถตรวจพบ IgM-S/N ที่เจาะจงในช่วง 12 สัปดาห์หลังจากเริ่มเป็นโรคได้ในผู้ป่วยส่วนใหญ่ และค่าไตเตอร์ IgG-S/N มีช่วงการลดในระยะกลาง แต่มีความเสถียรที่ระดับค่อนข้างสูงตลอดระยะเวลา 6 เดือนของการสังเกต ในส่วนท้ายของช่วงเวลา ยังคงพบอัตราผลบวกของสารภูมิต้านทานเจาะจง SARS-CoV-2 ชนิดดักจับและกำจัดเชื้อ >70% ข้อมูลเหล่านี้บ่งบอกว่าผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการและฟื้นตัวแล้วมีภูมิคุ้มกันในสารน้ำในระยะยาว ซึ่งบ่งบอกถึงการมีภูมิคุ้มกันในระยะยาว

### บทนำ

ณ วันที่ 18 มกราคม 2021 จำนวนเคสที่ยืนยันแล้วทั่วโลกของโรคโคโรนาไวรัส 2019 (โควิด 19) ได้เพิ่มถึง 93.8 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตที่ทราบมากกว่า 2,026,093 คน<sup>1</sup> ในเดือนธันวาคมปี 2019 มีการระบุเชื้อซาร์บีโคไวรัสชนิดโคโรนาไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง 2 (SARS-CoV-2) ว่าเป็นจุลชีพที่ก่อโรคโควิด 19 ไวรัสดังกล่าวได้ระบาดทั่วโลกในอัตราที่รวดเร็วอย่างมาก การระบาดของโควิด 19 เป็นความท้าทายทางการแพทย์รวมไปถึงทางสังคมและเศรษฐกิจที่ยิ่งใหญ่ที่สุดในช่วงชีวิตของเรา ไม่มียาต้านไวรัสที่ได้ผลเพียงพอในการรักษาผู้ป่วยโควิด 19 การตัดสินใจเรื่องต่างๆ และการพัฒนาวัคซีน จะต้องเข้าใจถึงระยะเวลาที่ภูมิคุ้มกัน SARS-CoV-2 สามารถคงอยู่ในผู้ติดเชื้อ และเข้าใจว่าการสร้างสารภูมิต้านทานซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อตามธรรมชาติจะทำให้เกิดภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ซ้ำได้หรือไม่

เท่าที่เราทราบ ช่วงเวลาการสังเกตสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับสารภูมิต้านทานเจาะจง SARS-CoV-2 คือไม่เกิน 12 สัปดาห์<sup>2</sup> และยังคงไม่เป็นที่แน่ชัดว่าค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานอาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรในระยะเวลาหลังจากนั้น เนื่องจากการใช้วิธีตรวจที่แตกต่างกัน (เช่น การใช้ชุดตรวจชนิดเอนไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ หรือการจับโมเลกุลในการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันจากการเปล่งแสงจากปฏิกิริยาเคมี (CLIA)) การวิเคราะห์สารภูมิต้านทานชนิดย่อยที่ต่างกัน (อิมมูโนโกลบูลิน G (IgG), IgM หรือ IgA) และการมุ่งเน้นที่แอนติเจนและเอพิโทปชนิดต่างกัน (N, S หรือส่วนยึดจับตัวรับ [RBD] ของ S) จึงไม่มีคำอธิบายที่สอดคล้องกันสำหรับการตอบสนองทาง

ภูมิคุ้มกันของสารนำหลังจากการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ตามธรรมชาติ การศึกษาระยะสั้นได้แสดงผลที่สอดคล้องกันว่าการเกิดภูมิ IgG และ IgM จะเกิดขึ้นในช่วงประมาณ 2–3 สัปดาห์หลังจากเริ่มเป็นโรค<sup>3</sup> และระดับ IgM ลดลงก่อนค่าไตเตอร์ IgG อย่างเห็นได้ชัด<sup>4</sup> อย่างไรก็ตาม ไม่เป็นที่แน่ชัดว่าสารภูมิต้านทานชนิดใด (IgG หรือ IgM) ที่มีผลมากที่สุดในการระบุทางระบาดวิทยาสำหรับผู้ป่วยที่ฟื้นตัว ผู้จัดทำบางรายระบุว่า IgG สำคัญกว่า<sup>3,4</sup> ในขณะที่รายอื่นๆ เสนออัตราผลบวกที่สูงกว่าสำหรับ IgM<sup>5</sup> นอกจากนี้ การตอบสนองของ IgM สูงสุดที่มีการรายงานยังมาจากช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 2 ถึง 5 สัปดาห์<sup>2,3,5</sup>

จนถึงขณะนี้ การศึกษาที่ทำการวิเคราะห์ผู้ป่วยเพียงไม่กี่รายหรือมีช่วงเวลาการสังเกตเพียงไม่กี่สัปดาห์เสนอว่าระดับสารภูมิต้านทานในผู้ที่ติดเชื้ออาจลดลงอย่างรวดเร็ว<sup>6</sup> เรื่องนี้เป็นที่อภิปรายอย่างมากทั่วโลก เนื่องจากอาจเป็นประเด็นที่สำคัญอย่างยิ่งเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันหลังจากการติดเชื้อตามธรรมชาติรวมถึงการพัฒนาวัคซีน อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาระยะยาว เนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะลดลงเสมอหลังจากการติดเชื้อระยะเฉียบพลัน ซึ่งไม่ได้เป็นการทำนายถึงระยะเวลาที่สามารถตอบสนองเชิงป้องกันได้

SARS-CoV-2 มีจีโนมของ RNA แบบโพลีที่ฟอสเฟตสายเดี่ยว ซึ่งเข้ารหัสโปรตีนที่เป็นโครงสร้างและไม่ใช่โครงสร้าง ซึ่งรวมถึงโปรตีนหนาม (S) และนิวคลีโอแคปซิด (N)<sup>7</sup> ส่วนหนึ่งของโปรตีนทรานส์เมมเบรน S ปรากฏบนพื้นผิวของอนุภาคไวรัสครบถ้วน และจับกับตัวรับเข้า ACE2 ซึ่งเป็นตัวกลางในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย<sup>8</sup> ขณะที่โปรตีน N ที่มีมากมายจะจับกับ RNA ของไวรัสภายในอนุภาคไวรัส งานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับโรคซาร์สและโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลางได้แสดงให้เห็นว่า IgG มีการตอบสนองซึ่งระบุส่วน S และ N ในลักษณะที่แตกต่างกันทั้งในแง่เวลาตอบสนอง ระยะเวลา และค่าไตเตอร์<sup>9,10</sup> ในบางโรค เช่น การติดเชื้อไวรัสโรคไขเลือดออก สารภูมิต้านทานชนิดดักจับซึ่งไม่ใช่ชนิดก่อกำจัดเชื้อมีความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่แย่กว่า เนื่องจากการเร่งโดยอาศัยสารภูมิต้านทาน (ADE) ซึ่งบ่งบอกว่าอย่างน้อยที่สุดในบางกรณีสารภูมิต้านทานอาจมีความสัมพันธ์กับผลที่ไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยบางราย ได้มีการอภิปรายถึง ADE ในบริบทของ SARS-CoV-2 เมื่อไม่นานมานี้<sup>11</sup> สารภูมิต้านทานที่สูงขึ้นยังมีความสัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น<sup>2</sup> ของผู้ป่วยโควิด 19 เช่นกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาซึ่งใช้ระบบอิงอนุภาคไวรัสเทียม<sup>12,13</sup> บ่งบอกว่าพลาสมาที่ได้จากผู้ป่วยที่ฟื้นตัวมีกิจกรรมก่อกำจัดเชื้อที่ออกฤทธิ์สูง ซึ่งเกี่ยวข้องกับโมเลกุล IgG ระบุ RBD ของโปรตีน S ซึ่งบ่งบอกว่ามีแนวโน้มสูงที่สารภูมิต้านทาน IgG-RBD-S จะช่วยเสริมการทำงานในการก่อกำจัดเชื้อ (nAb) การศึกษาตามรุ่นแบบกลุ่มเล็กบางกลุ่มเสนอว่าผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีอาการรุนแรงได้รับประโยชน์จากการรักษาด้วยพลาสมาของผู้ที่ฟื้นจากโรค (CP)<sup>14</sup> เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการคัดแยกและระบุคุณสมบัติของสารภูมิต้านทานก่อกำจัดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ออกฤทธิ์สูงจากผู้ป่วยโควิด 19<sup>15,16</sup> ด้วยเหตุนี้ สารภูมิต้านทานเจาะจงไวรัสจึงน่าจะมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับภูมิคุ้มกัน ในแง่การติดเชื้อ SARS-CoV-2 รวมถึงการพัฒนาของโรคโควิด 19 อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องศึกษาให้ชัดเจนว่าสารภูมิต้านทานชนิดดักจับและก่อกำจัดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางจลนพลศาสตร์อย่างไรทั้งในระหว่างและหลังจากเป็นโรคโควิด 19

ในผลงานชิ้นนี้ เราได้ระบุลักษณะทางจลนพลศาสตร์และระดับการตอบสนองต่อ SARS-CoV-2 ของสารภูมิต้านทานในช่วงเริ่มแรก ในกลุ่มร่วมร่นขนาดใหญ่ของผู้ป่วยโควิด 19 แบบแสดงอาการจากเมืองอู่ฮั่น ที่สำคัญที่สุดคือ ผู้ป่วยเหล่านี้หลายรายซึ่งเป็นกลุ่มแรกๆ ที่ติดเชื้อ SARS-CoV-2 จากทั่วโลก ได้รับการติดตามผลเป็นเวลาหลายเดือน เพื่อวัดการคงอยู่ของการตอบสนองของสารภูมิต้านทานต่อ SARS-CoV-2 เราทำการประเมินการตอบสนองของ IgM และ IgG ต่อ RBD ของโปรตีน S และโปรตีน N ต่อเนื่องในระยะยาวหลังจากเริ่มปรากฏอาการของโควิด 19 มีการศึกษาถึงการปรากฏของสารภูมิต้านทานและกิจกรรมก้ำจืดเชื้อเหล่านี้ของพลาสมาตลอดระยะเวลา 26 สัปดาห์ ผลของการศึกษานี้ได้ให้พื้นฐานการทดลองในการประเมินการเริ่มพบและระยะเวลาของภูมิคุ้มกันในสารน้ำในผู้ป่วยโควิด 19 เพื่อสนับสนุนการพัฒนาและวัคซีนที่ใช้ในทางคลินิก รวมถึงการตัดสินใจในแง่กลยุทธ์เพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคมและเศรษฐกิจ

## ผลลัพธ์

### จลนพลศาสตร์และระดับการตอบสนองต่อ SARS-CoV-2 ของสารภูมิต้านทาน

เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของสารภูมิต้านทานต่อ SARS-CoV-2 ในระยะยาว ได้มีการรวบรวมตัวอย่างทั้งหมด 585 ชุดจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการจำนวน 349 คน โดยรวบรวมภายในเวลาสูงสุด 26 สัปดาห์หลังจากเริ่มเป็นโรค เพื่อนำไปวิเคราะห์ IgM และ IgG ระบุ RBD ของโปรตีน S (แสดงด้วยค่า IgM-S และ IgG-S ตามลำดับ) เช่นเดียวกับ IgM และ IgG ตักจับโปรตีน N (IgM-N และ IgG-N ตามลำดับ) ระบบการทดสอบใช้วิธีการจับโมเลกุล CLIA

ในระหว่างการแพร่ระบาดช่วงแรกในเมืองอู่ฮั่น วิธีการตรวจโดยอาศัยกรดนิวคลีอิกจะต้องเสริมด้วยชุดตรวจสารภูมิต้านทานเสมอ ในการวิเคราะห์กรณีที่น่าสงสัยว่าเป็นโรคโควิด 19 ผู้ป่วยที่ได้รับการวิเคราะห์ทั้งหมดในการศึกษานี้แสดงอาการของโควิด 19 ในระหว่างสัปดาห์แรกหลังจากเริ่มปรากฏอาการ ได้ผลตรวจสารภูมิต้านทานสี่ชนิดเป็นบวกโดยมีความถี่แตกต่างกัน: IgM-S (67%) > IgG-N (33%) > IgM-N (22%) > IgG-S (11%) (ภาพประกอบ [1a](#)) อัตราผลบวกสำหรับ IgM-S ถึงจุดสูงสุดที่ 95% ในสัปดาห์ที่ 5 จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือ 0% ในสัปดาห์ที่ 13 โดยมีการแปรปรวนในช่วงต่ำกว่า 35% หลังจากนั้น สามารถตรวจพบ IgM-N ใน 72% ของผู้ป่วยในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นตัวเลขดังกล่าวลดลงอย่างรวดเร็ว และตรวจจับ IgM-N ไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 10 และ 12 ตามด้วยความแปรปรวนที่ไม่มีนัยสำคัญโดยมีอัตราผลบวกต่ำมาก IgG-S เป็นบวกอยู่แล้วในผู้ป่วย 98% ในสัปดาห์ที่ 3 และยังคงมีค่าเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างสูงจนกระทั่งสิ้นสุดช่วงเวลาการสังเกตในสัปดาห์ที่ 26 อัตราผลบวกของ IgG-N เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง 88% ของผู้ป่วย ในสัปดาห์ที่ 2 และคงอยู่ในระดับสูงมากหลังจากนั้น

จาก: การติดเชื้อ SARS-CoV-2 เหนียวนาให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสารน้ำในระยะยาว  
ในผู้ป่วยระยะฟื้นตัวหลังจากป่วยด้วยโควิด 19 แบบแสดงอาการ



ตรวจพบ IgM และ IgG ต่อ RBD ของโปรตีนหนาม ("S") และนิวคลีโอโปรตีน ("N") ของ SARS-CoV-2 ของตัวอย่าง 585 ชุดที่รวบรวมจากผู้ป่วย 349 คน ด้วยวิธีการจับโมเลกุลในการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันจากการเปล่งแสงจากปฏิกิริยาเคมี (CLIA) **a** ทำการตรวจอัตราผลบวกของสารภูมิคุ้มกันของบุคคล ณ วันที่ระบุไว้ หลังจากเริ่มปรากฏอาการ **b, c** แสดงระดับสารภูมิคุ้มกันด้านทานในพลาสมาของ IgM-S (สีแดง), IgM-N (สีฟ้า), IgG-S (สีเขียว) และ IgG-N (สีน้ำเงินเข้ม) ในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะต่างๆ ของโรค เส้นจะแสดงค่าเฉลี่ยที่คาดจากโมเดลถดถอยวิธี LOWESS โดยพื้นที่แรเงาแทนช่วงเชื่อมั่น 95% ใน **b** กรอบใน **c** แสดงค่ามัธยฐาน (เส้นกลาง) ควอร์ไทล์ 75% (เขตบน) และควอร์ไทล์ 25% (เขตล่าง) และวิสเกอร์แสดงค่า  $1.5\times$  ของ IQR เหนือและใต้กรอบตารางได้ภาพแสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา **d** การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ค่าไตเตอร์สารภูมิคุ้มกันแบบต่อเนื่องในผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 60 เคส ลักษณะเฉพาะของผู้ป่วยสองคนที่มีระดับสารภูมิคุ้มกันด้านทาน IgG ต่ำ ผู้ป่วย 13: ผู้หญิงอายุ 46 ปี มีอาการไข้ ไอ มีน้ำมูก และอ่อนล้าเป็นเวลา 6 วัน ผู้ป่วย 17: ผู้หญิงอายุ 38 ปี มีอาการไข้และแน่นหน้าอกเป็นเวลา 4 วัน ค่าคัทออฟสำหรับการตรวจจับ IgM-S คือ 0.7 AU/มล. ค่าคัทออฟสำหรับ IgM-N, IgG-S และ IgG-N คือ 1 (แสดงบนแกน Y ทางซ้าย)



เราได้ทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมว่าการตรวจสารภูมิต้านทานรวมมีส่วนสนับสนุนการวินิจฉัยทางคลินิกหรือไม่ (ภาพประกอบเสริม [1](#)) การตรวจ IgM-S และ IgM-N รวมกันไม่ได้เพิ่มความไวเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจ IgM-S เพียงอย่างเดียว เมื่อรวม IgG-S และ IgG-N จะทำให้อัตราผลบวกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ IgG-S หรือ IgG-N เพียงอย่างเดียวในบางช่วงเวลา ซึ่งบ่งบอกถึงประโยชน์ในการวินิจฉัย สิ่งที่น่าสนใจคือการศึกษาก่อนหน้านี้<sup>3</sup> คือ การรวม IgM-S, IgM-N, IgG-S และ IgG-N ทำให้ได้อัตราผลบวกเข้าใกล้ 100% หลังจากสัปดาห์ที่ 4 อาจเรียกได้ว่าผู้ป่วยโควิด 19 ทุกคนมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SARS-CoV-2 ในสารน้ำที่สามารถตรวจพบได้

เรายังได้ระบุพลวัตของค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานที่เจาะจงในระหว่าง 26 สัปดาห์หลังจากเริ่มปรากฏอาการในผู้ป่วยโควิด 19 (ภาพประกอบ [1b, c](#)) ที่น่าสนใจคือ IgM-S และ IgG-S ถึงค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 จากนั้นค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งค่าเฉลี่ยเหลือน้อยกว่าค่าคัทออฟในสัปดาห์ที่ 12 หลังจากถึงค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ค่าไตเตอร์ของ IgM-N ลดลงอย่างรวดเร็วจนต่ำกว่าค่าคัทออฟหลังจากประมาณ 9 สัปดาห์ ค่าไตเตอร์ของ IgG-N และ IgG-S ถึงค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ตามลำดับ หลังจากช่วงการลด ซึ่งค่าไตเตอร์ลดลงอย่างคงที่ในระหว่างสัปดาห์ที่ 6–14 ค่าไตเตอร์ IgG-N และ IgG-S มีความเสถียรและคงอยู่ในระดับสูงจนกระทั่งสิ้นสุดช่วงเวลาการสังเกต 26 สัปดาห์หลังจากเริ่มปรากฏอาการ ด้วยเหตุนี้ การตอบสนองของ IgG เจาะจง SARS-CoV-2 จึงคล้ายคลึงอย่างมากกับการตอบสนองของสารภูมิต้านทานต่อไวรัสอื่นๆ หลายชนิด โดยมีกิจกรรมสูงสุดในช่วงสองสามสัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ และตามด้วยระยะที่ลดลงอีกหลายสัปดาห์ แต่ท้ายที่สุดแล้วจะส่งผลให้มีการตอบสนองของสารภูมิต้านทานที่เสถียรซึ่งสามารถตรวจพบได้เป็นเวลานานอย่างน้อย 6 เดือน

เพื่อยืนยันสิ่งที่เราค้นพบ ได้มีการวิเคราะห์ค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานของผู้ป่วยที่เป็นแบบอย่าง 60 คนด้วยการเก็บตัวอย่างซ้ำๆ โดยทั่วไปค่าไตเตอร์ IgM จะลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่ค่าไตเตอร์ IgG จะเสถียรมากกว่าอย่างมาก ยกเว้นผู้ป่วยที่ได้ผลผิดปกติ (ผู้ป่วย 13 และผู้ป่วย 17) ซึ่งไม่พัฒนาการตอบสนองของ IgG-S ที่สามารถวัดได้ แม้หลังจาก 26 สัปดาห์ ผู้ป่วยทั้งหมดยกเว้นสามคน (ผู้ป่วย 13 ผู้ป่วย 14 และผู้ป่วย 17) มีค่าสารภูมิต้านทาน IgG ที่สามารถตรวจวัดได้ (ภาพประกอบ [1d](#) ส่วนบน) ที่น่าสนใจคือ ผู้ป่วยที่ได้ข้อมูลผิดปกติสองคนซึ่งไม่มีการพัฒนาการตอบสนอง IgG-S เป็นผู้หญิงที่มีอายุน้อยและได้รับวินิจฉัยว่าเป็นโควิด 19 แบบแสดงอาการร่วมกับการบาดเจ็บของปอด (ภาพประกอบ [1d](#) ส่วนล่าง) ผู้หญิงทั้งสองคนแสดงถึงการตอบสนองของ IgG ในระดับปานกลางสำหรับการระบุโปรตีน N โดยที่ไม่มีการพัฒนาค่าไตเตอร์ IgG-S ที่เกี่ยวข้อง ได้มีการทดสอบกิจกรรมกำจัดเชื้อของพลาสมาของพวกเขาในโอกาสต่างๆ โดยได้รับผลเป็นลบอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งเน้นถึงความสำคัญของ IgG เจาะจง S สำหรับการกำจัดไวรัส

### **ความสัมพันธ์ของระดับสารภูมิต้านทานต่อการควบคุมไวรัสและความรุนแรงของโรค**

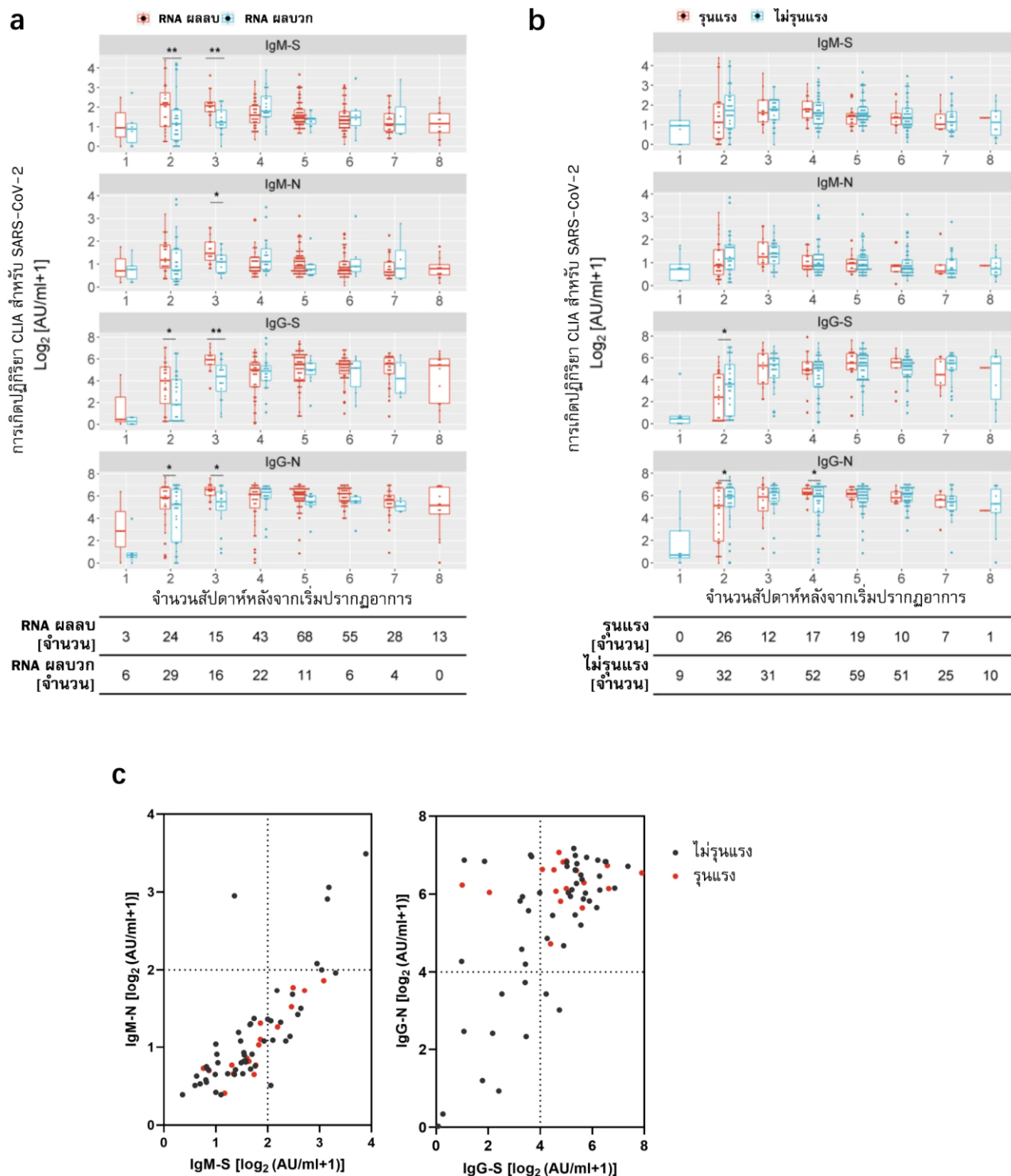
เพื่ออธิบายอย่างชัดเจนถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารภูมิต้านทานและการควบคุมไวรัส ความรุนแรงของโรค เพศ รวมถึงอายุ ในผู้ป่วยโควิด 19 เราได้เปรียบเทียบค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานในผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ ลักษณะเฉพาะทางคลินิกและในการทดลองของผู้ป่วยโควิด 19 ขณะที่เข้ารับการรักษา ได้อธิบายไว้ในตารางเสริม [1](#) เมื่อพิจารณาร่วมกัน กลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรง 149 เคส (71.3%) และกลุ่มที่มีอาการรุนแรง 60 เคส (28.7%) มาจากหอผู้ป่วยแยกโรคซึ่งได้มีการบันทึกข้อมูลทางการแพทย์อย่างครบถ้วน ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญในแง่เพศและอายุในสองกลุ่มนี้ สิ่งที่น่าสนใจคือการศึกษาก่อนหน้านี้<sup>17</sup> คือ ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมีจำนวนและความถี่ของลิมโฟไซต์

ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$  ในการทดสอบแมน-วิทนี  $U$  สองทิศทาง) และจำนวน PLT ลดลง ( $p < 0.05$  ในการทดสอบแมน-วิทนี  $U$  สองทิศทาง) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่อยู่ในระยะอาการไม่รุนแรง ขณะที่จำนวนและความถี่ของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้น ( $p < 0.01$  ในการทดสอบแมน-วิทนี  $U$  สองทิศทาง) ดังที่คาดไว้ ผู้ป่วยจากกลุ่มที่มีอาการของโรครุนแรงกว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของบิลิรูบินรวม อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส แอสพาร์เตตทรานซามิเนส แลคเตทดีไฮโดรจีเนส ครีเอทีนไคเนส ครีเอทีนิน ดีไดเมอร์ ระยะเวลาโปรตรอมบิน และไฟบริโนเจน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่อาการไม่รุนแรง ( $p < 0.05$  ในการทดสอบแมน-วิทนี  $U$  สองทิศทาง)

เพื่อตรวจสอบถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของสารภูมิคุ้มกันต้านทานและการควบคุมไวรัส ผู้ป่วยได้รับการแบ่งชั้นตามการปรากฏหรือไม่ปรากฏ RNA ของ SARS-CoV-2 ขณะที่ทำการระบุสารภูมิคุ้มกันต้านทาน ในช่วงแรก กลุ่มที่ตรวจไม่พบ RNA ของ SARS-CoV-2 อีกระดับสารภูมิคุ้มกันต้านทานสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้ผลบวกจากการตรวจ RNA ของ SARS-CoV-2 ในระยะยาว สิ่งนี้ค้นพบนี้บ่งบอกว่าการปรากฏของ IgM และ IgG ระบุโปรตีน S และ N ของ SARS-CoV-2 ช่วยทำให้เกิดการป้องกันที่เกี่ยวข้องในทางคลินิกสำหรับมนุษย์ และมีส่วนร่วมในการควบคุมไวรัสในระหว่างระยะแรกของการติดเชื้อ (ภาพประกอบ [2a](#) และภาพประกอบเสริม [2a](#))

## ภาพประกอบ 2: ความสัมพันธ์ของค่าไดเตอร์สารภูมิต้านทานกับการควบคุมไวรัสและความรุนแรงของอาการป่วยในผู้ป่วยโควิด 19

จาก: การติดเชื้อ SARS-CoV-2 เหนียวนานำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสารน้ำในระยะยาวในผู้ป่วยระยะฟื้นตัวหลังจากป่วยด้วยโควิด 19 แบบแสดงอาการ





**a** ได้มีการนำค่า IgM/IgG ปฏิกริยา CLIA เจาะจง S และ N ของผู้ป่วยโควิด 19 ที่ได้ผลตรวจ RNA ของไวรัสเป็นลบ (สีแดง) มาเปรียบเทียบกับผู้ที่ได้ผลตรวจ RNA ของไวรัสเป็นบวก (สีน้ำเงิน) ขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากเริ่มเป็นโรค ซึ่งรวบรวมผลลัพธ์ได้ทั้งหมด 343 รายการสำหรับการวิเคราะห์ดังกล่าว ค่าการตรวจสารภูมิคุ้มกันด้านทานแต่ละค่าจะได้รับการจัดประเภทเป็นกลุ่มผลตรวจ RNA เป็นลบ หรือกลุ่มผลตรวจ RNA เป็นบวก ตามผลการตรวจ RNA ในเวลาเดียวกัน ค่า  $p$  ที่ปรับแล้วมีดังนี้: สัปดาห์ที่สองหลังจากเป็นโรค: IgM-S ( $p=0.008$ ); IgG-S ( $p=0.012$ ); IgG-N ( $p=0.042$ ); สัปดาห์ที่สามหลังจากเป็นโรค: IgM-S ( $p=0.007$ ); IgM-N ( $p=0.023$ ); IgG-S ( $p=0.005$ ); IgG-N ( $p=0.014$ ) **b** การเปรียบเทียบค่าไคเดออร์ IgM/IgG ปฏิกริยา CLIA เจาะจง S และ N ระหว่างผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ( $n=60$ , สีแดง) และไม่รุนแรง ( $n=149$ , สีน้ำเงิน) ในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากเริ่มเป็นโรค ค่า  $p$  ที่ปรับแล้วมีดังนี้: สัปดาห์ที่สองหลังจากเป็นโรค: IgG-S ( $p=0.028$ ); IgG-N ( $p=0.028$ ); สัปดาห์ที่สามหลังจากเป็นโรค: IgG-N ( $p=0.019$ ) กรอบใน **a** และ **b** แสดงค่ามัธยฐาน (เส้นกลาง) ควอร์ไทล์ 75% (เขตบน) และควอร์ไทล์ 25% (เขตล่าง) และวิสเกอร์แสดงค่า  $1.5\times$  ของ IQR เหนือและใต้กรอบ ใช้การตรวจวัดซ้ำ (โมเดลผสม) ANOVA ในการวิเคราะห์ทางสถิติ  $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ , สองด้าน ตารางใต้ภาพจะแสดงจำนวนของตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา **c** การเปรียบเทียบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและไม่รุนแรง 64 คน (ตัวอย่าง 69 ชุด) ที่ระดับ IgM/IgG ปฏิกริยา CLIA เจาะจง S และ N แตกต่างกัน ในสัปดาห์ที่สี่หลังจากเริ่มปรากฏอาการ

จากการอธิบายเกี่ยวกับระยะเวลาของการตอบสนองของสารภูมิต้านทานในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ<sup>6</sup> เราจึงสงสัยว่าเคสโควิด 19 ที่มีอาการไม่รุนแรงและรุนแรงจะมีความแตกต่างกันในแง่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัปดาห์หรือไม ผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงมีการตอบสนอง IgG-S/N ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งเป็นการเน้นย้ำถึงบทบาทในการป้องกันของ IgG เช่นกัน (ภาพประกอบ 2b และภาพประกอบเสริม 2b) ระดับ IgG-N ของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมีค่าสูงกว่าผู้ที่มีอาการไม่รุนแรงชั่วคราวในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องจากการทำสำเนาไวรัสและปริมาณแอนติเจนที่สูงกว่าซึ่งทำให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผู้ป่วยอาการรุนแรงซึ่งแสดงถึงค่าไคเตอร์ IgG-S และ IgG-N ระดับสูง (ภาพประกอบ 2c)

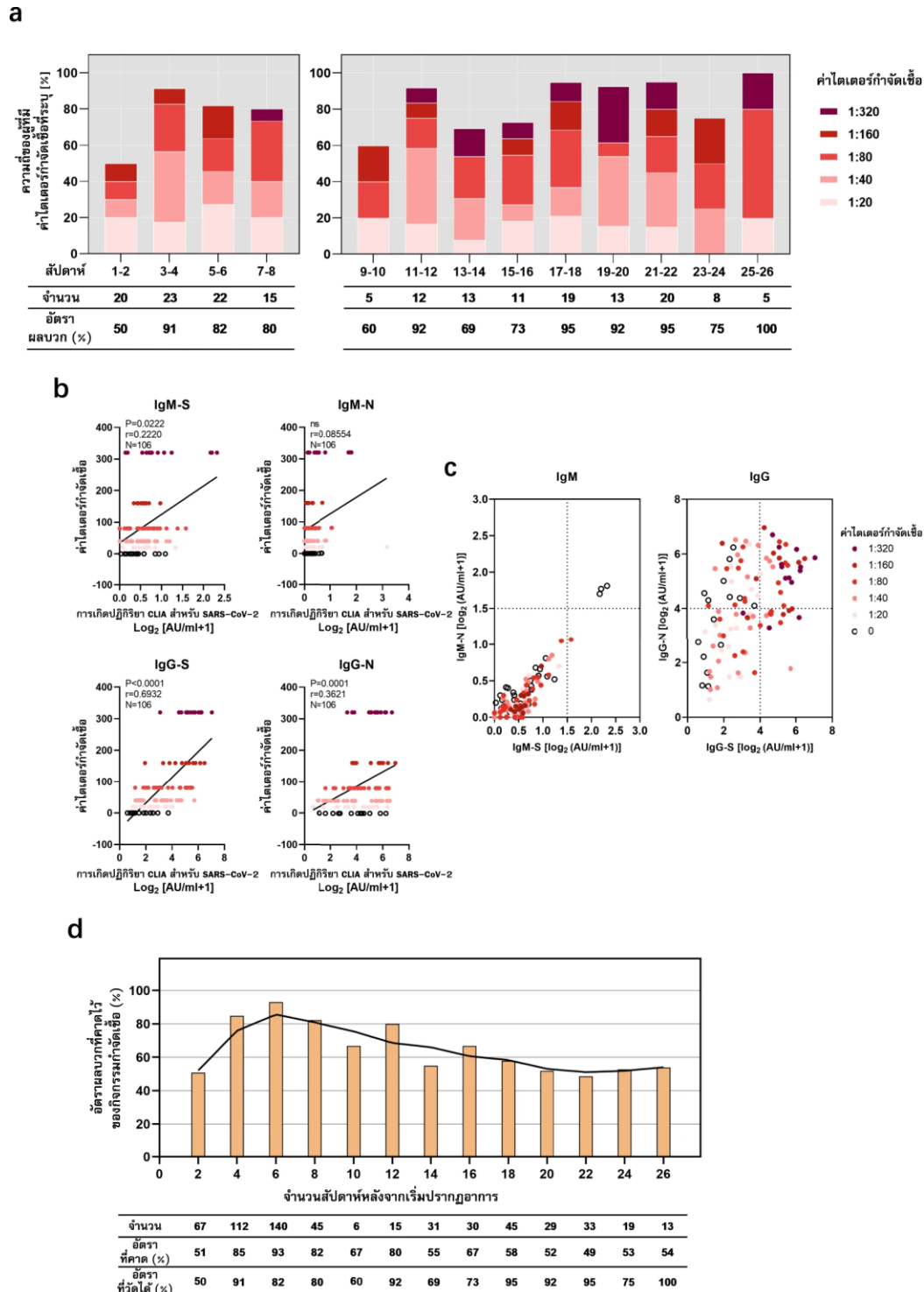
โดยทั่วไปแล้วจะพบเคสโควิด 19 ที่อันตรายถึงชีวิตในเพศชายและในผู้สูงอายุมากเป็นพิเศษ<sup>18</sup> จึงได้มีการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเพศและอายุกับระดับสารภูมิต้านทานด้วย เพศชายมีแนวโน้มที่จะมี IgM เจาะจง SARS-CoV-2 ที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบเสริม 2c, d) ในขณะที่การตอบสนองของ IgG ไม่ได้แสดงถึงความแตกต่างเนื่องจากเพศ ในช่วงเวลาหลังจากนั้น ระดับของสารภูมิต้านทานชนิดในผู้ป่วยสูงอายุ (อายุ  $\geq 65$  ปี) มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 65 ปีอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบเสริม 2e, f) ซึ่งอาจบ่งบอกถึงปริมาณไวรัสที่สูงกว่าในผู้ป่วยสูงอายุ

### ค่าไคเตอร์ IgG-RBD-S สัมพันธ์กับกิจกรรมกำจัดเชื้อ

NAb แสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงในเชิงบำบัดและเชิงป้องกันหนูเมาส์ติดต่อพันธุกรรม hACE2 ที่ติดเชื้อ SARS-CoV-2<sup>19</sup> และการศึกษาเกี่ยวกับการให้วัคซีนเมื่อไม่นานมานี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ไม่ใช่มนุษย์ได้ระบุว่า NAb มีความสัมพันธ์กับการป้องกันโรค<sup>20</sup> เพื่อศึกษาถึงระยะเวลาที่สารภูมิต้านทานมีความสามารถในการกำจัดเชื้อ ได้มีการทดลองการกำจัดเชื้อไวรัสโดยใช้ตัวอย่าง 186 ชุดจากผู้ป่วย 137 คน ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังจากเริ่มปรากฏอาการ ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยแสดงออกถึงกิจกรรมการกำจัดเชื้อ โดยมีการกำจัดไวรัส 50% ที่การเจือจางพลาสมาขั้นต่ำ 1:20 (ภาพประกอบ 3a) ในสัปดาห์ 4 สัดส่วนของผู้ป่วยที่มีกิจกรรมกำจัดเชื้อได้เพิ่มขึ้นถึงกว่า 90% จากนั้นยังคงอยู่ในระดับสูงมากจนกระทั่งสิ้นสุดช่วงเวลาการสังเกตหลังจาก 26 สัปดาห์ (ภาพประกอบ 3a) กิจกรรมกำจัดเชื้อที่การเจือจางซีรัม 1:160 ใช้เป็นระดับคutoffในการศึกษาพิสูจน์แนวคิดทางคลินิกเพื่อแสดงประสิทธิภาพของการรักษาด้วย CP<sup>21</sup> ความถี่ที่ค่อนข้างสูงของผู้เข้าร่วมการศึกษาของเราแสดงถึงความสามารถที่สูงในการกำจัดเชื้อ ( $\geq 1:160$ ) การค้นพบว่าผู้ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อสูง ( $\geq 1:320$ ) ไม่ปรากฏก่อนสัปดาห์ที่ 7 บ่งบอกว่าจะต้องใช้เวลาพอสมควรในการเพิ่มการตอบสนองของสารภูมิต้านทานที่ออกฤทธิ์สูง

### ภาพประกอบ 3: การตอบสนองของ IgG เจาะจง N และ S มีค่าเชิงคาดการณ์ที่แตกต่างกันในการกำจัดเชื้อ

จาก: การติดเชื้อ SARS-CoV-2 เหนียวนานให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสารน้ำในระยะยาวในผู้ป่วยระยะฟื้นตัวหลังจากป่วยด้วยโควิด 19 แบบแสดงอาการ



ได้มีการนำตัวอย่างทั้งหมด 186 ชุดจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการจำนวน 137 คนมาประเมินค่าไตเตอร์ก่าจัดเชื้อ SARS-CoV-2 และแบ่งกลุ่มตามจำนวนสัปดาห์หลังจากเริ่มปรากฏอาการ **a** สัดส่วนของกิจกรรมก่าจัดเชื้อของพลาสมาถูกแบ่งเป็นช่วงละ 2 สัปดาห์ **b** การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าไตเตอร์ก่าจัดเชื้อของ IgM/IgG ปฏิกริยา CLIA เจาะจง S และ N ของผู้ป่วยโควิด 19 การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธีการทดสอบความสัมพันธ์ของสเปียร์แมนนอนพาราเมตริก ในกราฟ  $p$ ,  $r$  และ  $n$  แสดงค่า  $p$  สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และขนาดตัวอย่าง ตามลำดับ **c** การแจกแจงของกิจกรรมก่าจัดเชื้อที่ค่า IgM/IgG ปฏิกริยา CLIA เจาะจง S และ N ต่างๆ **d** คำนวณกิจกรรมก่าจัดเชื้อของผู้ป่วยที่ยืนยันทั้งหมดในช่วงเวลาต่างๆ ตามค่าคัทออฟและค่าไตเตอร์ IgG-S ที่คาดไว้

ในการระบุเพิ่มเติมว่าคลาสและความจำเพาะใดของสารภูมิต้านทานที่สามารถส่งผลให้เกิดผลในการกำจัดเชื้อ ได้มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าไตเตอร์ของสารภูมิต้านทานสี่ชนิดและ กิจกรรมกำจัดเชื้อ ค่าไตเตอร์ IgG-RBD-S มีความสัมพันธ์เชิงบวกที่ชัดเจนที่สุดกับกิจกรรมกำจัดเชื้อ (สเปียร์แมน  $r=0.6932$ ,  $p<0.0001$ ) เปรียบเทียบกับ IgM-S (สเปียร์แมน  $r=0.2220$ ,  $p<0.05$ ) และ IgG-N (สเปียร์แมน  $r=0.3621$ ,  $p=0.0001$ ) (ภาพประกอบ 3b) กิจกรรมกำจัดเชื้อระดับสูง (1:160 หรือ 1:320) พบได้ร่วมกับค่า IgG-S สูงเท่านั้น ขณะที่พลาสมาที่มีค่าไตเตอร์ IgG-N สูงหรือการตอบสนอง IgM ด้านเดียวไม่สัมพันธ์กับ กิจกรรมกำจัดเชื้อที่สูง (ภาพประกอบ 3c) สิ่งต่างๆ ที่พบเหล่านี้สอดคล้องกับความเชื่อที่ว่า IgG-S สัมพันธ์กับความสามารถในการกำจัดเชื้อ

การทดสอบการกำจัดเชื้อไวรัสจะต้องทำในห้องทดลอง BSL3 ซึ่งไม่ได้มีอยู่ทั่วไป เราจึงได้ทำการวิเคราะห์กราฟลักษณะการทำงานของตัวรับและพื้นที่ใต้กราฟสำหรับค่าไตเตอร์ IgG-S ซึ่งที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไวรัส พบว่าค่าไตเตอร์ที่สูงกว่า 4.99 AU/มล. สามารถเป็นค่าเกณฑ์ในการทำนายผลในการกำจัดเชื้อ ซึ่งอาจช่วยในการคัดกรอง CP สำหรับการรักษาด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด หากไม่สามารถจัดหาห้องทดลองที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสูงได้ (ภาพประกอบเสริม 3) ค่าคutoffของค่าไตเตอร์ IgG-S ที่เข้มงวดนี้ใช้ในการคำนวณอัตราผลบวกของกิจกรรมกำจัดเชื้อ ในตัวอย่างที่ยังไม่ได้รับการทดสอบในการวิเคราะห์การกำจัดเชื้อ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้ค่าเหนือค่าเกณฑ์ดังกล่าวในช่วงเวลาที่ช้าที่สุดในสัปดาห์ที่ 26 แสดงว่าการปรากฏของสารภูมิต้านทาน IgG ระบุ RBD สามารถใช้คาดการณ์กิจกรรมกำจัดเชื้อได้ โปรดทราบว่าเกณฑ์ความไวและความจำเพาะที่เข้มงวดอย่างมากของเราเป็นการประเมินต่ำกว่าความเป็นจริงสำหรับความถี่ที่แท้จริงของผู้ที่มีสารภูมิต้านทานกำจัดเชื้อ ซึ่งจะเห็นได้เมื่อใช้ค่าคutoffกับชุดข้อมูลการกำจัดเชื้อในภาพประกอบ 3b ดังนั้น ผู้ป่วยโควิด 19 ส่วนใหญ่มีการเพิ่มขึ้นของสารภูมิต้านทานดังกล่าวกับ IgG-RBD-S รวมกับความสามารถในการกำจัดเชื้อ ซึ่งคงอยู่ตลอดระยะเวลาของการสังเกต 6 เดือน (ภาพประกอบ 3a, d)

## การอภิปราย

บริษัทและสถาบันวิจัยทั่วโลกได้พยายามอย่างเข้มข้นในการออกแบบ ประเมิน และผลิตวัคซีนป้องกันเชื้อ SARS-CoV-2 และโรคโควิด 19 ที่เกี่ยวข้อง แม้จะเห็นได้ชัดว่าวัคซีนดังกล่าวเป็นที่ต้องการอย่างมาก และดูเหมือนจะมีแนวโน้มที่ดีมาจากการศึกษาถึงประสิทธิภาพเบื้องต้นในสัตว์และการศึกษาความปลอดภัยในมนุษย์ แต่ไม่สามารถรับประกันได้ว่าวัคซีนจะพร้อมใช้งานโดยทั่วไปในเร็ว ๆ นี้ รวมไปถึงการคงอยู่ในระยะยาวของการป้องกัน อีกปัญหาหนึ่งคือคำถามที่ว่า การติดเชื้อตามธรรมชาติจะทำให้มีภูมิป้องกันในระยะยาวมากขึ้นซึ่งจะช่วยให้สามารถสร้างภูมิคุ้มกันหมู่ได้หรือไม่ ซึ่งระยะเวลาการตอบสนองของสารภูมิต้านทานเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับทั้งสองเรื่องดังกล่าว ในขณะนี้ ความยั่งยืนของภูมิคุ้มกันในการป้องกันของผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวเป็นหนึ่งในเรื่องที่มีความเร่งด่วนมากที่สุด หากภูมิคุ้มกันอยู่จริง ผู้ที่ฟื้นตัวน่าจะได้รับประโยชน์จากภูมิคุ้มกันของตนเองซึ่งทำหน้าที่ในส่วนที่เกี่ยวข้องของระบบ และภูมิคุ้มกันที่คงอยู่ยาวนานก็น่าจะเพิ่มความเชื่อมั่นของสาธารณชนต่อวัคซีนอีกด้วย จากความรู้ทั้งหมดที่เรามีอยู่ ในระยะเวลา 6 เดือน ซึ่งเป็นระยะเวลาการสังเกตของการศึกษาเกี่ยวกับพลวัตของการตอบสนองของสารภูมิต้านทานของเรา เป็นระยะเวลายาวนานที่สุดเท่าที่มีการศึกษาจนถึงขณะนี้ เราพบว่า IgM จะคง SARS-CoV-2 ระบุ S และ N ปรากฏเพียงชั่วคราวเท่านั้น และหายไปในช่วงประมาณสัปดาห์ที่ 12 ดังนั้น การตอบสนองของ IgM จึงไม่น่าจะมีส่วนร่วมต่อภูมิคุ้มกัน SARS-CoV-2 ที่คงอยู่ในระยะยาว และเรายังไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างการตอบสนองของ IgM และความสามารถของพลาสมาในการกำจัดไวรัสในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่น่าสนใจคือยังคงได้อัตราผลบวกและค่าไตเตอร์

IgG ระบุ S และ N ในระดับสูงเป็นเวลา 6 เดือน เรื่องนี้มีความสำคัญเป็นพิเศษในกรณีของ IgG ระบุ RBD ของโปรตีน S เนื่องจากค่าไตเตอร์เหล่านี้สัมพันธ์กับกิจกรรมกำจัดเชื้อ และยังสัมพันธ์กับการควบคุมไวรัสในช่วงเริ่มแรก ซึ่งเน้นถึงความเกี่ยวข้องของ IgG-S ในฐานะปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันในมนุษย์ สิ่งสำคัญคือกลุ่มรุ่มร่นของผู้ป่วยของเราซึ่งแสดงการตอบสนองของ IgG ในระยะยาวหลังจากที่มีช่วงการลดลงในระยะสั้นๆ ประกอบด้วยผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการเท่านั้น ความเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลาและรวมถึงระยะเวลาของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัรน้ำหลังจากการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการอาจแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง<sup>6,22</sup>

เมื่อพิจารณาว่าผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมีระดับ IgG-N สูงกว่าเคสที่อาการไม่รุนแรงในสัปดาห์ที่ 4 เราคาดว่าผู้ป่วยโควิด 19 อาจมีการทำสำเนาไวรัสมากกว่า ซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของแอนติเจนไวรัสมากขึ้น และอาจนำไปสู่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัรน้ำที่มากกว่าและคงอยู่เป็นระยะเวลานานกว่า โดยอาจต้องมีการอักเสบที่รุนแรงมากร่วมกับ สมมติฐานที่ว่าระดับแอนติเจนเป็นสิ่งที่กำหนดนระดับของค่าไตเตอร์ IgG อาจยังสามารถอธิบายถึงลักษณะการตอบสนองของอิมมูโนโกลบูลินชั่วคราวของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการได้อีกด้วย

ยังคงเป็นที่ถกเถียงว่าค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานและความรุนแรงของโรคส่งผลซึ่งกันและกันอย่างไร การศึกษาหนึ่งพบวาระดับสารภูมิต้านทานรวมในผู้ป่วยที่อาการรุนแรงมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่อาการไม่รุนแรงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงระหว่างสัปดาห์ที่สองถึงห้าหลังจากเริ่มเป็นโรค แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG หรือ IgM ตามลำพัง<sup>23</sup> ในการศึกษาอีกครั้งหนึ่งได้สังเกตวาระดับ IgG ของผู้ป่วยที่อาการรุนแรงสูงกว่าผู้ป่วยที่อาการไม่รุนแรงอย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่สองหลังจากเริ่มเป็นโรค<sup>3</sup> ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสารภูมิต้านทานที่สูงกับโรคโควิด 19 ที่อาการรุนแรงได้นำไปสู่การอภิปรายว่าสารภูมิต้านทานเกี่ยวข้องกัพยาธิวิทยาภูมิคุ้มกันแทนที่จะเป็นผลในการต้านไวรัสหรือไม่ เราได้พบสิ่งที่ขัดแย้งกับการศึกษาเหล่านี้ นั่นคือ ในช่วงเริ่มแรกหลังจากเริ่มเป็นโรคในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง และผู้ป่วยที่ได้ผลตรวจ RNA เป็นลบ (ภายใน 3 สัปดาห์) ระดับของ IgM-S/IgM-N/IgG-S/IgG-N สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและผู้ป่วยที่มีผลตรวจ RNA เป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างค่าไตเตอร์ IgG-S และการกำจัดไวรัสอีกด้วย ซึ่งบ่งบอกว่าผลในการต้านไวรัสของสารภูมิต้านทานส่งผลมากกว่าผลไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น อย่างน้อยก็ในระหว่างระยะแรกของโรคโควิด 19

การศึกษาก่อนหน้านี้ยังแสดงให้เห็นว่าพลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวมีกิจกรรมการกำจัดไวรัส<sup>13</sup> และช่วยบรรเทาอาการเมื่อนำไปให้กับผู้ป่วยที่อาการรุนแรง<sup>21</sup> เราพบว่า IgG-RBD-S มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกิจกรรมกำจัดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้<sup>12</sup> ผู้ป่วยบางรายมีค่าไตเตอร์กำจัดเชื้อสูงมาก ( $>1:320$ ) ซึ่งสอดคล้องกับสถานะความสามารถในการกำจัดเชื้อที่สูงเป็นพิเศษ มีการระบุถึงผู้ที่มีการกำจัดเชื้อสูงสำหรับไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น HIV<sup>24</sup> เห็นได้ชัดว่าบุคคลดังกล่าวน่าจะช่วยให้สามารถระบุโคลนของสารภูมิต้านทานกำจัดเชื้อได้อย่างครอบคลุมและมีประสิทธิภาพ บริจาค CP ประสิทธิภาพสูง รวมถึงช่วยในการออกแบบวัคซีนเพื่อเสริมการตอบสนองของ NAb ออกฤทธิ์สูง<sup>25</sup>

ได้มีการหารือวาระดับ IgG ทั้งของผู้ป่วยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการอาจลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างฟื้นตัว<sup>6</sup> ทำให้เกิดข้อกังวลเกี่ยวกับกิจกรรมกำจัดเชื้อในระยะยาวของพลาสมาของผู้ป่วย การศึกษาของเราแสดงให้เห็นว่าพลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการส่วนใหญ่เอื้ออำนวยให้



เกิดกิจกรรมกำจัดเชื้อในระหว่างช่วงเวลาการสังเกต 6 เดือน โดยมีผู้ป่วยที่มีกิจกรรมกำจัดเชื้อระดับสูงมากในสัดส่วนค่อนข้างมาก

การอภิปรายเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสารน้ำที่ลดลงอย่างรวดเร็วทำให้สื่อมวลชนให้ความสนใจอย่างกว้างขวาง ทำให้เกิดความสงสัยและความกังวลเกี่ยวกับความเป็นไปได้ของการพัฒนาวัคซีนรวมถึงภูมิคุ้มกันหลังจากการติดเชื้อ จากข้อมูลของเรา พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสารน้ำต่อ SARS-CoV-2 ของผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการมีลักษณะค่อนข้างคล้ายไวรัสต่างๆ คือมีระยะการเพิ่มขึ้นในช่วงแรก ตามด้วยระยะการลดลงในช่วงกลาง และระยะความจำในระยะยาว การวิเคราะห์ซึ่งยุติการสังเกตเร็วกว่าการศึกษาของเราแต่ทำการเอ็กซ์ทราโพลเทแนวโน้มระยะยาวจากระยะการลดลงของภูมิ โดยที่ไม่คำนึงถึงหรือทราบเกี่ยวกับระยะความจำ/ควมรวม ทำให้เกิดความสงสัยสืบเนื่องที่จะสรุปผลโดยมองโลกในแง่ร้ายมากเกินไปเกี่ยวกับความคงอยู่ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสารน้ำหลังจากติดเชื้อ SARS-CoV-2 แม้แต่การติดเชื้อปฐมภูมิซึ่งเหี่ยวหายภูมิคุ้มกันที่คงอยู่ในระยะยาว (เช่น การติดเชื้อโรคหัด) และวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงอย่างไขหัดและโรคพิษสุนัขบ้า ก็ยังมีระยะการลดลงเป็นช่วงสั้นๆ ของการตอบสนองของสารภูมิต้านทาน แม้จำเป็นต้องสังเกตต่อไปในอนาคตเพื่อให้ทราบว่าภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคจะคงอยู่นานเท่าใดหลังจากการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือได้รับวัคซีนป้องกัน SARS-CoV-2 แต่ข้อมูลของเราบ่งบอกว่าการตอบสนองของสารภูมิต้านทานเจาะจง SARS-CoV-2 ค่อนข้างคล้ายกับการตอบสนองต่อไวรัสอื่นๆ หลายชนิด ซึ่งเหี่ยวหายภูมิคุ้มกันในมนุษย์ เช่นโคโรนาไวรัส “โรคหัด” ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวกลางที่ช่วยให้เกิดภูมิคุ้มกันในการป้องกันได้เป็นเวลาหลายเดือนจนถึงหลายปี<sup>26,27</sup>

ข้อมูลที่ได้จากผลงานดังกล่าวแสดงถึงประโยชน์ของการตรวจสารภูมิต้านทานทางซีรั่มวิทยาสำหรับ S-RBD และนิวคลีโอโปรตีนของ SARS-CoV-2 สำหรับการวินิจฉัย ในระหว่างระยะเริ่มแรกของโรคอาจใช้การตรวจเหล่านี้เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อโควิด 19 และระดับการตอบสนองของสารภูมิต้านทานอาจมีประโยชน์ในการทำนายผลลัพธ์ทางคลินิก ในระยะยาวแล้วการเฝ้าตรวจสอบระดับสารภูมิต้านทาน โดยเฉพาะต่อ S-RBD จะเป็นประโยชน์ในการตอบคำถามที่สำคัญเกี่ยวกับการกำจัดไวรัสและภูมิคุ้มกันต่อ SARS-CoV-2

การศึกษานี้มีข้อจำกัดบางประการดังนี้ ประการแรก เราไม่มีตัวอย่างที่เพียงพอในช่วง 9–11 สัปดาห์เนื่องจากผู้ป่วยต้องเข้าทำการกักตัวตามข้อบังคับหลังจากที่ออกจากสถานพยาบาลอีก 2 สัปดาห์ตามด้วยการกักตัวที่บ้านอีก 2 สัปดาห์หลังจากการกักตัวตามข้อบังคับ ประการที่สอง เนื่องจากข้อจำกัดในการจัดหาห้องทดลอง BSL3 จึงไม่สามารถประเมินตัวอย่างบางส่วนในการทดสอบการกำจัดไวรัสได้

โดยสรุปแล้ว ดูเหมือนว่าสารภูมิต้านทานมีผลในการต้านไวรัสในช่วงเริ่มแรกของการติดเชื้อ SARS-CoV-2 และผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการส่วนใหญ่ยังคงได้ผลบวกสำหรับการตรวจ IgG-S และพบกิจกรรมกำจัดเชื้อที่เพียงพอในระยะเวลา 6 เดือนหลังจากเริ่มป่วย ผลลัพธ์เหล่านี้สนับสนุนความเชื่อที่ว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อตามธรรมชาติจะสามารถรับมือการติดเชื้อซ้ำได้ และวัคซีนอาจสามารถมอบการป้องกันที่เพียงพอได้ ฟังระลึกว่าการวิเคราะห์ซึ่งยุติการสังเกตเร็วกว่าการศึกษาของเรา และเอ็กซ์ทราโพลเทแนวโน้มระยะยาวจากระยะที่ภูมิลดลง โดยที่ไม่คำนึงถึงหรือทราบเกี่ยวกับระยะควมรวม ทำให้เกิดความสงสัยสืบเนื่องที่จะสรุปผลโดยมองโลกในแง่ร้ายมากเกินไปเกี่ยวกับความคงอยู่ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสารน้ำ

## ผู้ป่วยและการเก็บตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างทั้งหมด 585 ชุดจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่แสดงอาการ 349 คน ในหอผู้ป่วยแยกโรคที่คลินิกใช้ของโรงพยาบาล Wuhan Union หรือศูนย์ทรัพยากรไวรัสแห่งชาติของสถาบันไวรัสวิทยาอู่ฮั่น ในระหว่างวันที่ 1 มกราคมถึง 15 กรกฎาคม 2020 ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการวินิจฉัยและรักษาตามข้อแนะนำในการวินิจฉัยและรักษาปอดอักเสบเนื่องจากโคโรนาไวรัสชนิดใหม่ (เวอร์ชันที่ 7) ซึ่งเผยแพร่โดยคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติของสาธารณรัฐประชาชนจีน<sup>28</sup> ผู้ป่วยทั้งหมดเป็นไปตามเงื่อนไขต่อไปนี้: (1) ประวัติทางระบาดวิทยา (2) อาการไข้หรืออาการเกี่ยวกับการหายใจอื่นๆ (3) ความผิดปกติของภาพ CT ทั่วไปจากปอดอักเสบเนื่องจากไวรัสหรือจำนวนลิมโฟไซต์ที่ลดลง และ (4) ผลตรวจ IgG และ IgM เป็นบวก หรือผลบวกจากการตรวจปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสถอดรหัสย้อนกลับ- (RT-PCR) สำหรับ RNA ของ SARS-CoV-2 ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะต้องมีลักษณะตามเงื่อนไขอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้เพิ่มเติม: (1) ความอิ่มตัวของออกซิเจนต่ำ ( $\leq 93\%$ ) ขณะพัก หรือความดันของออกซิเจนในเลือดแดงต่อสัดส่วนของออกซิเจนจากการหายใจเข้า ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ )  $\leq 300$  mmHg (2) ภาวะหายใจล้มเหลวและต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ และ (3) ความล้มเหลวของอวัยวะหลายระบบและเข้ารับการรักษาใน ICU เราได้รวบรวมบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของผู้ป่วยย้อนหลัง ซึ่งรวมถึงปัจจัยทางสถิติประชากร ผลจากห้องทดลอง และพารามิเตอร์อื่นๆ โดยละเว้นผู้ที่ติดเชื้อร่วมกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ไข้หวัดใหญ่ชนิด B หรือไวรัสอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในทางเดินหายใจ ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เราใช้สำหรับตรวจวัดระดับสารภูมิต้านทานและกิจกรรมกำจัดเชื้อได้มาจากพลาสมาส่วนที่เหลือจากการทดสอบทางคลินิก ผู้ป่วยได้ให้ความยินยอมที่ได้รับการบอกกล่าวเพื่อใช้งานตัวอย่างเลือดของตนด้วยวาจา แทนการให้ความยินยอมด้วยการลงชื่อ ทั้งนี้เพื่อจำกัดการแพร่ระบาดของโควิด 19 กระบวนการนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมโรงพยาบาล Union มหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหวงโจวในเมืองอู่ฮั่น ผู้ป่วยหรือสาธารณชนได้มีส่วนร่วมในการออกแบบ ดำเนินการ รายงาน หรือวางแผนการเผยแพร่งานวิจัยของเรา ตัวอย่างได้ถูกเก็บและแยกส่วนด้วยวิธีเหวี่ยงแยกที่  $3000 \times g$  เป็นเวลา 15 นาที ภายใน 4–6 ชม. นับจากการเก็บตัวอย่าง ตามด้วยการทำให้หมดฤทธิ์ที่อุณหภูมิ  $56^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^\circ\text{C}$  เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

## การตรวจวัด RNA ของ SARS-CoV-2 รวมถึง IgG และ IgM ด้าน S/N ของ SARS-CoV-2

สิ่งส่งตรวจจากการป้ายคอได้ถูกเก็บจากผู้ป่วยทั้งหมด และเก็บรักษาในภาชนะนำส่งไวรัสสำหรับการตรวจ RNA ของ SARS-CoV-2 ทำการตรวจ RNA ของ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR แบบเรียลไทม์ตามคู่มือผลิตภัณฑ์ (Daan gene จงชาน ประเทศจีน หมายเลขทะเบียน 20203400063) ไพรเมอร์เจาะจงยีน ORF1ab และ N ของ SARS-CoV-2 ระบุอยู่ในตารางเสริม 2 สารภูมิต้านทาน IgM และ IgG ระบุ RBD ของโปรตีน S หรือ N ของ SARS-CoV-2 ได้รับการทดสอบด้วยวิธีจับโมเลกุล CLIA โดยใช้ MAGLUMI™ 4000 Plus (Snibe เซ็นเจิ้น ประเทศจีน) ตามที่รายงาน<sup>29</sup> ค่าคัทออฟสำหรับ IgM-S คือ 0.7 AU/มล. และใช้ค่า 1.0 AU/มล. สำหรับ IgM-N, IgG-S และ IgG-N

## ชุดตรวจการกำจัดไวรัส

เราเลือกตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่ดีจากกลุ่มต่างๆ ของผู้ป่วยซึ่งมีค่าไตเตอร์ IgG ดักจับแตกต่างกันไป วีโรเซลล์ E6 ( $1 \times 10^4$  ต่อหลุม) ได้ถูกนำไปเพาะในเพลทขนาด 96 หลุมเป็นเวลาหนึ่งคืนก่อนการใช้งาน พลาสมาของผู้ป่วยจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ  $56^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานขององค์ประกอบ ทำการเตรียมพลาสมาเจือจางแบบอนุกรมสองขั้นตอนใน Minimal Essential Medium ของ Eagle (NewZongke อู่ฮั่น ประเทศจีน) ซึ่งมีซีรัมตัวอ่อนวัว 2% (v/v) (Gibco รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา) เชื้อ SARS-CoV-2 (สายพันธุ์ BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019 หมายเลขของศูนย์ทรัพยากรไวรัสแห่งชาติ: IVCAS 6.7512) ที่ 100 TCID<sub>50</sub> ได้ถูกบ่มโดยไม่มีหรือมีพลาสมาที่เจือจางแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  หลังจากนั้นวีโรเซลล์ E6 จะถูกทับด้วยไวรัสแขวนลอย หลังจากการติดเชื้อ 48 ชม. สามารถสังเกตเห็นการทำลายเซลล์โฮสต์ (CPE) และพิจารณาได้ด้วยตนเองจากการสำรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานกำจัดเชื้อแสดงด้วยค่าปฏิสัมพันธ์ของการเจือจางสูงสุดที่สามารถป้องกันการเกิด CPE ได้

## สถิติและความสามารถในการทำซ้ำ

การอธิบายตัวแปรต่อเนื่องที่มีการแจกแจงแบบปกติจะใช้ค่าเฉลี่ย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และสำหรับตัวแปรต่อเนื่องที่มีการแจกแจงแบบเบ้จะใช้มัธยฐาน (ช่วงอินเตอร์ควอไทล์ IQR) การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มจะใช้การทดสอบสตีเวนส์  $t$  หรือการทดสอบแมน-วิทนี  $U$  ตามความเหมาะสม สำหรับตัวแปรจัดกลุ่มจะใช้  $n$  (%) ในการอธิบาย และทดสอบด้วยการทดสอบไคสแควร์หรือการทดสอบฟิชเชอร์ การเปลี่ยนแปลงของพลวัตในการติดตามสารภูมิต้านทานตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 182 หลังจากเข้าร่วมการศึกษา จะแสดงโดยใช้โมเดลการถดถอยถ่วงน้ำหนักเฉพาะที่และการพล็อตกระจายปรับเรียบ (LOWESS) (แพ็คเกจ ggplot2 ใน R) ใช้โมเดลผสมเชิงเส้นทั่วไปในการวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับการวัดซ้ำ ค่าสองด้าน  $p < 0.05$  ถือว่ามีความสำคัญในเชิงสถิติ ระดับความสำคัญทางสถิติเป็นดังที่อธิบายดังนี้: ns, ไม่สำคัญ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดดำเนินการโดยใช้ R (The R Foundation, <http://www.r-project.org> เวอร์ชัน 4.0.0) และ SPSS (เวอร์ชัน 25, IBM สหรัฐอเมริกา) ความเที่ยงตรงและความสามารถในการทำซ้ำของชุดทดสอบการจับโมเลกุล CLIA มีความสอดคล้องเมื่อรันตัวอย่างซีรัมชุดเดียวกัน ( $n = 100$ ) อย่างเป็นอิสระในการทดลองสองครั้ง และได้รับผลที่คล้ายกันมากสำหรับการทดลองอิสระ ตัวอย่างซีรัมที่ใช้สำหรับการตรวจค่าไตเตอร์สารภูมิต้านทานได้ถูกรันเมื่อผ่านการทดสอบในการศึกษาของเราแล้ว มีการวัดความสามารถในการทำซ้ำของกิจกรรมกำจัดเชื้อในเซตย่อยของตัวอย่างซีรัม ( $n = 50$ ) และพบผลลัพธ์ที่คล้ายกันมากระหว่างการทดลองอิสระ ได้มีการทดสอบกิจกรรมกำจัดเชื้อโดยการสุ่มตัวอย่างซ้ำสามชุดจำนวนหนึ่งครั้ง สำหรับตัวอย่างซีรัมแต่ละชุดในการศึกษาของเรา

## สรุปการรายงานผล

สามารถดูข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับรูปแบบการวิจัยได้ใน [สรุปการรายงานผลที่ Nature](#) ซึ่งลิงก์มายังบทความนี้

## การเข้าถึงข้อมูล

ผู้จัดทำประกาศว่าสามารถให้ข้อมูลผู้ป่วยโดยไม่มีชื่อและข้อมูลระบุตัวตนอื่นๆ ทั้งนี้เพื่อปกป้องความเป็นส่วนตัวของผู้ป่วย ข้อมูลอื่นๆ ทั้งหมดได้แสดงไว้ในบทความและไฟล์เสริม ข้อมูลต้นฉบับได้จัดเตรียมไว้ในรูปแบบไฟล์ข้อมูลต้นฉบับ และได้ให้ข้อมูลต้นฉบับมาพร้อมกับเอกสารนี้แล้ว

## การเข้าถึงโค้ด

การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดดำเนินการโดยใช้ R (The R Foundation, <http://www.r-project.org> เวอร์ชัน 4.0.0; แพ็คเกจ ggplot2: <https://cran.rproject.org/web/packages/ggplot2/index.html>) และ SPSS (เวอร์ชัน 25, IBM สหรัฐอเมริกา)