

ปริมาณของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในละอองลอยที่ออกมาพร้อมกับลมหายใจผู้ป่วยโควิด 19 ในระหว่างการหายใจ การพูดคุย และการร้องเพลง

Kristen K. Coleman¹, Douglas Jie Wen Tay², Kai Sen Tan^{3,4,5,6}, Sean Wei Xiang Ong^{7,8}, Than The Son^{1,2}, Ming Hui Koh², Yi Qing Chin⁷, Haziq Nasir⁹, Tze Minn Mak⁷, Justin Jang Hann Chu^{3,5,6,10}, Donald K. Milton¹¹, Vincent T. K. Chow^{3,5}, Paul Anantharajah Tambyah^{5,9}, Mark Chen^{7,8}, and Kwok Wai Tham²

1. Programme in Emerging Infectious Diseases, Duke-NUS Medical School, Singapore
2. Department of the Built Environment, National University of Singapore, Singapore
3. Department of Microbiology and Immunology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, National University Health System, Singapore
4. Department of Otolaryngology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, National University Health System, Singapore
5. Infectious Diseases Translational Research Program, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, National University Health System, Singapore
6. Biosafety Level 3 Core Facility, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, National University Health System, Singapore
7. National Centre for Infectious Diseases, Singapore
8. Department of Infectious Diseases, Tan Tock Seng Hospital, Singapore
9. Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, National University Health System, National University of Singapore, Singapore
10. Institute of Molecular and Cell Biology, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore
11. Maryland Institute for Applied Environmental Health, University of Maryland School of Public Health, USA

*ผู้เขียน KKC, DJWT, KST, และ SWXO มีส่วนช่วยในการเขียนเท่ากัน ผู้เขียน TTS, MHK, YQC, HN, และ TMM มีส่วนช่วยในการเขียนเท่ากัน

ผู้เขียนบรรณกิจ (Corresponding Author): Tham Kwok Wai, PhD; 4 Architecture Drive, Singapore 117566;

Tel: +65 6516-3539, Email: bdgtkw@nus.edu.sg

บทสรุป (Summary): เราได้เก็บตัวอย่างละอองลอยที่ออกมาพร้อมกับลมหายใจผู้ป่วยโควิด 19 และค้นพบว่าละอองลอยชนิดละเอียด (≤ 5 ไมครอน) ที่ออกมาระหว่างการพูดคุยและการร้องเพลงมีปริมาณของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มากกว่าละอองลอยชนิดหยาบ (>5 ไมครอน) และอาจจะมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.

ภูมิหลัง (Background): จากหลาย ๆ เหตุการณ์ของการแพร่ระบาดเป็นวงกว้างของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้เราเชื่อได้ว่าละอองลอยมีบทบาทสำคัญในการขับเคลื่อนการระบาดของโรคโควิด 19 เพื่อให้มีความเข้าใจดีขึ้นว่าการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทางอากาศเกิดขึ้นได้อย่างไร เราจึงได้พยายามค้นหาปริมาณของเชื้อไวรัสในละอองลอยชนิดหยาบ (>5 ไมครอน) และชนิดละเอียด (≤ 5 ไมครอน) ที่ออกมาจากลมหายใจในระหว่างการหายใจ การพูดคุย และการร้องเพลง

วิธีการ (Methods): โดยการใช้เครื่องเก็บตัวอย่างลมหายใจออกชนิด G-II (G-II exhaled breath collector) เราได้ทำการวัดปริมาณของอาร์เอ็นเอเชื้อไวรัสในละอองลอยชนิดหยาบและชนิดละเอียดที่ออกมาจากลมหายใจผู้ป่วยโรคโควิด 19 ในระหว่างการหายใจเป็นเวลา 30 นาที การพูดคุยเป็นเวลา 15 นาที และการร้องเพลงเป็นเวลา 15 นาที

ผลที่ได้ (Results): พบว่ามีอาสาสมัครผู้เข้าร่วมจำนวน 13 คน (59%) ที่ในละอองลอยลมหายใจออกมีปริมาณอาร์เอ็นเอเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 อยู่ในระดับที่สามารถตรวจพบได้ ในจำนวนนี้มีอยู่ 3 รายที่เป็นผู้ป่วยไม่มีอาการ และ 1 รายเป็นผู้ป่วยในระยะก่อนมีอาการ ปริมาณไวรัสที่วัดได้อยู่ระหว่าง 63 – 5,821 N gene copies ต่อกิจกรรม (ของการหายใจออก) ต่ออาสาสมัครหนึ่งคน โดยที่ปริมาณไวรัสมีความแตกต่างกันอย่างมากในอาสาสมัครแต่ละคน ผู้ป่วยในระยะเริ่มต้น (Patients earlier in illness) มีโอกาสที่จะมีปริมาณอาร์เอ็นเอในระดับที่สามารถตรวจพบได้มากกว่า มีอาสาสมัคร 2 รายที่เก็บตัวอย่างในวันที่ 3 ของการป่วยมีปริมาณเชื้อไวรัสคิดเป็น 52% ของปริมาณเชื้อไวรัสทั้งหมด โดยรวม ๆ แล้ว 94% ของอาร์เอ็นเอเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 copies มาจากการพูดคุยและการร้องเพลง ที่น่าสนใจก็คือมีอาสาสมัครจำนวน 7 รายที่พบว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสที่ออกมาในระหว่างการพูดมากกว่าในระหว่างการร้องเพลง โดยรวม ๆ แล้วละอองลอยชนิดละเอียดมีปริมาณเชื้อไวรัสคิดเป็น 85% ของปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสมีผลเป็นลบ

สรุป (Conclusions): ละอองลอยชนิดละเอียดจากการพูดคุยและการร้องเพลงมีปริมาณของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มากกว่าละอองลอยชนิดหยาบ และอาจจะมามีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 การรับสัมผัสกับละอองลอยชนิดละเอียดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในร่มหรือภายในตัวอาคารควรได้รับการทำให้ลดความรุนแรงลง การเพาะแยกเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่มีชีวิต (viable) จากตัวอย่างละอองลอยลมหายใจยังคงเป็นเรื่องที่มีความท้าทาย และการที่เรื่องนี้จะสามารถทำได้ง่ายมากขึ้นหรือไม่สำหรับเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่กำลังอุบัติขึ้นก็เป็นคำถามเร่งด่วนซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาวิจัยในวงกว้างกันไป

คำหลัก (Keywords): severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2, aerosol

transmission, airborne transmission, respiratory virus transmission, COVID-19

บทนำ

โรคโคโรนาไวรัส 2019 (โควิด 19) มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสซาร์ส (โรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง) โคโรนาไวรัส 2 (SARS-CoV-2) ซึ่งสามารถแพร่กระจายได้อย่างมากและรวดเร็ว โดยที่ไม่คำนึงถึงอาการป่วย ผู้ป่วยโรคโควิด 19 สามารถเป็นที่สะสมหรือหลบซ่อนของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในปริมาณมากในทางเดินหายใจ [1, 2] และปล่อยอาร์เอ็นเอของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ออกสู่อากาศ [3, 4] ซึ่งอาจจะสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เอื้อและวิธีการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม [5] ถึงแม้ว่าการปล่อยเชื้อไวรัสออกมาจากการพูดคุยและการร้องเพลงจะไม่เคยมีการตรวจวัดปริมาณมาก่อนแต่ก็มีการตั้งสมมติฐานว่ากิจกรรมที่มีการปล่อยลมออกมาเหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อไวรัส [6] มีการประมาณการว่าสัดส่วนของการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่สำคัญมาจากผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ [7] และจากหลาย ๆ เหตุการณ์ของการแพร่ระบาดเป็นวงกว้างของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 [8-10] ทำให้เราเชื่อได้ว่าละอองลอยอาจจะมีความสำคัญในการขับเคลื่อนการระบาดของโรคโควิด 19 ดังนั้นมาตรการทางสาธารณสุขที่ละเอียดรอบคอบจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการจำกัดวงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประชากรที่ยังไม่ได้รับวัคซีนอย่างเพียงพอ

ละอองลอยจากลมหายใจมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วงระหว่าง 0.1–100 ไมครอน และสามารถจัดแบ่งประเภทเป็นละอองลอยชนิดหยาบ (>5 ไมครอน) และชนิดละเอียด (≤ 5 ไมครอน) ขึ้นอยู่กับว่าละอองลอยเหล่านี้สะสมอยู่ที่บริเวณใดในทางเดินหายใจ [11] ละอองลอยชนิดหยาบสามารถหายใจเข้าไปได้และจะสะสมในทางเดินหายใจส่วนบน ในขณะที่ละอองลอยชนิดละเอียดสามารถเข้าสู่ร่างกายและสะสมในบริเวณแลกเปลี่ยนอากาศในปอดได้ ซึ่งปริมาณของไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อที่ละอองลอยชนิดนี้น่าจะไปรวมทั้งความสำคัญของละอองลอยเหล่านี้ต่อการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ตลอดจนการติดเชื้อยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีพอ ผลจากการศึกษาทดลองในลิงแสดงให้เห็นว่าโควิด 19 อาจจะมีลักษณะไม่สมมาตร (anisotropic) [12] ด้วยเหตุว่ามีการเจ็บป่วยรุนแรงมากขึ้นจากการหายใจเข้ารับเอาละอองลอยติดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1–3 ไมครอนเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการฉีดเข้าทางจมูกหรือหลอดลมโดยตรง [13] อย่างไรก็ตามการศึกษาวัยบบางชิ้นก็แสดงให้เห็นถึงสเปกตรัมของโรคที่คล้ายคลึงกับในมนุษย์ที่ได้รับการฉีดเข้าทางรูจมูกรวมทั้งทางหลอดลม [14] และในลิงชนิด *Cynomolgus macaques* มีการพบเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในละอองลอยชนิดละเอียดมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดหยาบ [15] เพื่อให้มีความเข้าใจมากขึ้นว่าการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทางอากาศเกิดขึ้นได้อย่างไรและเพื่อช่วยในการออกมาตรการทางสาธารณสุขที่ละเอียดรอบคอบในการบรรเทาสถานการณ์การแพร่กระจายของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เราจึงได้พยายามค้นหาการวัดปริมาณของเชื้อไวรัสในละอองลอยชนิดหยาบและชนิดละเอียดที่ออกมาจากลมหายใจของผู้ป่วยโควิด 19 ในระหว่างการหายใจ การพูดคุย และการร้องเพลง

การรับสมัครผู้ป่วยและการเก็บข้อมูล (Patient Recruitment and Data Collection)

มีการรับสมัครอาสาสมัครเข้าร่วมในการศึกษาวัยบระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2564 ที่ศูนย์

ควบคุมโรคติดต่อแห่งชาติ (the National Centre for Infectious Diseases) ในสิงคโปร์ ในช่วงระยะการระบาดครั้งนี้ตามนโยบายการสาธารณสุขแห่งชาติทุกคนในประเทศสิงคโปร์ที่ได้รับการยืนยันว่าติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ไม่ว่าจะเป็นอาการหรือสถานะทางคลินิกเป็นอย่างไรก็ตามต้องได้รับการแยกกักตัวเป็นผู้ป่วยในและการประเมินก่อนที่จะส่งต่อไปกักตัวในสถานที่ที่กำหนดให้ ผู้ป่วย ในที่รับมาใหม่ทุกคนได้รับการตรวจคัดกรองตามเกณฑ์ต่อไปนี้คือ มีอายุตั้งแต่ 21 ปีขึ้นไป มีผลการตรวจโควิดโดยวิธี reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) เป็นบวก และมีการจดบันทึกเก็บข้อมูลประชากรพื้นฐาน มีการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับอาการของโรคตามรายการของโรค 7 อาการที่ระบุไว้ก่อนล่วงหน้า สำหรับผู้ที่ไม่มีอาการมีการบันทึกให้วันที่ตรวจวินิจฉัยเป็นวันที่ 1 ของการเจ็บป่วย ค่า Cycle threshold (Ct) ของตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิกจากระบบทางเดินหายใจและผลการตรวจซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทาง serology ได้รับจากข้อมูลเวชระเบียน และข้อมูล Virus genome sequence ได้รับจากบันทึกข้อมูลของห้องปฏิบัติการสาธารณสุขแห่งชาติ (National Public Health Laboratory)

การเก็บตัวอย่างลมหายใจออก (Expiratory Sample Collection)

ตัวอย่างลมหายใจออกได้รับการเก็บโดยใช้เครื่องเก็บตัวอย่างลมหายใจออกชนิด G-II ตามที่อธิบายไว้อย่างละเอียดโดยแม็คเดวิดต์และคณะ [16] กล่าวโดยย่อก็คืออาสาสมัครจะนั่งหันหน้าเข้าหาห้องรับอากาศเข้าที่มีรูปร่างทรงกรวยตัดโดยที่มีอากาศถูกดูดอย่างต่อเนื่อง (130 ลิตร/นาที) รอบ ๆ ศีรษะของอาสาสมัครเข้าสู่เครื่องเก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 1) กรวยที่วางนี้ทำหน้าที่เป็นเหมือนปล่องพัดลมดูดอากาศซึ่งสามารถเก็บรวบรวมอนุภาคที่ออกมาจากการหายใจออกโดยที่จะหลุดเล็ดรอดออกไปได้น้อยมาก อาสาสมัครจะถูกขอให้ทำกิจกรรม 3 อย่างแยกกันในวันเดียวกันคือ หายใจเข้าออกเป็นเวลา 30 นาที พูดคุยเป็นเวลา 15 นาที และร้องเพลงเป็นเวลา 15 นาที สำหรับกิจกรรมการพูดคุยอาสาสมัครถูกขอให้พูดตามข้อความที่อ่านให้ฟังจากหนังสือวรรณกรรมสำหรับเด็กเรื่อง Green Eggs and Ham ของ Dr. Seuss สำหรับกิจกรรมการร้องเพลงอาสาสมัครถูกขอให้ร้องเพลง Happy Birthday! เพลง ABC song! เพลง Twinkle, Twinkle Little Star! และเพลง We Wish You a Merry Christmas! โดยมีดนตรีประกอบ ละอองลอยได้รับการเก็บเป็น 2 ขนาด คือชนิดหยาบ (>5 ไมครอน) และชนิดละเอียด (≤5 ไมครอน) ละอองลอยชนิดหยาบถูกเก็บโดยการกระทบกับพื้นผิว Teflon® โดยที่ตัวกระทบ (Teflon® impactor) จะถูก swab จำนวน 3 ครั้ง จากปลายข้างหนึ่งถึงปลายอีกข้างหนึ่ง ก่อนอื่น flocked swab จะถูกจุ่มลงในสารละลาย

1× phosphate buffered saline (PBS) ที่มี 0.1% bovine serum albumin (BSA) ในระหว่างการ swab นี้ swab จะถูกหมุนเพื่อให้แน่ใจว่าทุกพื้นผิวของส่วนปลายมีการสัมผัสกับตัวกระทบ (impactor) เพื่อให้สามารถเก็บอนุภาคชนิดหยาบกลับคืนให้มากที่สุด จากนั้นจะใส่ flocked swab ลงในหลอดรูปทรงกรวยขนาด 15 มิลลิลิตรซึ่งมีสารละลาย 1× PBS ที่มี 0.1% BSA อยู่ในปริมาณ

1 มิลลิลิตร ส่วนอนุภาคชนิดละเอียดได้รับการเก็บโดยการ condensation growth และการกระทบ (impaction) บนพื้นผิวเหล็กกล้าสูงที่กักเก็บซึ่งมีสารละลาย 1× PBS ที่มี 0.1% BSA และถูกจัดเก็บในหลอดทรงกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร การทำ condensation growth กระทำโดยการฉีดพ่นไอน้ำปริมาณเล็กน้อยลงในอากาศและลมหายใจในช่องรับอากาศเข้าที่มีความชื้นอยู่แล้วและทำให้เย็นลงทันทีใน heat exchanger ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ -2°C เพื่อให้เกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ที่เพียงพอในการทำให้อนุภาคละเอียดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≥0.05 ไมครอนเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเป็น ≥1.0 ไมครอน ในระหว่างแต่ละกิจกรรมเครื่องเก็บตัวอย่าง G-II ได้รับการ decontaminate โดยใช้ 10% bleach และล้างออกด้วยน้ำและเช็ดให้แห้ง

การ process ตัวอย่างส่งตรวจและการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (Sample Processing and Laboratory Analyses)

ตัวอย่างส่งตรวจได้รับการขนส่งเพื่อ process ในห้องปฏิบัติการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 ของมหาวิทยาลัยแห่งชาติของสิงคโปร์ (National University of Singapore Biosafety Level 3 Laboratory) ในวันเดียวกันกับการเก็บตัวอย่าง (ดูรายละเอียดวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในหัวข้อ Supplementary Materials) ตัวอย่าง swab ของอนุภาคละอองลอยชนิดหยาบถูก vortex และ aliquote ลงในหลอดฝาเกลียวขนาด

ความจุ 1.5 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างของอนุภาคละอองลอยชนิดละเอียดจะถูกเพิ่มความเข้มข้นโดยการ centrifugal ultrafiltration และใส่ media ลงไปจนมีปริมาตร

1.6 มิลลิลิตร เซลล์ Vero E6 ถูกใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างอนุภาคละอองลอยชนิดละเอียดในวันเดียวกันกับการ process ส่วนตัวอย่างของอนุภาคละอองลอยชนิดหยาบไม่ต้องการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพราะว่ามีวิธีการกระทบ (impaction method) ไม่ได้รับการออกแบบมาสำหรับการตรวจวิเคราะห์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ [16] อาร์เอ็นเอถูกสกัดจากแต่ละตัวอย่างโดยการใส่ชุด QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิต มีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี CDC N1 (ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค สหรัฐอเมริกา) สำหรับการตรวจหาเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมดได้รับการตรวจวิเคราะห์เป็น 2 ชุด (duplicate) copies ของอาร์เอ็นเอไวรัสได้รับการคำนวณจาก standard curve ที่สร้างขึ้นโดยมี N gene positive control plasmid (Integrated DNA Technologies, USA)

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analyses)

การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยใช้โปรแกรม STATA version 13.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA) การทดสอบแบบ Fisher's exact test ถูกใช้ในการเปรียบเทียบตัวแปรเชิงคุณภาพ (categorical variables) ในขณะทำการทดสอบแบบ Mann-Whitney U test ถูกใช้ในการเปรียบเทียบตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ระหว่างผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสในระดับที่ตรวจพบได้กับผู้ป่วยที่ไม่มีปริมาณไวรัสในระดับที่ตรวจพบได้ เพื่อที่จะระบุตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัสในละอองลอยจากลมหายใจ การทดสอบแบบ Kruskal-Wallis test ถูกใช้ในการเปรียบเทียบค่ากลางมัธยฐานของปริมาณเชื้อไวรัสจากกิจกรรมแต่ละอย่างภายในกลุ่มย่อยของผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสจากละอองลอยลมหายใจในระดับที่ตรวจพบได้ การทดสอบทางสถิติทั้งหมดเป็นแบบ two-sided และค่า p-value ที่ต่ำกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญ

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results)

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจำนวน 23 คน รวมทั้ง 1 คนที่ถอนตัวออกไปก่อนที่จะมีการเก็บตัวอย่าง ในบรรดาอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่เหลืออยู่จำนวน 22 คนนี้ 19 คน (86%) เป็นเพศชาย ค่ากลาง (มัธยฐาน) ของอายุอยู่ที่ 38 ปี (พิสัยช่วงอายุ 23–66 ปี) อาสาสมัครจำนวน 5 คน (23%) ไม่มีอาการ (ไม่เคยมีอาการใด ๆ) 13 คน (59%) มีปริมาณอาร์เอ็นเอของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในละอองลอยลมหายใจอยู่ในระดับที่สามารถตรวจพบได้ (ตารางที่ 1) ซึ่งรวมทั้งผู้ป่วยที่ไม่มีอาการจำนวน 3 คน และผู้ป่วยก่อนระยะมีอาการจำนวน 1 คน จำนวนชุดของอาร์เอ็นเอของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่ปล่อยออกมาต่อหนึ่งกิจกรรมต่ออาสาสมัครหนึ่งคน (หายใจเป็นเวลา 30 นาที พูดคุยเป็นเวลา 15 นาที หรือร้องเพลงเป็นเวลา 15 นาที) มีค่าอยู่ในช่วง 63–5,821 viral N gene copies อายุ เพศ ชนิดสายพันธุ์ไวรัส อาการทางคลินิก ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่มีอยู่ในระหว่างการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งค่า Ct value ของตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิกในระหว่างการตรวจวินิจฉัยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้ป่วยที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสจากละอองลอยลมหายใจในระดับที่ตรวจพบได้กับผู้ป่วยที่ไม่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสจากละอองลอยลมหายใจในระดับที่ตรวจพบได้ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามค่ากลาง

(มัธยม) ของจำนวนวันที่เจ็บป่วยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือผู้ป่วยที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสจากล่องลอยลมหายใจในระดับที่ตรวจพบได้อยู่ในระยะแรก ๆ ของการเจ็บป่วย (ค่ากลางมัธยมฐานของจำนวนวันที่เจ็บป่วย 3 วัน เปรียบเทียบกับ 5 วัน ค่า $p\text{-value} = 0.025$) ผู้ป่วยที่มีปริมาณเชื้อไวรัสมากที่สุด (อาสาสมัครคนที่ 12 และ 16) ได้รับการเก็บตัวอย่างในวันที่ 3 ของการเจ็บป่วยและมีปริมาณเชื้อไวรัสคิดเป็น 52.4% ของปริมาณเชื้อไวรัสทั้งหมดในการศึกษาวิจัยของเราครั้งนี้

อาสาสมัครจำนวน 6 คน (27%) ปลดปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในระดับที่สามารถตรวจพบได้จากทั้ง 3 กิจกรรม อาสาสมัครจำนวน 2 คน (9%) ปลดปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในระดับที่สามารถตรวจพบได้จากล่องลอยชนิดละเอียดในระหว่างกิจกรรมการพูดคุยเท่านั้น อีก 2 คนปลดปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในระดับที่สามารถตรวจพบได้จากการร้องเพลงเท่านั้น จากการสังเกตไม่พบผู้ป่วยรายใดที่เกิดการจามในระหว่างการเก็บตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามสังเกตพบว่ามีอาสาสมัครจำนวน 2 คนมีการไอ อาสาสมัครหมายเลข 4 ผู้ซึ่งปลดปล่อยอาร์เอ็นเอออกมาในปริมาณ 417 copies จากล่องลอยชนิดละเอียดในระหว่างกิจกรรมการพูดคุยมีการไอระหว่างการพูดคุยและการร้องเพลง อาสาสมัครหมายเลข 22 มีการไอบ่อยครั้งในระหว่างทำกิจกรรมทั้ง 3 อย่างแต่ก็ไม่ได้มีการปลดปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสออกมาในระดับที่สามารถตรวจพบได้ เมื่อรวมเข้าด้วยกันแล้วพบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ส่วนใหญ่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการร้องเพลง (53%) ตามมาด้วยการพูดคุย (41%) และการหายใจ (6%)

(ตารางที่ 3)

ปริมาณเชื้อไวรัสในล่องลอยจากการหายใจมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างกิจกรรมทั้งสาม โดยที่อาสาสมัครจำนวน 7 คนปลดปล่อยปริมาณไวรัสออกมาในระหว่างการพูดคุยมากกว่าระหว่างการร้องเพลง เมื่อทำการเปรียบเทียบในบรรดาผู้ป่วยที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากล่องลอยในระดับที่สามารถตรวจพบได้ ($n=13$) ค่ากลางมัธยมฐานของจำนวน viral N gene copies จากกิจกรรมการร้องเพลงอยู่ที่ 713.6 (IQR 135.1–1216.1) เปรียบเทียบกับจำนวน 477.9 (IQR 234.5–1356.6) จากกิจกรรมการพูดคุย และจำนวน 63.5 (0–227.6) จากกิจกรรมการหายใจ (Kruskal-Wallis test, $p=0.026$) จากการเปรียบเทียบเพิ่มเติมพบว่ายังคงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสำหรับล่องลอยชนิดละเอียด แต่สำหรับล่องลอยชนิดหยาบกลับไม่เป็นเช่นนั้น (ตารางที่ 4) เมื่อรวมเข้าด้วยกันแล้วปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในล่องลอยชนิดละเอียด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≤ 5 ไมครอน) สูงถึง 85.4% ของปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสทั้งหมดที่ตรวจพบในการศึกษาวิจัยของเราครั้งนี้

สายพันธุ์ซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (SARS-CoV-2 Variants)

ในการศึกษาวิจัยของเราพบว่าอาสาสมัครจำนวน 16 คน (73%) มีการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 สายพันธุ์ที่กำลังเป็นที่กังวล (variant of concern หรือ VOC) หรือสายพันธุ์ที่กำลังเป็นที่สนใจ (variant of interest หรือ VOI) (ตารางที่ 1) เนื่องจากสายพันธุ์อื่น ๆ (non-VOC/VOI variants) มีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถกำหนดรูปแบบ shedding patterns ของล่องลอยเกี่ยวกับชนิดสายพันธุ์ได้

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (SARS-CoV-2 Culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไวรัสมีผลเป็นลบหลังจาก 2 passages ติดต่อกัน เซลล์ Vero E6 ที่ติดเชื้อ known SARS-CoV-2 isolate (positive control) แสดง CPE ที่ชัดเจนในขณะที่เซลล์ Vero E6 ที่ไม่ติดเชื้อ (negative control) ยังคงเป็น healthy cell monolayer

การอภิปราย (Discussion)

การศึกษาวิจัยของเราแสดงให้เห็นว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 สามารถแพร่กระจายในรูปละอองลอยได้ ถึงแม้ไม่มีอาการไอจามหรือกิจกรรมทางการแพทย์ที่ทำให้เกิดละอองลอยก็ตาม มากกว่าครึ่งหนึ่งของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ของเรามีการปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากละอองลอยลมหายใจในระดับที่ตรวจพบได้ รวมทั้งผู้ป่วยจำนวน 3 คนที่ไม่มีอาการและผู้ป่วย 1 คนในระยะก่อนการแสดงอาการ ผู้ป่วยในระยะเริ่มแรกของการเจ็บป่วยมีโอกาสมิที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอในระดับที่สามารถตรวจพบได้มากกว่า ซึ่งก็สอดคล้องกันกับผลการศึกษาวิจัยอื่น ๆ หลายชิ้นซึ่งแสดงถึงปริมาณเชื้อไวรัสที่สูงกว่าในตัวอย่างทางคลินิกจากผู้ป่วยในระยะเริ่มแรกของการเจ็บป่วย [17] อาสาสมัครจำนวน 2 คนที่เก็บตัวอย่างในวันที่ 3 ของการเจ็บป่วยมีปริมาณเชื้อไวรัสคิดเป็น 52.4% ของปริมาณเชื้อไวรัสทั้งหมดที่ตรวจพบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาวิจัยในเรื่องการกระจายตัวมากเกินไป (overdispersion) [18] และความโดดเด่น (predominance) ของเหตุการณ์การแพร่ระบาดในวงกว้าง ถึงแม้ว่าปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสทั้งหมดจะอยู่ในระดับที่ต่ำแต่ก็มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการหายใจ การพูดคุย และการร้องเพลง โดยที่พบว่าระหว่างการร้องเพลงมีการปล่อยปริมาณไวรัสในละอองลอยออกมามากที่สุดและระหว่างการหายใจมีการปล่อยปริมาณไวรัสในละอองลอยออกมาน้อยที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอาสาสมัครจำนวน 7 คนที่ปล่อยอาร์เอ็นเอไวรัสออกมาในปริมาณที่ใกล้เคียงหรือมากกว่าจากการพูดคุยเมื่อเปรียบเทียบกับจากการร้องเพลง ถึงแม้ว่าในการศึกษาวิจัยของเราไม่มีการวัดค่าความดังของเสียงแต่แบบจำลองการปล่อยละอองลอยซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ก็แสดงให้เห็นถึงอัตราการปล่อยละอองลอยที่ใกล้เคียงกันระหว่างการพูดคุยดัง ๆ กับการร้องเพลง [18] โดยรวมแล้ว 85% ของปริมาณไวรัสทั้งหมดถูกปล่อยออกมาในละอองลอยชนิดละเอียด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≤ 5 ไมครอน) เมื่อเปรียบเทียบกับละอองลอยชนิดหยาบ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง > 5 ไมครอน) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตที่วอณูภาคที่มีขนาดเล็กกว่า (0.65–4.7 ไมครอน) มีปริมาณอนุภาคไวรัสสูงถึง 77–79% ของปริมาณอนุภาคไวรัสทั้งหมดที่ปล่อยออกมาจากลิง cynomolgus macaques ที่ติดเชื้อจากการทดลอง [15] ผลการศึกษาวิจัยของเราแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของละอองลอยชนิดละเอียดจากลมหายใจในการมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในชุมชน ซึ่งสอดคล้องกันกับความเห็นของผู้เชี่ยวชาญอื่น ๆ ซึ่งทำให้เราเชื่อได้ว่าเหตุการณ์การแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ได้รับการขับเคลื่อนมาจากการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศ [19] และการจำกัดควบคุมเชื้อไวรัสเป็นไปด้วยความยากลำบาก ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของเรายังสนับสนุนให้มีการปกป้องระบบทางเดินหายใจอย่างถูกต้องเหมาะสม (เช่น การสวมหน้ากากอนามัย หน้ากากกรองอากาศชนิด N95 ชนิด FFP3 หรือเทียบเท่าสำหรับบุคลากรทางการแพทย์และเจ้าหน้าที่ด่านหน้า) ตลอดจนให้มีรูปแบบการไหลของอากาศ การระบายอากาศ การกรอง และการพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อทำความสะอาดที่ปลอดภัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งแวดล้อมในร่มหรือภายในตัวอาคาร [20] เช่น โรงเรียน เพื่อลดการสัมผัสกับละอองลอยชนิดละเอียดของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ถึงแม้ว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสที่มีชีวิตสามารถทำได้ก็ตาม

ในขณะที่ก่อนหน้านี้มีการแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคโควิด 19 สามารถปล่อยละอองลอยที่มีเชื้อไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้ออกสู่สิ่งแวดล้อม [5, 21] แต่การศึกษาวิจัยที่เก็บตัวอย่างซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ก็ไม่สามารถนำเชื้อไวรัสที่มีชีวิตจากอากาศในสภาพแวดล้อมใกล้ตัวผู้ป่วยโรคโควิด 19 มาเพาะแยกเชื้อได้ [22] ด้วยเหตุนี้สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อที่ปล่อยออกมาผ่านทางลมหายใจของผู้ป่วยจึงยังไม่ชัดเจน ในการศึกษาวิจัยของเรา การที่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสที่มีชีวิตจากตัวอย่างละอองลอยลมหายใจซึ่งเก็บตัวอย่างโดยตรงจากตัวผู้ป่วย (ไม่ใช่เก็บจากสิ่งแวดล้อมรอบตัวผู้ป่วย) มีความเป็นไปได้ว่ามีความสัมพันธ์กันกับปริมาณไวรัสในระดับต่ำ ๆ ในตัวอย่างของเราเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไวรัสที่พบกันทั่วไปในตัวอย่างทางคลินิกที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ การศึกษาวิจัยของเรามีข้อจำกัด กล่าวคือไม่ได้มีการเก็บตัวอย่าง swab จากทางเดินหายใจในวันที่เราเก็บตัวอย่างละอองลอยเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culturability) อย่างไรก็ตามมีผลการศึกษาวิจัยหลายชิ้นที่รายงานไว้สำหรับตัวอย่างทางคลินิกของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ปริมาณไวรัสที่อยู่ระหว่าง 10^5 ถึง 10^6 genome copies/mL จำเป็นสำหรับการเพาะแยกเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในหลอดทดลอง (*in vitro*) [23] วิธีการเก็บตัวอย่างของเราทำให้เราได้ปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสต่ำกว่า

$10^{3.8}$ genome copies ต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งทำให้เราเชื่อได้ว่าจำเป็นต้องขยายระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างให้ยาวนานขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณไวรัสในระดับที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่วิกฤต (critical mutations) ในซาร์สโคโรนาไวรัส 2 บางสายพันธุ์ก็สามารถเพิ่มความสามารถในการติดเชื้อไวรัสได้ [24] ตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยบางรายที่ติดเชื้อสายพันธุ์เดลต้ามีปริมาณไวรัสที่สูงขึ้นในตัวอย่าง swab จากทางเดินหายใจ [25] สายพันธุ์ต่าง ๆ ของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เหล่านี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์เดลต้า [25] สามารถทำให้เกิดอัตราการติดเชื้อรอบ 2 สูงกว่าสายพันธุ์ต่าง ๆ ก่อนหน้านั้น [26] และอาจจะสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อได้อย่างประสบความสำเร็จได้มากขึ้นจากตัวอย่างละอองลอยในการศึกษาวิจัยในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหากผู้ป่วยได้รับการเก็บตัวอย่างในระหว่างช่วงเวลาสั้น ๆ ที่มีการปล่อยเชื้อไวรัสออกมาในปริมาณสูง (enhanced viral shedding) [27] ควรมีการศึกษาวิจัยให้มากกว่านี้ในการทดสอบสมมติฐานนี้ เพราะว่าการศึกษาวิจัยของเราครั้งนี้มีอาสาสมัครเพียง 4 คนเท่านั้นที่มีการติดเชื้อจากสายพันธุ์

อื่น ๆ (non-VOC/VOI variants) และมีเพียง 1 คนเท่านั้นที่มีการติดเชื้อจากสายพันธุ์เดลต้า ด้วยเหตุนี้การเปรียบเทียบรูปแบบของการปล่อยละอองลอย (aerosol shedding pattern) ระหว่างซาร์สโคโรนาไวรัส 2 สายพันธุ์ก่อนหน้านี้กับสายพันธุ์ใหม่ ๆ จึงไม่อาจกระทำได้นอกจากนี้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในการศึกษาวิจัยของเราเราก็ไม่ได้ใช้เซลล์ Vero E6 ที่แสดง transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) ซึ่งสามารถยึดเกาะกับโปรตีนรูปหนามของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าและช่วยให้เกิดการ **early surface-mediated cell entry และ viral fusion** [28, 29] ถึงแม้ว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากตัวอย่างน้ำลายและ swab จากทางเดินหายใจจะสามารถเพาะแยกเชื้อได้โดยใช้วิธีการดั้งเดิมคือใช้เซลล์ Vero E6 แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความไว (sensitivity) มากกว่าซึ่งใช้เซลล์ Vero E6 TMPRSS2 ก็อาจจะดีกว่าในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากตัวอย่างละอองลอยที่ออกมาจากผู้ป่วย เซลล์ bronchial epithelial ของมนุษย์อาจจะมีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสในธรรมชาติ (wild type virus) มากกว่าเซลล์ Vero ด้วย [24] ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อที่จะหาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับตัวอย่างจากลมหายใจออกและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เราสังเกตเห็นว่าผู้ป่วยในระยะแรก ๆ ของการเจ็บป่วยมีความเป็นไปได้มากกว่าในการปล่อยปริมาณของไวรัสออกมากับละอองลอยในระดับที่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาในลิงเมื่อเร็ว ๆ นี้ซึ่งบ่งชี้ว่าการปล่อยละอองลอยเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีการลดลงอย่างมากใน 4 วันหลังจากการติดเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับใน 2 วันหลังจากการติดเชื้อ [15] และยังสอดคล้องกับปริมาณของไวรัสในระดับที่สูงกว่าและความสามารถในการติดเชื้อที่มากกว่าซึ่งพบในตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิกจากมนุษย์ที่เก็บในระยะแรก ๆ ของการเจ็บป่วย [17] นอกจากนี้ neutralizing antibodies ก็เริ่มปรากฏในผู้ป่วยโรคโควิด 19 5 วันหลังจากเริ่มมีอาการ [30] ซึ่งอาจจะลดและ neutralize ไวรัสที่ปล่อยออกมาทำให้ไม่เกิดการ isolation ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ถึงแม้ว่าอาสาสมัครจำนวน 17 คน (77%) มีผลการตรวจเป็น seronegative (ตารางที่ 1) แต่การตรวจทาง serology ที่ใกล้เคียงกับวันเก็บตัวอย่างน่าจะเป็นตัวชี้วัดที่ดีกว่าในการบ่งชี้การติดเชื้อในระหว่างการเก็บตัวอย่างละอองลอย ถึงแม้ว่าอาสาสมัครจำนวน 12 คน (55%) ได้รับการเก็บตัวอย่างโดยใช้เครื่อง G-II ภายใน 5 วันหลังจากเริ่มมีอาการ (และอาสาสมัครหมายเลข 9 ซึ่งได้รับการเก็บตัวอย่าง 2 วัน ก่อนเริ่มมีอาการ) แต่เราก็ก้มเหลวในการเพาะแยกเชื้อไวรัสที่ยังมีชีวิต

ซึ่งชวนให้น่าเชื่อได้ว่าอาสาสมัครอาจจะจำเป็นต้องได้รับการเก็บตัวอย่างในระยะแรกของการติดเชื้อนั้น ๆ กว้างนั้นหรือใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างให้ยาวนานขึ้น นอกจากนี้มีอาสาสมัคร 2 คนที่ได้รับการเก็บตัวอย่างในวันที่ 3 ของการเจ็บป่วยที่พบปริมาณไวรัสสูงถึง 52% ของปริมาณไวรัสทั้งหมดที่ตรวจพบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการศึกษาวิจัยเมื่อไม่นานมานี้เกี่ยวกับการปล่อยละอองลอยเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึง heterogeneity ที่กว้างในระหว่างผู้ป่วยแต่ละราย [18] ข้อมูลเมื่อเร็ว ๆ นี้ยังบอกด้วยว่าเฉพาะแค่เพียง 2% ของผู้ติดเชื้อมีปริมาณไวรัสสูงถึง 90% ของปริมาณไวรัสทั้งหมดที่กระจายอยู่ในประชากรในห้วงเวลาหนึ่ง ๆ [27] สิ่งนี้บอกเป็นนัยว่ามีผู้ป่วย active case 1 รายเท่านั้นใน 50 ราย ณ ห้วงเวลาหนึ่ง ๆ ที่น่าจะมีปริมาณไวรัสในระดับสูง ๆ อยู่ในลมหายใจออก ความเป็นไปได้ที่จะตรวจพบผู้ป่วยเช่นที่ว่านี้ถูกจำกัดโดยขนาดของกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็กของเรา ขนาดของกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็กของเราจะถูกจำกัดต่อมาจากลักษณะทางประชากรที่ค่อนข้างไปทางเพศชายวัยหนุ่มมากกว่า ดังนั้นผู้วิจัยจะต้องทำงานกับผู้ติดตามการสัมผัสติดต่อ (contact tracers) ในการแยกผู้ป่วยเชิงรุกและมีกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ของผู้ที่ติดต่อสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เมื่อไม่นานมานี้เพื่อให้มีข้อมูลที่มีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุดเกี่ยวกับการปล่อยไวรัสในชุมชนทั่วทุกกลุ่มประชากรที่ยังมีช่องว่างการวิจัย (research gap)

เท่าที่เรารู้นี่เป็นการศึกษาวิจัยชิ้นแรกในการวัดปริมาณเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในละอองลอยที่เกิดจาก

การร้องเพลง ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของเราสนับสนุนข้อมูลจากการจำลองในห้องปฏิบัติการที่มีอยู่ [31, 32] และ

สามารถอธิบายการระบาดมากมายหลายครั้งของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ผ่านทางอากาศที่เกี่ยวกับการร้องเพลง [8, 9,

33-35] ความหนาแน่นของละอองลอยที่เกิดจากการร้องเพลงอยู่ในระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจากการพูดคุย

โดยที่ความดังของเสียงมีผลกระทบอย่างมากต่อปริมาณของละอองลอยที่ปล่อยออกมา [31, 32, 36] อย่างไรก็ตาม

พบว่ามี ความแตกต่างกันสูงในแต่ละคนในการปล่อยไวรัสระหว่างกิจกรรม มีผู้ที่ปล่อยละอองลอยในปริมาณที่สูงกว่า

ค่าเฉลี่ย (เรียกกันว่าเป็น Super-emitters!) แต่ก็ไม่ใช่ที่ชัดเจนว่าอะไรเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปรากฏเช่นนั้น [37]

ที่น่าสนใจคือมีอาสาสมัครจำนวนเล็กน้อยที่ปล่อยละอองลอยจากการหายใจมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจากการพูด

คุย [32] ซึ่งสิ่งนี้อาจจะอธิบายได้เป็นบางส่วนเกี่ยวกับอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีอาการซึ่งปล่อยซาร์สโคโรนาไวรัส 2

จากการหายใจในปริมาณที่สูงกว่าจากการพูดคุย เหตุผลทางด้านสรีรวิทยาหรือเหตุผลเกี่ยวกับการทดลองที่เป็นมูล

เหตุของเรื่องนี้ไม่เป็นที่ชัดเจน

ผลจากการศึกษาวิจัยของเราเน้นย้ำให้เห็นถึงความสำคัญของการลดการสัมผัสกับละอองลอยชนิดละเอียดจากการ

หายใจโดยไม่มียาป้องกัน (through non-pharmaceutical interventions (NPIs)) เช่น การสวมหน้ากากอนามัย การเว้นระยะห่างทางกายภาพ และการเพิ่มการระบายอากาศภายในห้องในระหว่างการระบาดของโรคโควิด 19 นอกจากนี้เครื่องฟอกอากาศประสิทธิภาพสูงชนิดพกพา (high efficiency particulate air (HEPA) cleaners) ในสิ่งแวดล้อมภายในอาคารก็สามารถช่วยลดการสัมผัสกับละอองลอยจากลมหายใจออกได้สูงถึง 90% เมื่อใช้ร่วมกันกับการสวมหน้ากากอนามัย และสูงถึง 65% เมื่อไม่ได้สวมหน้ากากอนามัย [38] ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าการใช้วิธีการต่าง ๆ ผสมผสานกันเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดใน การลดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในอากาศ วิธีการอื่น ๆ (non-pharmaceutical interventions (NPIs)) ได้แก่ การฆ่าเชื้อในอากาศในห้องชั้นบน ๆ ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และการใช้พัดลมในการควบคุมรูปแบบการไหลของอากาศภายในบริเวณ ในสถานการณ์ที่มีการร้องเพลงจะต้องพิจารณาถึงการเว้นระยะห่างที่ปลอดภัยจากตัวเครื่อง หลีกเลียงและกรองการไหลของอากาศจากคณนักร่องไปสู่ผู้ชม (เช่น โดยการใช้ม่านกันลม) สำหรับในสถานการณ์การพูดคุยก็ควรพิจารณารูปแบบการไหลของอากาศ และลดการสัมผัสให้น้อยที่สุดโดยการจัดตำแหน่งที่นั่งและการจัดวางเฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ การเว้นระยะห่าง และการปรับเปลี่ยนการเคลื่อนที่ของอากาศ (เช่น ใช้พัดลม รวมทั้งพัดลมตั้งโต๊ะ) [39, 40]

สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

ละอองลอยชนิดละเอียด (ขนาด ≤ 5 ไมครอน) จากการพูดคุยและการร้องเพลงมีปริมาณของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มากกว่าละอองลอยชนิดหยาบ (ขนาด >5 ไมครอน) และอาจจะมีความสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ดังนั้นการสัมผัสกับละอองลอยชนิดละเอียดจึงควรได้รับการลดความรุนแรงลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในร่มหรือ ภายในตัวอาคาร ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทางอากาศได้มากที่สุด ในขณะที่ผู้ป่วยโรคโควิด 19 ในระยะแรก ๆ ของโรคมีความเป็นไปได้ที่จะมีปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากละอองลอยลมหายใจในระดับที่สามารถตรวจพบได้ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากตัวอย่างละอองลอยลมหายใจของผู้ป่วยเหล่านี้ยังคงเป็นเรื่องที่ท้าทาย และปริมาณไวรัสที่ปล่อยออกมามีความแตกต่างกันอย่างมากในอาสาสมัครแต่ละคน มีความจำเป็นในการที่จะต้องพิจารณาอย่างรอบคอบในเรื่องวิธีการและช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง สถานะของการติดเชื้อของผู้ป่วยในระหว่างการเก็บตัวอย่าง ตลอดจนวิธีการในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไวรัส นอกจากนี้การที่เพาะแยกเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่มีชีวิต (viable) จากตัวอย่างละอองลอยลมหายใจจะสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ได้ง่ายมากขึ้นหรือไม่จากการเก็บตัวอย่างในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่กำลังอุบัติขึ้นก็เป็นคำถามเร่งด่วนซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยในอนาคตกันต่อไป การลดการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศโดยการเปลี่ยนหรือหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับการไหลของอากาศโดยตรงในระหว่างการร้องเพลงและการพูดคุยกัน ในร่มหรือภายในตัวอาคารอาจจะเป็นทางเลือกอย่างหนึ่งในการปฏิบัติที่มีความสำคัญ

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment)

เราขอขอบคุณ Tan Chorh Chuan และ Leo Yee-Sin สำหรับการสนับสนุนด้านธุรการ และขอขอบคุณ Julian Tang สำหรับความรู้ความเข้าใจเชิงลึกทางด้านไวรัสวิทยา และเราขอขอบคุณ Chandra Sekhar กับ David Kok Wai Cheong สำหรับการช่วยประกอบเครื่องเก็บตัวอย่าง G-II machine และขอขอบคุณ Somayeh Youssefi และ Jacob Bueno De Mesquita รวมทั้ง Jovan Pantelic สำหรับคำแนะนำในการประกอบและใช้งานเครื่องเก็บตัวอย่าง G-II machine ขอขอบคุณ Raymond Lin และ Lin Cui สำหรับการแบ่งปันข้อมูลการทำ whole genome sequencing และเราขอขอบคุณ Margaret Soon, Phoon Long Yoke, Loh Kyun Yen, Pang Jia Xin ตลอดจนเจ้าหน้าที่พยาบาล เจ้าหน้าที่ควบคุมโรคติดเชื้อ และเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการทุกท่านที่ the National

Centre for Infectious Diseases สำหรับการสนับสนุน สุดท้ายนี้เราขอขอบคุณทีม NUS BSL-3 Core Facility สำหรับการสนับสนุนในด้านกระบวนการและวิธีปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ BSL-3 procedures เราขอขอบคุณ the University of Maryland สำหรับการสนับสนุนเครื่องเก็บตัวอย่าง G-II สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยคณะกรรมการ the National Healthcare Group Domain Specific Review Board ตามหมายเลขอ้างอิงเลขที่ 2020/01113 และได้รับเอกสารแสดงความยินยอมจากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมทุกคน

เงินทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัย (Funding)

งานศึกษาวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนจาก the Singapore National Medical Research Council [COVID19RF3-0080 to T.K.W., K.K.C., and M.C., and NMRC/CG/M009/2017 NUH/NUHS to J.J.H.C.] และ the National University of Singapore [NUS Reimagine Research Grant to J.J.H.C.].

ถ้อยแถลงเกี่ยวกับผลประโยชน์ทับซ้อน (Conflict of Interest Statement)

ผู้เขียน P.A.T. รายงานการได้รับเงินทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจาก Roche, Arcturus, Johnson and Johnson, Sanofi Pasteur รวมทั้งค่าตอบแทนเป็นการส่วนตัวจาก AJ Biologicals ซึ่งอยู่นอกเหนือจากงานศึกษาวิจัยนี้ ผู้เขียนคนอื่น ๆ ที่เหลือประกาศว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนใด ๆ ผู้เขียนทั้งหมดได้มีการลงทะเบียนในรูปแบบฟอร์ม ICMJE (ICMJE Form) ในการเปิดเผยเกี่ยวกับความเป็นไปได้เรื่องผลประโยชน์ทับซ้อนเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

1. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LL, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet infectious diseases* **2020**; 20(4): 411-2.
2. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England Journal of Medicine* **2020**; 382(12): 1177-9.
3. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature communications* **2020**; 11(1): 1-7.
4. Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* **2020**; 582(7813): 557-60.
5. Lednicky JA, Lauzard M, Fan ZH, et al. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**; 100: 476-82.
6. Stadnytskyi V, Anfinrud P, Bax A. Breathing, speaking, coughing or sneezing: What drives transmission of SARS-CoV-2? *Journal of Internal Medicine* **2021**.
7. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, et al. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms. *JAMA network open* **2021**; 4(1): e2035057-e.
8. Hamner L. High SARS-CoV-2 attack rate following exposure at a choir practice—Skagit County, Washington, March 2020. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* **2020**; 69.
9. Miller SL, Nazaroff WW, Jimenez JL, et al. Transmission of SARS-CoV-2 by inhalation of respiratory aerosol in the Skagit Valley Chorale superspreading event. *Indoor air* **2021**; 31(2): 314-23.
10. Zhang N, Chen X, Jia W, et al. Evidence for lack of transmission by close contact and surface touch in a restaurant outbreak of COVID-19. *Journal of Infection* **2021**. Milton DK. A Rosetta Stone for understanding infectious drops and aerosols. Oxford University Press US, **2020**.
11. Milton DM. What was the primary mode of smallpox transmission? Implications for biodefense. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2012**; 2: 150.
12. Bixler SL, Stefan CP, Jay A, et al. Aerosol Exposure of Cynomolgus Macaques to SARS-CoV-2 Results in More Severe Pathology than Existing Models. *bioRxiv* **2021**.

13. Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. *Nature immunology* **2021**; 22(1): 86-98.
14. Zhang C, Guo Z, Zhao Z, et al. SARS-CoV-2 Aerosol Exhaled by Experimentally Infected Cynomolgus Monkeys. *Emerging Infectious Diseases* **2021**; 27(7): 1979-81.
15. McDevitt JJ, Koutrakis P, Ferguson ST, et al. Development and performance evaluation of an exhaled-breath bioaerosol collector for influenza virus. *Aerosol Science and Technology* **2013**; 47(4): 444-51.
16. Kim M-C, Cui C, Shin K-R, et al. Duration of culturable SARS-CoV-2 in hospitalized patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine* **2021**; 384(7): 671-3.
17. Chen PZ, Bobrovitz N, Premji Z, Koopmans M, Fisman DN, Gu FX. Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. *Elife* **2021**; 10: e65774.
18. Greenhalgh T, Jimenez JL, Prather KA, Tufekci Z, Fisman D, Schooley R. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *The Lancet* **2021**; 397(10285): 1603-5.
19. Qian H, Miao T, Liu L, Zheng X, Luo D, Li Y. Indoor transmission of SARS- CoV-2. *Indoor Air* **2021**; 31(3): 639-45.
20. Santarpia JL, Rivera DN, Herrera VL, et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Scientific reports* **2020**; 10(1): 1-8.
21. Ong SWX, Tan YK, Coleman KK, et al. Lack of viable severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) among PCR-positive air samples from hospital rooms and community isolation facilities. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **2021**: 1-6.
22. Huang C-G, Lee K-M, Hsiao M-J, et al. Culture-based virus isolation to evaluate potential infectivity of clinical specimens tested for COVID-19. *J Clin Microbiol* **2020**; 58(8): e01068-20.
23. Pohl MO, Busnadiego I, Kufner V, et al. SARS-CoV-2 variants reveal features critical for replication in primary human cells. *PLoS biology* **2021**; 19(3): e3001006.

24. Ong SWX, Chiew CJ, Ang LW, et al. Clinical and Virological Features of SARS- CoV-2 Variants of Concern: A Retrospective Cohort Study Comparing B. 1.1. 7 (Alpha), B. 1.315 (Beta), and B. 1.617. 2 (Delta). Available at SSRN: <https://doi.org/102139/ssrn3861566>.
25. Public Health England. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England. technical briefing 12 **2021**.
26. Yang Q, Saldi TK, Gonzales PK, et al. Just 2% of SARS-CoV-2– positive individuals carry 90% of the virus circulating in communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2021**; 118(21).
27. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell* **2020**; 181(2): 271-80. e8. Murgolo N, Therien AG, Howell B, et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathogens* **2021**; 17(2): e1009225.
28. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature medicine* **2020**; 26(6): 845-8.
29. Alsved M, Matamis A, Bohlin R, et al. Exhaled respiratory particles during singing and talking. *Aerosol Science and Technology* **2020**; 54(11): 1245-8.
30. Gregson FK, Watson NA, Orton CM, et al. Comparing aerosol concentrations and particle size distributions generated by singing, speaking and breathing. *Aerosol Science and Technology* **2021**; 55(6): 681-91.
31. Katelaris AL, Wells J, Clark P, et al. Epidemiologic evidence for airborne transmission of SARS-CoV-2 during church singing, Australia, 2020. *Emerging infectious diseases* **2021**; 27(6): 1677.
32. Charlotte N. High rate of SARS-CoV-2 transmission due to choir practice in France at the beginning of the COVID-19 pandemic. *Journal of Voice* **2020**.
33. Gu Y, Lu J, Su W, Liu Y, Xie C, Yuan J. Transmission of SARS-CoV-2 in the Karaoke Room: An Outbreak of COVID-19 in Guangzhou, China, 2020. *Journal of Epidemiology and Global Health* **2021**; 11(1): 6.

34. Philip KE, Lewis A, Buttery SC, et al. Aerosol transmission of SARS-CoV-2: inhalation as well as exhalation matters for COVID-19. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2021**; 203(8): 1041-2.
35. Asadi S, Wexler AS, Cappa CD, Barreda S, Bouvier NM, Ristenpart WD. Aerosol emission and superemission during human speech increase with voice loudness. *Scientific reports* **2019**; 9(1): 1-10. Lindsley WG. Efficacy of Portable Air Cleaners and Masking for Reducing Indoor Exposure to Simulated Exhaled SARS-CoV-2 Aerosols—United States, 2021. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* **2021**; 70.
36. Li W, Chong A, Hasama T, et al. Effects of ceiling fans on airborne transmission in an air-conditioned space. *Building and Environment* **2021**; 198: 107887.
37. Pantelic J, Sze-To GN, Tham KW, Chao CY, Khoo YCM. Personalized ventilation as a control measure for airborne transmissible disease spread. *Journal of the Royal Society Interface* **2009**; 6(suppl_6): S715-S26.

Aerosolized SARS-CoV-2 RNA copies emitted ^c									
Participant	Symptoms	Day of illness ^a	Clinical Ct values ^b	SARS-CoV-2 serology ^d	Breathing ^d	Talking ^e	Singing ^f	Total	SARS-CoV-2 variant
1	Sore throat, rhinorrhea, anosmia, fever	6	14.3	Positive	ND	ND	ND	--	Failed WGS
2	Rhinorrhea, anosmia	7	16.6	Negative	ND	ND	ND	--	Alpha (B.1.1.7)
3	Sore throat, chronic cough	9	30	Negative	ND	ND	ND	--	Non-VOC/VOI
4	Rhinorrhea, anosmia, cough, SOB	2	19.4	Negative	ND	417	ND	417	Alpha (B.1.1.7)
5	Asymptomatic	5 (day of diagnosis)	22.4	Negative	ND	234.5	135.2	369.7	Non-VOC/VOI
6	Sore throat, rhinorrhea	1	13.2	Negative	ND	79.9	713.6	793.5	Beta (B.1.351)
7	Asymptomatic	3 (day of diagnosis)	32.9	Positive	ND	ND	ND	--	Failed WGS
8	Slight sore throat and rhinorrhea (due to swab test), fever	5	16.5	Negative	ND	ND	ND	--	Non-VOC/VOI

[illegible]

NOTES

14	Fever, dry cough	4	15.1	Negative	ND	ND	ND	--	Alpha (B.1.1.7)
15	Fever	5	16.8	Negative	442.1	1356.5	978.8	2777.5	Kappa (B.1.617.1)
16	Fever	3	14.7	Negative	224.2	1373.3	5821.4	7419	Beta (B.1.351)
17	Asymptomatic	2 (day of diagnosis)	14.5	Positive	ND	ND	143.6	143.6	Kappa (B.1.617.1)
18	Asymptomatic	3 (day of diagnosis)	15.3	Negative	550.3	477.9	1216.1	2244.3	Kappa (B.1.617.1)
19	Asymptomatic	3 (day of diagnosis)	14.4	Negative	ND	ND	ND	--	Beta (B.1.351)
20	Diarrhea, intermittent blocked nose	5	19.5	Positive	ND	ND	ND	--	Beta (B.1.351)
21	Sore throat, fever, body ache	5	16	Negative	310.5	2428.7	1162.3	3901.4	Delta (B.1.617.2)
22	Rhinorrhea, fever, cough	9	17.7	Negative	ND	ND	ND	--	Beta (B.1.351)

ND = none detected; SOB = shortness of breath; WGS = whole genome sequencing; VOC = variant of concern; VOI = variant of interest

^aOn aerosol sample collection day; for symptomatic patients, day one of illness was defined as the day symptoms began; for asymptomatic and presymptomatic patients, day one of illness was defined as the day of diagnosis (day of the first PCR-positive clinical sample)

^bPCR cycle threshold value from patient's diagnostic sample

^cViral N gene copies per expiratory activity

^d30 minutes of tidal breathing

^e15 minutes of talking with brief pauses

^f15 minutes of continuous singing

Table 2. Comparison of variables between COVID-19 patients with and without detectable virus in respiratory aerosols

Variable	Participants with positive aerosol detection (n=13)	Participants with negative aerosol detection (n=9)	p-value
Age	36 (31 – 47)	43 (33 – 47)	0.84
Female sex	3 (23.1)	0 (0.0)	0.24
PCR Ct value of clinical sample	16 (15.3 – 17)	16.6 (15.1 – 19.5)	0.48
Positive SARS-CoV-2 serology ^a	2 (15.4)	3 (33.3)	0.61
Variant type (WHO classification)			0.74
Non-VOC/VOI	2 (15.4)	2 (28.6)	
Alpha (B.1.1.7)	2 (15.4)	2 (28.6)	
Beta (B.1.351)	5 (38.5)	3 (42.9)	
Kappa (B.1.617.1)	3 (23.1)	0 (0.0)	
Delta (B.1.617.2)	1 (7.7)	0 (0.0)	
Day of illness on sampling ^b	3 (2 – 5)	5 (4 – 7)	0.025
Presence of symptoms	10 (76.9)	7 (77.8)	>0.99
Sore throat	3 (23.1)	3 (33.3)	0.66
Rhinorrhea	4 (30.7)	4 (44.4)	0.66
Anosmia	1 (7.7)	2 (22.2)	0.54
Fever	6 (46.2)	4 (44.4)	>0.99
Cough	2 (15.4)	3 (33.3)	0.61
Dyspnea	1 (7.7)	0 (0.0)	>0.99
Diarrhea	0 (0.0)	1 (11.1)	0.41
Total number of symptoms	1 (1 – 2)	2 (1 – 3)	0.25

Ct = cycle threshold; WHO = World Health Organization; VOC = variant of concern; VOI = variant of interest

Values are stated as number (percentage of column) for categorical variables and median (interquartile range) for continuous variables.

Categorical variables were compared using Fisher's exact test and continuous variables were compared using Mann-Whitney U test.

^aAt time of diagnosis

^bFor symptomatic patients, day one of illness was defined as the day symptoms began; for asymptomatic and presymptomatic patients, day one of illness was defined as the day of diagnosis (day of the first PCR-positive clinical sample)

Table 3. Sum total of viral RNA loads emitted in coarse and fine respiratory aerosols, for a sub-group of COVID-19 patients with detectable SARS-CoV-2 in respiratory aerosols (n=13)

	Coarse fraction	Fine fraction	Total (% of column)
Three expiratory activities	4527.3 (14.6)	26,503 (85.4)	31,030.3
Breathing ^a	897 (45.8; 2.9)	1,062.3 (54.2; 3.4)	1959.3 (6.3)
Talking ^b	868.4 (6.9; 2.7)	11,787.5 (93.1; 38)	12,655.9 (40.8)
Singing ^c	2,762 (16.8; 9)	13,653.2 (83.2; 44)	16,415.5 (52.9)

All values expressed as: viral N gene copies (percentage of row; percentage of **overall total**), unless otherwise noted.

^a30 minutes of tidal breathing

^b15 minutes of talking with brief pauses

^c15 minutes of continuous singing

Table 4. Median viral RNA loads emitted for each expiratory activity, in a sub-group of COVID-19 patients with detectable SARS-CoV-2 in respiratory aerosols (n=13)

	Breathing	Talking	Singing	p-value
Total number	63.5 (0 – 227.6)	477.9 (234.5 – 135.6.5)	713.6 (135.2 – 1216.1)	0.026
Fine fraction	0 (0 – 0)	417.0 (191.2 – 979.5)	366.4 (93.9 – 1078.1)	0.013
Coarse fraction	0 (0 – 159.9)	0 (0 – 77.8)	38.4 (0 – 508.4)	0.36

All values expressed as viral N gene copies per expiratory activity (30-min breathing, 15-min talking, 15-min singing), in median (interquartile range).

Medians across 3 groups compared using Kruskal-Wallis test.

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of expiratory sample collection using the G-II exhaled breath collector inside the COVID-19 patient room.

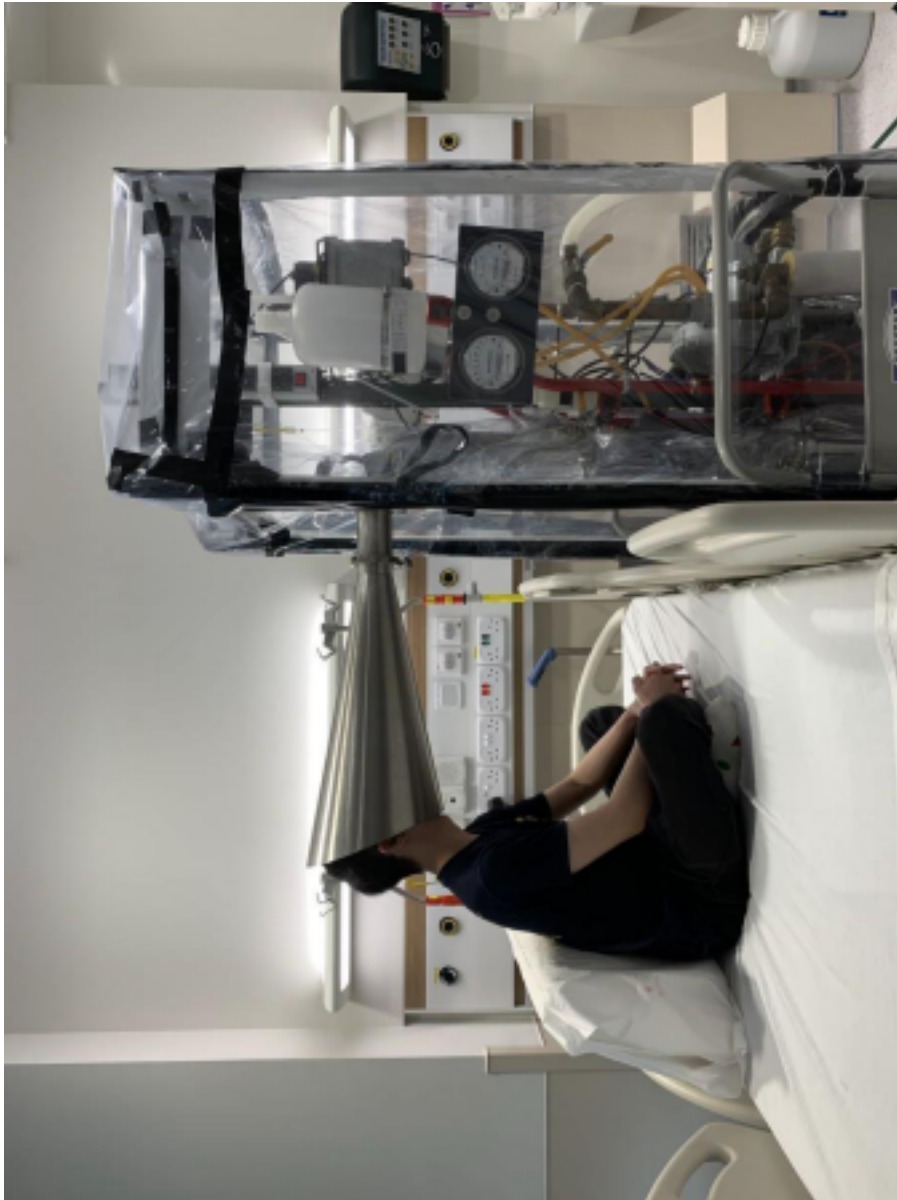


Figure 1