

ซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่ทำให้ติดเชื้อในละอองลอยลมหายใจออกและประสิทธิภาพของหน้ากากในระหว่างการติดเชื้อต่ำ ๆ ในระยะแรก ๆ (Infectious SARS-CoV-2 in Exhaled Aerosols and Efficacy of Masks During Early Mild Infection)

Oluwasanmi O. Adenaiye, Jianyu Lai, P. Jacob Bueno de Mesquita, Filbert Hong, Somayeh Youssefi, Jennifer German, S.-H. Sheldon Tai, Barbara Albert, Maria Schanz, Stuart Weston, Jun Hang, Christian Fung, Hye Kyung Chung, Kristen K. Coleman, Nicolae Sapoval, [_View ORCID Profile](#)Todd Treangen, [_View ORCID Profile](#)Irina Maljkovic Berry, Kristin Mullins, Matthew Frieman, [_View ORCID Profile](#)Tianzhou Ma, [_View ORCID Profile](#)Donald K. Milton, for the University of Maryland StopCOVID Research Group
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.13.21261989>

บทคัดย่อ (Abstract)

ภูมิหลัง (Background) ระบาดวิทยาของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศ ประสิทธิภาพของหน้ากากในการควบคุม ณ แหล่งต้นตอสำหรับสายพันธุ์ที่กำลังส่งผลกระทบ ตลอดจนการติดเชื้อจากละอองลอยยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีสักเท่าไร

วิธีการ (Methods) เราได้รับสมัครผู้ป่วยโรคโควิด 19 เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด น้ำลาย swab จากผนังโพรงจมูก (mid-turbinate) และ swab จากฟลอไมท์ (ในกรณีนี้คือโทรศัพท์มือถือ) รวมทั้งตัวอย่างลมหายใจจากการหายใจนาน 30 นาทีในขณะที่เปล่งเสียงเข้าสู่เครื่อง Gesundheit-II โดยมีการสวมหน้ากากและโดยการไม่สวมหน้ากาก การเก็บตัวอย่างเหล่านี้มีการจัดเก็บ 2 รอบโดยแต่ละรอบเว้นช่วงระยะเวลา 2 วัน เราได้ทำการวัดปริมาณและหาลำดับพันธุกรรมของอาร์เอ็นเอไวรัส เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส ตลอดจนตรวจวิเคราะห์เซรัมสำหรับแอนติบอดีทั้งชนิด anti-spike และ anti-receptor binding domain antibodies

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results) เราลงทะเบียนรับสมัครผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 61 คนที่มี active infection ในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563 ถึงเมษายน พ.ศ. 2564 ในผู้ป่วยจำนวน 49 รายที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบ (ระยะเวลาเฉลี่ยหลังจากเริ่มมีอาการคือ 3.8 ± 2.1 วัน) เราตรวจพบอาร์เอ็นเอของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ใน 45% ของละอองลอยชนิดละเอียด (≤ 5 ไมครอน) 31% ของละอองลอยชนิดหยาบ (> 5 ไมครอน) และ 65% ของ ตัวอย่างจากฟลอไมท์โดยรวม และในตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมดจากผู้ป่วยจำนวน 4 รายที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา เราพบว่าหน้ากากช่วยลดปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสลงได้ 48% (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, ระหว่าง 3 ถึง 72%) สำหรับละอองลอยชนิดละเอียด และลดลงได้ 77% (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, ระหว่าง 51 ถึง 89%) สำหรับละอองลอยชนิดหยาบ สายพันธุ์อัลฟามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยชนิดละเอียด สูงถึง 43 เท่า (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, 6.6 ถึง 280 เท่า) ซึ่งยังคงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญถึง 18 เท่า (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, 3.4 ถึง 92 เท่า) ซึ่งปรับให้เข้ากันกับปริมาณของอาร์เอ็นเอไวรัสในตัวอย่างน้ำลายใน swab จากผนังโพรงจมูก (mid-turbinate) และในปัจจัยรบกวนที่มีศักยภาพอื่น ๆ มีตัวอย่างละอองลอยชนิดละเอียดจำนวน 2 ตัวอย่างที่เก็บตัวอย่างในช่วงระยะ 2-3 วันหลังเริ่มมีอาการโดยที่ผู้ป่วยสวมหน้ากากมีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นบวก

สรุป (Conclusion) เชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 กำลังมีวิวัฒนาการในการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น การสวมหน้ากากหลวม ๆ สามารถป้องกันได้อย่างมีนัยสำคัญก็จริงแต่ก็เป็นการควบคุมที่

แหล่งต้นตอแค่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นมาตรการการควบคุมวิธีการต่าง ๆ ที่ผสมผสานกันรวมทั้งการสวมหน้ากากก็ยังเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องมีย่างต่อเนื่องต่อไปจนกว่าอัตราการได้รับวัคซีนจะอยู่ในระดับสูงมาก ๆ

ประเด็นหลัก ๆ (Key Points)

- ลมหายใจออกจากผู้ป่วยมีละอองลอยของไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้
- เชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 กำลังมีวิวัฒนาการในการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น
- การสวมหน้ากากหลวม ๆ สามารถดลละอองลอยของอาร์เอ็นเอไวรัสได้อย่างมีนัยสำคัญก็จริงแต่ก็เป็นการลดแค่เพียงพอประมาณเท่านั้น
- การสวมหน้ากากในแนบชิด การระบายอากาศ/การฟอกอากาศเป็นสิ่งจำเป็นในการปกป้องบุคลากรที่ต้องพบปะผู้คนหรือในที่ทำงานในอาคารที่มีผู้คนแออัด

บทนำ (Introduction)

เมื่อไม่นานมานี้องค์การอนามัยโลก [1] และศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคสหรัฐฯ [2] ได้ยอมรับฉันทามติทางด้านวิทยาศาสตร์ที่เพิ่มขึ้นว่าการรับสัมผัสเชื้อผ่านทางลมหายใจเข้าเป็นช่องทางสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 [3,4] จำนวนทั้งหมดของหลักฐานที่ได้จากการศึกษาทางระบาดวิทยา การตรวจสอบการระบาด ร่วมกับข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายขนาด (size distribution) ของละอองลอยในลมหายใจออก และรูปแบบจำลองเชิงปริมาณที่สอดคล้องกันล้วนเป็นสิ่งที่น่าเชื่อถือ [4] อย่างไรก็ตามยังคงไม่มีการศึกษาวิจัยมากนักเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากละอองลอยของลมหายใจออกและการวัดประสิทธิภาพของหน้ากากโดยตรงในฐานะที่เป็นตัวควบคุมแหล่งต้นตอของละอองลอยเชื้อไวรัสที่ผู้ป่วยจริง ๆ สวมใส่ รายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ [5,6] และความหนาแน่นของอาร์เอ็นเอไวรัสในอากาศภายในห้อง [7,8] ก็ไม่ได้ให้ภาพความเข้าใจที่ชัดเจนมากนักเกี่ยวกับปริมาณเชื้อไวรัสที่ผู้ติดเชื้อปล่อยออกมาสู่อากาศ ช่องว่างเหล่านี้นำไปสู่ความไม่แน่นอนในการประมาณการการรับสัมผัสเชื้อซึ่งได้มาจากการตรวจวิเคราะห์ย้อนหลังการระบาด [9] ยิ่งไปกว่านั้นยังมีสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่อุบัติขึ้นซึ่งดูเหมือนว่าสามารถแพร่กระจายเชื้อได้มากขึ้นด้วย แต่ก็จำเป็นต้องมีข้อมูลในปริมาณมากขึ้นในการพิจารณาแยกแยะสำหรับการดำเนินการป้องกันที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งยังคงเป็นหัวใจสำคัญของการป้องกันการติดเชื้อ เราได้เก็บตัวอย่างละอองลอยจากลมหายใจออกของผู้ป่วยโรคโควิด 19 ที่ได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธี PCR ว่าติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 รวมทั้งสายพันธุ์อัลฟาและสายพันธุ์ก่อนหน้านั้นซึ่งแพร่กระจายในชุมชนวิทยาเขตของมหาวิทยาลัยโดยใช้เครื่องเก็บตัวอย่างลมหายใจออกชนิด Gesundheit-II (G-II) [10,11] เราได้ทำการวัดปริมาณความหนาแน่นของอาร์เอ็นเอเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 และกักคืนไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อจากตัวอย่าง swab ทางเดินหายใจ น้ำลาย และละอองลอย ตลอดจนตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพของหน้ากากในฐานะที่เป็นตัวควบคุมที่ต้นตอแหล่งกำเนิด รวมทั้งศึกษาผลกระทบของสายพันธุ์อัลฟาต่อการปล่อยละอองลอย

เครื่องมือและวิธีการ (Materials and Methods)

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยแมริแลนด์ (the University of Maryland Institutional Review Board) และสำนักงานคุ้มครองการวิจัยในมนุษย์ของกระทรวงกองทัพเรือ (the Human Research Protection Office of the Department of the Navy) เอกสารใบแสดงความยินยอมได้รับการลงนามของอิเล็กทรอนิกส์และข้อมูลแบบสอบถามได้รับการรวบรวมจัดเก็บโดยใช้โปรแกรม REDCap [12] เราได้ลงทะเบียนรับสมัครผู้ป่วยโรคโควิด 19 ที่ได้รับการยืนยันว่าติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 จากการตรวจตัวอย่าง swab ทางเดินหายใจหรือตัวอย่างน้ำลายโดยวิธี qRT-PCR ซึ่งมีผลเป็นบวกจากมหาวิทยาลัยแมริแลนด์วิทยาเขต College Park และชุมชนรอบ ๆ โดยผ่านทาง a) การรายงานอาการประจำวันและการตรวจตัวอย่างน้ำลายชนิดรวมตัวอย่างรายสัปดาห์จากกลุ่มผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 238 คน b) การลงทะเบียนรับสมัครโดยตรง

กลุ่มผู้ป่วยที่มีผลการตรวจตัวอย่างน้ำลายเป็นบวก ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยเมื่อไม่นานมานี้ว่าเป็นโรคโควิด 19 และผู้ที่ได้รับการสัมผัสติดต่อกใกล้ชิดที่มีผลการตรวจเป็นบวกในระหว่างการติดตาม (follow-up) ได้รับการ เชื้อเชิญสำหรับการตรวจเยี่ยมเพื่อประเมินการปล่อยเชื้อไวรัส 2 รอบโดยแต่ละรอบเว้นช่วงระยะเวลา 1 วัน มีการ เก็บตัวอย่างเลือดในระหว่างการตรวจเยี่ยมรอบแรก ระหว่างการตรวจเยี่ยมแต่ละครั้งมีการเก็บตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก น้ำลาย ตัวอย่าง swab จากโทรศัพท์มือถือ/แท็บเล็ต และตัวอย่างลมหายใจออกการหายใจเป็นเวลา 30 นาทีซึ่งเก็บโดยใช้เครื่อง G-II (10,11) ในการตรวจเยี่ยมแต่ละครั้งเราขอให้ผู้ป่วยอาสาสมัครเก็บตัวอย่างลมหายใจออกเป็นคู่ โดยที่ตัวอย่างหนึ่งเก็บในขณะที่สวมหน้ากากอยู่และอีกตัวอย่าง หนึ่งเก็บในขณะที่ไม่สวมหน้ากาก (13) เราทำการทดสอบหน้ากากที่ผู้ป่วยอาสาสมัครนำมาเองและหน้ากากอนามัยที่เราจัดหาให้ และสุ่มเลือกว่าชนิดไหนที่ ได้รับการทดสอบในการตรวจเยี่ยมครั้งที่หนึ่งและครั้งที่สองเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงความลำเอียงเชิงระบบ (systematic order bias) ผู้ป่วยอาสาสมัครที่เราศึกษาไว้ก่อนเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 ได้รับการขอให้เปลี่ยนเสียงพยางค์ซ้ำๆ กัน 3 ครั้งภายในช่วง ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างนาน 30 นาทีตามที่ได้อธิบายมาก่อนหน้านี้ (13) ผู้ป่วยอาสาสมัครที่เราศึกษาวิจัยในช่วงหลังจากนั้นได้รับการขอให้เปลี่ยนเสียงจะโกนว่า “Go Terps” เป็นเวลา 30 ครั้ง และร้องเพลง “Happy Birthday” ด้วยเสียงอันดัง 3 ครั้งในวันที่ 5, 15, และ 25 ของแต่ละช่วงระยะเวลาการ เก็บตัวอย่างที่นาน 30 นาที ผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีอาการรุนแรงบางครั้งก็เลือกที่จะเก็บตัวอย่างจากลมหายใจออก (30 นาที) เพียงตัวอย่างเดียว ซึ่งสำหรับผู้ปวยอาสา สมัครเหล่านั้นการเก็บตัวอย่างขณะที่ไม่สวมหน้ากากมีความสำคัญจำเป็นเร่งด่วน (priority) มากกว่า

ตัวอย่างได้รับการค้นหาและระบุโดยใช้ TaqMan Array Card (Thermo Scientific) จำนวนชุดของอาร์เอ็นเอ (RNA copy) รายงานในหน่วยต่อมิลลิลิตร (per mL) สำหรับตัวอย่างน้ำลายและต่อตัวอย่าง (per sample) สำหรับตัวอย่างประเภทอื่น ๆ ที่เหลือทั้งหมด ชัดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection หรือ LOD) อยู่ที่ 75 copies/sample และชัดจำกัดในการวัดปริมาณ (limit of quantification หรือ LOQ) อยู่ที่ 250 copies/sample (SI) Viral infectivity ได้รับการวัดค่าโดยขั้นแรกทำการ propagate ไวรัสโดยใช้เซลล์ Vero E6 ซึ่งมีการแสดง TMPRSS2 อย่างเสถียรและต่อจากนั้นทำการ transfer มีเดียไปยังเซลล์ A549 ซึ่งแสดง human ACE2 (A549-ACE2) อย่างเสถียร เซลล์ A549-ACE2 ที่ติดเชื้อได้รับการวัดปริมาณโดยใช้ immunofluorescence staining with anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid antibody (Sino Biological 40143-R004) และ Hoechst 33342 (Invitrogen H3570) และการทำ imaging โดยใช้ Celigo Imaging Cytometer (Nexcelom) (Figures S1, S2) พลาสมาได้รับการตรวจวิเคราะห์หาแอนติบอดี IgG, IgM, และ IgA สำหรับซาร์สโคโรนาไวรัส 2 โดยการใช้ระเบียบขั้นตอนปฏิบัติที่อธิบายโดย Stadlbauer และคณะที่ได้รับการดัดแปลงแก้ไข [15] ตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกและตัวอย่างน้ำลายได้รับการ sequence ที่สถาบันวิจัยของกองทัพบกที่วอลเตอร์ริด (Walter Reed Army Institute for Research) หรือที่ University of Maryland Institute for Genome Sciences สายพันธุ์ซาร์สโคโรนาไวรัส 2 และการกลายพันธุ์ได้รับการค้นหาและระบุโดยใช้เครื่องมือของบริษัท PANGOLIN และ Nextstrain [16,17]

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

เราได้รวมการวิเคราะห์ผู้ป่วยอาสาสมัครที่ติดเชื้อทั้งหมดที่ลงทะเบียนรับสมัครจากวิทยาเขตและชุมชนรอบ ๆ ตลอดระยะเวลาหนึ่งปี เพื่อเป็นการประกันว่ามีความเปรียบเทียบกันได้ (comparability) ระหว่างตัวอย่างที่เก็บมา ในขณะที่ผู้ป่วยอาสาสมัครสวมหน้ากากและตัวอย่างที่เก็บมาในขณะที่ผู้ป่วยอาสาสมัครไม่ได้สวมหน้ากากในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของหน้ากาก เราจึงได้ทำการรวมเฉพาะตัวอย่างที่เก็บเป็นคู่ในวันเดียวกันและจากผู้ป่วยคนเดียวกันโดยเก็บขณะที่สวมหน้ากากและขณะที่ไม่ได้สวมหน้ากากและมีการควบคุมจำนวนครั้งของการไอในระหว่างการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง

การจัดการข้อมูลแบบครบวงจร (data curation) การตรวจสอบและแก้ไขข้อมูล (cleaning) การวิเคราะห์ (analysis) และการสรุปและแสดงผลข้อมูล (visualization) ทำโดยใช้โปรแกรม R Studio and R (เวอร์ชัน 4.1.0) [18] R packages lme4, lme4, และ ggplot2 [19] เราได้เปรียบเทียบเป็นรายกลุ่มระหว่างผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบกับผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นบวก โดยใช้วิธีทดสอบแบบ two-sample t-test สำหรับตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) และวิธีทดสอบแบบ Fisher's exact test สำหรับตัวแปรแบบกลุ่ม (categorical variables) ในการควบคุมจัดการให้ข้อมูล censored observations อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าชัดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection) เราได้ใช้แบบจำลอง linear mixed-effect models กับข้อมูลที่เป็น censored responses [20,21] และรวม nested random effects ของตัวอย่างในแต่ละกรณีและ replicate ภายในตัวอย่างเหล่านั้น ค่าเฉลี่ยเรขาคณิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนชุดของอาร์เอ็นเอไวรัสสำหรับทุกประเภทของตัวอย่างและผลของตัวทำนาย (predictors) ในการปล่อยอาร์เอ็นเอไวรัส (viral RNA shedding) ได้รับการประมาณการจากแบบจำลอง ข้อมูลที่ปกปิด (deidentified data) และรหัสสำหรับผลงานการศึกษาวิจัยที่ได้รับการยอมรับจะมีการเผยแพร่ผ่านทาง github

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results)

ผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 61 คนที่มีการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (เริ่มมีอาการเมื่อไม่นานมานี้และมีผลการตรวจตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกหรือตัวอย่างน้ำลายโดยวิธี PCR เป็นบวก) ได้รับการลงทะเบียนเข้าร่วมในการตรวจลมหายใจออก โดยที่ในจำนวนนี้มี 3 คน มาจากกลุ่มที่มีการตรวจน้ำลายเป็นประจำสัปดาห์ละครั้ง 43 คนมาจากจำนวน 55 คนที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยเมื่อไม่นานมานี้ว่าเป็นโรคโควิด 19 และ 15 คนมาจาก

62 คนที่มีการสัมผัสติดต่อใกล้ชิดกับผู้ป่วยที่ได้รับการติดตามผลในการตรวจหาการติดเชื้อในระยะเริ่มต้น (early onset of infection) (ภาพที่ S3) 8 ราย (13%) ที่มีการติดเชื้อ (active infection) มีแอนติบอดี IgM หรือไม่มีก็แอนติบอดี IgG สำหรับโปรตีนหนามของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในระหว่างการตรวจเย็บตัวอย่างลมหายใจครั้งแรกและ 4 คนไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้

ผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 57 คนที่ทราบสถานะผลการตรวจทาง serology ในระหว่างที่เก็บตัวอย่างลมหายใจออก (49 รายมีผลการตรวจเป็นลบ 8 รายมีผลการตรวจเป็นบวก) ได้รับการลงทะเบียนรับสมัครจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 12 นับจากหลังเริ่มมีอาการหรือหลังการตรวจที่มีผลการตรวจเป็นบวกครั้งแรก (ตารางที่ 1 ภาพที่ S4) รายที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบได้แก่ผู้ป่วยอาสาสมัครทั้งหมดที่มีประสบการณ์ในการร้องเพลงมาก่อนและมีการติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องอื่น ๆ ระหว่างกลุ่มที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นบวกกับกลุ่มที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบ ซึ่งรวมทั้งความถี่ของการสูญเสียการรับรส/กลิ่น อาการอื่น ๆ อุณหภูมิและระดับของออกซิเจน ทั้งหมดนี้ไม่มีอาการหรือมีอาการเพียงเล็กน้อยในระหว่างการศึกษาวិจัย ไม่มีผู้ป่วยอาสาสมัครรายใดที่ได้รับยาต้านไวรัสในระหว่างการเก็บตัวอย่างลมหายใจและไม่พบการติดเชื้อร่วม

ตารางที่ 1. ลักษณะเฉพาะของประชากรที่ศึกษาวิจัย (Characteristics of the study population)

	Antibody negative	Antibody positive	All with serologic tests	P-value ^a
Number of participants	49	8	57	-
Number of exhaled breath sample visits ^b	78	15	93	-
Female, N (%)	18 (37)	2 (25)	20 (35)	0.70
Age, mean years \pm SD	23.7 \pm 9.5	24.9 \pm 8.4	23.8 \pm 9.3	0.73
Age group, N (%)				-
<18	1 (2)	0 (0)	1 (2)	
18-45	45 (92)	8 (100)	53 (93)	
>45	3 (6)	0 (0)	3 (5)	
White, N (%)	40 (82)	5 (62)	45 (79)	0.16
BMI, mean \pm SD	24.6 \pm 4.5	27.3 \pm 4.8	25 \pm 4.6	0.12
Chronic respiratory illness ^c N (%)	12 (24)	1 (12)	13 (23)	0.67
Ever smoker N (%)	2 (4)	1 (12)	3 (5)	0.37
Has taken singing lessons/part of a choir N (%)	4 (8)	0 (0)	4 (7)	-
Alpha Variant N (%)	4 (8)	0 (0)	4 (7)	-
Days post onset ^d mean \pm SD (range)	3.8 \pm 2.1 (Day 1 to 10)	5.9 \pm 3.8 (Day 0 to 12)	4.1 \pm 2.5 (Day 0 to 12)	0.18
Coughs per 30 min, mean \pm SD (range)	1 \pm 3 (0-17)	3 \pm 8 (0-24)	1 \pm 4 (0-24)	0.098
Loss of taste/smell N (%)	13 (27)	4 (50)	17 (30)	0.22
Median upper respiratory symptoms (IQR) ^e	2 (1 - 3)	3 (1.5 - 4)	2 (1 - 3)	0.17
Median lower respiratory symptoms (IQR)	0 (0 - 1.2)	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0.82
Median systemic symptoms (IQR)	1 (0 - 3)	1 (0 - 2.5)	1 (0 - 3)	0.60
Median gastrointestinal symptoms (IQR)	0 (0 - 1)	0 (0)	0 (0-1)	0.36
Temperature, mean Celsius \pm SD	37.2 \pm 0.4	37.2 \pm 0.2	37.2 \pm 0.3	0.80
Oxygen saturation (SpO ₂), mean \pm SD	97.9 \pm 1	97.5 \pm 1.1	97.8 \pm 1	0.25

BMI, Body mass index; IQR, Interquartile range;

^a Group comparisons were made between antibody negative and positive cases using two-sample t-test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables.

^b 57 volunteers provided breath samples and sera at the initial shedding assessment visit; 34 of them provided exhaled breath samples at the 2nd shedding assessment visit approximately 2 days later; four volunteers who did not provide sera at the first visit were excluded.

^c Chronic respiratory illness = volunteers with any Chronic obstructive pulmonary disease, Asthma, Other lung diseases.

^d Days since start of symptoms or first positive test if asymptomatic or presymptomatic to first breath sample; 3 subjects reported no symptoms.

^e Symptoms at the time of each sample collection visit. Sixteen symptoms were rated from 0 to 3 with a maximum possible composite score of 15 for upper respiratory, 9 for lower respiratory, 12 for systemic symptoms and 12 for gastrointestinal symptoms.

ผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ (Seronegative cases)

ในบรรดาผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ มีอยู่ 4 ราย (8%) ที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา และไม่มีรายใดที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์เดลตาหรือสายพันธุ์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น [22] (ตาราง S1) อาการของโรคนี้นั้นจะเห็นได้ชัดแจ้งกว่าในระหว่างการตรวจเยี่ยมครั้งแรก ผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 2 รายมีอาการไข้ในระหว่างการตรวจเยี่ยมครั้งที่ 2 (ภาพที่ S5-S6) ผู้ป่วยแต่ละรายในจำนวน 4 รายที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟาและมีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบนี้มีปริมาณความหนาแน่นของอาร์เอ็นเอไวรัสในระดับที่ตรวจพบได้ในตัวอย่างทั้งหมด ทั้งตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก ตัวอย่างน้ำลาย ตัวอย่างจากฟอโมท และตัวอย่างละอองลอย (ตารางที่ 2) ในบรรดาผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบที่เหลือ เราได้ตรวจพบอาร์เอ็นเอไวรัสในตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกทั้งหมด 99% ของตัวอย่างน้ำลาย 49% ของฟอโมท 19% ของตัวอย่างละอองลอยชนิดหยด และ 31% ของตัวอย่างละอองลอยชนิดละออง ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของอาร์เอ็นเอไวรัสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญสำหรับตัวอย่างทุกประเภทที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา

ตารางที่ 2.

อาร์เอ็นเอไวรัสจากผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบสำหรับแอนติบอดีซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในระหว่างการประเมินครั้งแรก (Viral RNA from cases seronegative for SARS-CoV-2 antibodies at the first assessment)

Sample Type	Variant	Case ^a	Cases with ≥1 positive sample ^b N (%)		Samples	Positive Samples ^c N (%)		GM (95% CI) ^d	Maximum RNA copies ^e
			≥LOD	≥LOQ		≥LOD	≥LOQ		
Mid-turbinate swab	Alpha	4	4 (100)	4 (100)	6	6 (100)	6 (100)	3.8 x 10 ⁶ (3.3 x 10 ⁶ , 4.4 x 10 ⁶)	2.9 x 10 ⁹
	Other	45	45 (100)	45 (100)	74	74 (100)	73 (99)	3.8 x 10 ⁶ (1.4 x 10 ⁶ , 1.0 x 10 ⁷)	5.1 x 10 ⁹
Saliva	Alpha	4	4 (100)	4 (100)	6	6 (100)	6 (100)	1.9 x 10 ⁷ (2.7 x 10 ⁶ , 1.3 x 10 ⁸)	5.2 x 10 ⁸
	Other	45	44 (98)	44 (98)	74	73 (99)	70 (95)	2.1 x 10 ⁵ (8.1 x 10 ⁴ , 5.4 x 10 ⁵)	3.9 x 10 ⁸
Fomite	Alpha	4	4 (100)	4 (100)	6	6 (100)	4 (67)	560 (530, 590)	1.7 x 10 ⁴
	Other	45	28 (62)	14 (31)	74	36 (49)	17 (23)	46 (17, 120)	1.2 x 10 ⁶
Coarse (>5 µm) Aerosol	Alpha	4	4 (100)	2 (50)	6	6 (100)	3 (50)	140 (28, 730)	5.1 x 10 ⁴
	Other	45	11 (24)	5 (11)	72	14 (19)	5 (7)	7 (3.2, 15)	2.6 x 10 ⁴
Fine (≤5 µm) Aerosol	Alpha	4	4 (100)	3 (75)	6	6 (100)	4 (67)	580 (450, 740)	5.4 x 10 ⁴
	Other	45	18 (40)	8 (18)	72	22 (31)	9 (12)	18 (9.1, 34)	2.8 x 10 ⁵

^a Participants with a mid-turbinate or saliva samples positive for SARS-CoV-2 viral RNA by qRT-PCR and seronegative for SARS-CoV-2 spike protein antibody at enrollment and who provided at least one 30-minute sample of exhaled breath.

^b Number of participants with at least one sample ≥ limit of detection (LOD) or ≥ limit of quantification (LOQ) (Supplementary).

^c Samples positive and ≥LOD had at least one replicate with confirmed amplification after inspection and quality control (LOD ~75 RNA copies with 95% probability of detection) and ≥LOQ if the mean of replicate assays was ≥250 RNA copies.

^d GM = geometric mean. The GMs were computed, accounting for samples below the LOD, using a linear mixed-effects model for censored responses (R Project LMEC package) using data for all samples of each sample type with nested random effects of samples within study participant.

^e The largest quantity of RNA copies detected based on the mean of replicates qRT-PCR aliquots.

อาร์เอ็นเอไวรัสในลมหายใจออกจากผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบซึ่งเก็บตัวอย่างโดยไม่สวมหน้ากาก (Exhaled breath viral RNA from seronegative cases without masks)

ปริมาณของอาร์เอ็นเอไวรัสจากตัวอย่างละอองลอยที่เก็บจากการหายใจ 30 นาทีมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณของอาร์เอ็นเอไวรัสที่มาจากโทรศัพท์มือถือของอาสาสมัคร (ตารางที่ 2) ความถี่ในการตรวจพบอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยสูงสุดใน 2 ถึง 5 วันหลังเริ่มมีอาการหรือหลังการตรวจที่มีผลเป็นบวกครั้งแรก (ภาพที่ S7) แต่ก็ไม่ใช่ ตัวทำนายที่สำคัญ (significant predictor) เกี่ยวกับปริมาณของอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอย (ตารางที่ 3) อาร์เอ็นเอไวรัสในตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกและตัวอย่างน้ำลายมีความสัมพันธ์กันปานกลาง (ภาพที่ S8: $p=0.46$) แต่เฉพาะอาร์เอ็นเอไวรัสในตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกเท่านั้นที่เป็นตัวทำนายที่สำคัญของปริมาณไวรัสในละอองลอย (ตารางที่ 3, ภาพที่ S9, S10) ปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยชนิดละเย็ดสูงกว่าในละอองลอยชนิดหยดถึง 1.9 เท่า (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95% 1.2 ถึง 2.9 เท่า)

ตารางที่ 3.

ตัวทำนายการปล่อยอาร์เอ็นเอไวรัสในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ (Predictors of viral RNA shedding among seronegative participants)

	Coarse Aerosol (>5 µm)			Fine Aerosol (≤5 µm)		
	Without Face Mask N=49, n=78 ^a		Paired ± Mask N=46, n = 69	Without Face Mask N=49, n=78		Paired ± Mask N=46, n = 69
	Unadjusted	Adjusted ^b	Estimate ^c	Unadjusted	Adjusted	Estimate
Alpha Variant	67 (6.7, 660)	3.6 (0.35, 36)	100 (16, 650)	43 (6.6, 280)	18 (3.4, 92)	73 (15, 350)
Face mask	-	-	0.23 (0.11, 0.49)	-	-	0.52 (0.28, 0.97)
Age	1.4 (0.44, 4.4)	-	-	1.7 (0.74, 3.7)	1.7 (1, 2.8)	-
Day post onset ^d	0.79 (0.53, 1.2)	-	-	0.97 (0.76, 1.2)	-	-
Log mid-turbinate swab	480 (40, 5700)	36 (3.5, 370)	-	13 (4.3, 42)	7.3 (2.5, 21)	-
Log saliva	4.6 (1.4, 15)	1.5 (0.55, 4.3)	-	2.8 (1.2, 6.5)	0.96 (0.47, 2)	-
Number of coughs	1.2 (0.92, 1.5)	1.2 (1, 1.5)	1 (0.93, 1.2)	1.2 (0.96, 1.5)	1.2 (1, 1.3)	1.1 (1, 1.3)
Upper respiratory symptoms	2.4 (0.91, 6.1)	-	-	1.7 (0.83, 3.6)	0.75 (0.44, 1.3)	-
Lower respiratory symptoms	0.99 (0.36, 2.7)	0.4 (0.13, 1.2)	-	0.64 (0.3, 1.4)	-	-
Gastrointestinal symptoms	2.3 (1.1, 5.2)	1.2 (0.55, 2.4)	-	1.7 (0.94, 3.2)	1 (0.61, 1.7)	-
Systemic symptoms	5.7 (2.5, 13)	2.4 (0.97, 6.1)	-	2.1 (1.1, 4)	1.1 (0.59, 2)	-
Alpha Variant x Face mask	-	-	0.62 (0.15, 2.7)	-	-	0.7 (0.2, 2.4)

Effect estimates and their 95% confidence intervals are shown as the ratio of RNA copy number of samples: with alpha variant to without alpha variant, with mask to without mask, or as the fold-increase in RNA copy number for a 10-year increase in age, 1-day increase in day post-symptom onset, and an interquartile range change in symptom scores, mid-turbinate swab and saliva RNA copy number. All

analyses were controlled for random effects of subject and sample nested within subjects and for censoring by the limit of detection using a linear mixed-effects model for censored responses (R Project lme4-package).

^a N = Number of participants, n = number of samples for without face mask analysis and number of pairs of same day with and without face masks samples for paired analysis of the effect of face masks.

^b The adjusted estimates accounted for potential covariates resulting in greater than 10% change in the estimates of the main exposure variable – “Alpha variant”

^c The effect of mask on samples adjusted for Alpha variant and number of coughs counted during sample collection

^d Days since start of symptoms or first positive test if asymptomatic or presymptomatic to breath sample; 2 subjects had no symptoms

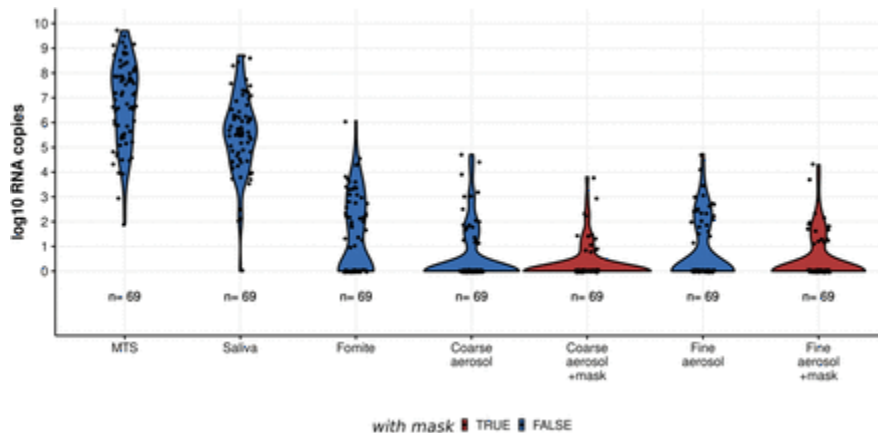
ผลกระทบของการติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟาต่อการปล่อยอาร์เอ็นเอไวรัสในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ (Effect of alpha variant infection on viral RNA shedding from seronegative cases)

การติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟามีความสัมพันธ์กับปริมาณของอาร์เอ็นเอไวรัสที่ปล่อยออกมาซึ่งสูงกว่าการติดเชื้อจากสายพันธุ์ก่อนหน้านี้อย่างมีนัยสำคัญ ในการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นคู่เปรียบเทียบกันจากตัวอย่างที่เก็บโดยไม่สวมหน้ากาก (ตารางที่ 3, ภาพที่ S3) พบว่าสายพันธุ์อัลฟามีความสัมพันธ์กับของอาร์เอ็นเอไวรัสที่ปล่อยออกมาในปริมาณที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ (wild type) และสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น การปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยชนิดละเอียดยังคงสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญสำหรับการติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา (18 เท่า ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95% , 3.4 ถึง 92 เท่า) หลังจากที่มีการปรับให้เข้ากันกับปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสที่เพิ่มสูงขึ้นในตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกและตัวอย่างน้ำลาย จำนวนครั้งของการไอในระหว่างการเก็บตัวอย่างและอาการต่าง ๆ (ตารางที่ 3) เราจึงได้ทำการวิเคราะห์ผลกระทบของสายพันธุ์อัลฟาต่อการปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสโดยใช้ชุดข้อมูลที่มีขนาดใหญ่กว่ารวมทั้งตัวอย่างที่เก็บระหว่างที่ผู้ป่วยสวมหน้ากากและตัวอย่างที่เก็บระหว่างที่ผู้ป่วยไม่ได้สวมหน้ากาก ภายหลังจากที่มีการควบคุมสำหรับผลกระทบจากหน้ากากและจำนวนครั้งของการไอในระหว่างการเก็บตัวอย่าง การติดเชื้อจากสาย

พันธุอัลฟามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยชนิดหยาบถึง 100 เท่า (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, 16 ถึง 650 เท่า) และในละอองลอยชนิดละเอียดถึง 73 เท่า (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, 15 ถึง 350 เท่า) (ตารางที่ 3)

ผลกระทบของหน้ากากต่อการปล่อยอาร์เอ็นเอไวรัสในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ (Effect of masks on viral RNA shedding from seronegative cases)

เราได้สังเกตพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยหลังจากที่มีการปรับให้เข้ากันกับจำนวนครั้งของการไอในระหว่างการเก็บตัวอย่าง คือลดลง 77% (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, 51% ถึง 89%) สำหรับละอองลอยชนิดหยาบ และลดลง 48% (ช่วงความเชื่อมั่น [CI] 95%, 3% ถึง 72%) สำหรับละอองลอยชนิดละเอียด (ภาพที่ 1) การวิเคราะห์หีสัมพันธ์ระหว่างหน้ากากกับสายพันธุ์อัลฟา (ตารางที่ 3) ยืนยันว่าประสิทธิภาพของหน้ากากไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสำหรับการติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา ประเภทของหน้ากากที่ผู้ป่วยอาสาสมัครนำมาใช้มีความแตกต่างหลากหลาย จากหน้ากากชั้นเดียวที่ตัดเย็บในบ้านไปจนถึงหน้ากากที่เป็นผ้าพันคอนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งใช้เป็นเครื่องประดับในช่วงระยะแรก ๆ ของการศึกษาวิจัย และจากหน้ากากผ้าชนิดสองชั้นที่ตัดเย็บในบ้านและที่ซื้อขายกันทั่วไปไปจนถึงหน้ากากอนามัย หน้ากากสองชั้นตลอดจนหน้ากากกรองอากาศชนิด N95 ในช่วงทั้งปี (ตารางที่ S4) เราไม่สังเกตพบเห็นความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างหน้ากากอนามัยและการสวมหน้ากากผ้าชนิดต่าง ๆ ซ้อนกัน (ตารางที่ S5)



ภาพที่ 1.

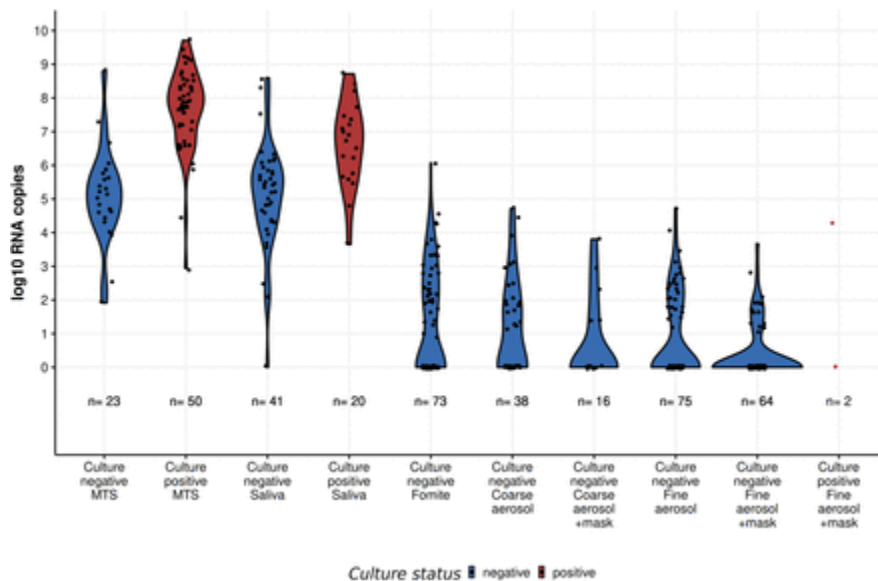
การปล่อยปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในตัวอย่างเป็นคู่ คือตัวอย่างที่เก็บขณะที่ผู้ป่วยสวมหน้ากากและตัวอย่างที่เก็บขณะที่ผู้ป่วยไม่ได้สวมหน้ากาก ปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสที่วัดได้ในระหว่างการเก็บตัวอย่างเป็นคู่ ๆ ในวันเดียวกัน ทั้งที่เก็บตัวอย่างขณะที่สวมหน้ากากและขณะที่ไม่สวมหน้ากากจำนวน 69 ครั้ง จากผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบจำนวนทั้งสิ้น 46 คน ตัวอย่างที่ตรวจหาอาร์เอ็นเอไวรัสไม่พบได้รับการใส่จำนวนชุดอาร์เอ็นเอไวรัสเท่ากับ “1” ละอองลอยจากลมหายใจออกได้รับการเก็บตัวอย่างจากการหายใจนาน 30 นาที “+mask” = ตัวอย่างที่เก็บในขณะที่สวมหน้ากาก MTS = mid-turbinate swab (ตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก) Fomite = swab จากโทรศัพท์มือถือของผู้ป่วย

ผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นบวก (Seropositive cases)

ผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 8 คนมีแอนติบอดีสำหรับโปรตีนหนามของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในระหว่างการเก็บตัวอย่างลมหายใจ ผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นบวกมีแนวโน้มที่จะไอบ่อยครั้งกว่าผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ (ตารางที่ 1) แต่ไม่มีตัวอย่างลมหายใจออกใด ๆ จากผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นบวกที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในระดับที่สามารถตรวจพบได้ (ตารางที่ S6)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไวรัส (Virus cultures)

ในบรรดาดตัวอย่างส่งตรวจที่ได้รับการเพาะเลี้ยงเซลล์ไวรัส เราตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้ (ภาพที่ S2) ในตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกจำนวน 50 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งสิ้น 73 ตัวอย่าง (คิดเป็น 68%) และ ในตัวอย่างน้ำลายจำนวน 20 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งสิ้น 62 ตัวอย่าง (คิดเป็น 32%) จากผู้ป่วยอาสาสมัครที่มีผลการตรวจทาง Serology เป็นลบ (ภาพที่ 2, ตารางที่ S2a) ความหนาแน่นของอาร์เอ็นเอที่สัมพันธ์กับระดับความเป็นไปได้ที่ 50% ของผลการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นบวกอยู่ที่ 7.8×10^5 สำหรับตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก และ 5.2×10^6 สำหรับตัวอย่างน้ำลาย (ภาพที่ S11, ตารางที่ S7) ในตัวอย่างละอองลอยชนิดละเอียดที่เก็บตัวอย่างในระหว่างที่ผู้ป่วยไม่ได้สวมหน้ากากจำนวน 75 ตัวอย่างไม่มีตัวอย่างใด ๆ ที่มีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นบวก ในตัวอย่างละอองลอยชนิดละเอียดที่เก็บตัวอย่างในระหว่างที่ผู้ป่วยสวมหน้ากากจำนวน 66 ตัวอย่างมีอยู่ 2 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3%) ที่มีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นบวกซึ่งรวมทั้ง 1 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา 2 วันหลังจากเริ่มมีอาการและอีก 1 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีไวรัส Nextstrain clade 20G 3 วันหลังจากเริ่มมีอาการ ตัวอย่างจากฟอไมท์และตัวอย่างละอองลอยชนิดหยาบที่ได้รับการเพาะเลี้ยงเซลล์ไวรัสมีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นลบ



ภาพที่ 2.

ปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสและผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ของตัวอย่างทั้งหมดสำหรับผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทาง serology เป็นลบ ตัวอย่างที่ตรวจหาอาร์เอ็นเอไวรัสไม่พบได้รับการใส่จำนวนชุดอาร์เอ็นเอไวรัสเท่ากับ “1” ละอองลอยจากลมหายใจออกได้รับการเก็บตัวอย่างจากการหายใจนาน 30 นาที และรวมตัวอย่างที่แยกเก็บระหว่างขณะที่สวมหน้ากากและขณะที่ไม่สวมหน้ากาก ขาดตัวอย่างละอองลอยชนิดละเอียดที่เก็บขณะที่สวมหน้ากากจำนวน 5 ตัวอย่างและขาดตัวอย่างจากฟอไมท์จำนวน 3 ตัวอย่างสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ตัวอย่างจากผนังโพรงจมูก ตัวอย่างน้ำลายและตัวอย่างละอองลอยชนิดหยาบ ชุดหนึ่งได้รับการเพาะเลี้ยงเซลล์ MTS = mid-turbinate swab (ตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก) Fomite = swab จากโทรศัพท์มือถือของผู้ป่วย

การอภิปราย (Discussion)

การติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟาทำให้มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในลมหายใจออกมากกว่าหนึ่งถึงสองระดับเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ ก่อนหน้านี้ที่ไม่มีส่วนสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น ข้อมูลจากการสังเกตของเราในเรื่องการปล่อยละอองลอยที่เพิ่มขึ้นแม้แต่หลังจากที่มีการควบคุมปริมาณของอาร์เอ็นเอไวรัสที่เพิ่มสูงขึ้นในจมูกและปากแล้วทำให้น่าเชื่อถือว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีวิวัฒนาการพัฒนาความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อในอากาศที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

เราได้กู้คืนไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้จากตัวอย่างละอองลอยชนิดละเอียดของลมหายใจออกจำนวน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดประมาณ 2 ใน 3 ของตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก และ 1 ใน 3 ของตัวอย่างน้ำลาย จากการวิเคราะห์การถอดรหัสของตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูกและตัวอย่างน้ำลายทำให้น่าเชื่อถือว่ามีความเป็นไปได้ไม่น้อยแต่ก็สามารถวัดค่าได้ที่อาร์เอ็นเอแต่ละชุดเป็นตัวแทนของอนุภาคไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้ซึ่งสอดคล้องกับแบบจำลองการตอบสนองต่อขนาดของยาก่อนหน้านั้นของไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อ (previous dose-response models of infectious viruses) [23] ความเป็นไปได้ในการตรวจพบไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ของเราอาจจะสูงถึง 10^{-4} ต่อ RNA copy ในตัวอย่างน้ำลายที่มี 10^2 copies เราได้กู้คืนไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้จาก 1 ใน 2 ของตัวอย่างละอองลอยชนิดละเอียดที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสมากกว่า 104 copies ต่อตัวอย่าง ในขณะที่ความเป็นไปได้ที่ประมาณการของการที่มีผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นบวกอยู่ที่ 8% ต่อตัวอย่างซึ่งอ้างอิงแบบจำลองการถอดรหัส ตัวอย่างละอองลอยอีกตัวอย่างหนึ่งซึ่งมีผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นบวกเป็นหนึ่งในจำนวน 98 ตัวอย่างละอองลอยที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสต่ำกว่าขีดจำกัด 75-copy ในการตรวจหาอาร์เอ็นเอไวรัส ข้อสังเกตนี้สอดคล้องกันกับรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่ทำให้ติดเชื้อได้ในตัวอย่างละอองลอยที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในระดับที่ต่ำมาก ๆ [5] และอาจจะทำให้น่าเชื่อถือว่าอนุภาคไวรัสในละอองลอยจากการหายใจมีไวรัส (virions) ที่บดพร่องในปริมาณที่น้อยกว่าในตัวอย่าง swab จากผนังโพรงจมูก หรือว่าของเหลวมีความเป็นไปได้ในการแทรกแซงการเกาะติดเซลล์และการเข้าสู่เซลล์น้อยกว่าสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกและน้ำลาย ความเป็นไปได้ว่าเนื้อเยื่อผิวของระบบทางเดินหายใจของมนุษย์มีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อมากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ [24]

หน้ากากชนิดต่าง ๆ ที่ผู้ป่วยอาสาสมัครใช้ทำให้เกิดการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในลมหายใจออกถึงแม้ว่าจะไม่มากนัก ซึ่งเป็นการสนับสนุนให้มีการสวมหน้ากากสำหรับการควบคุมที่แหล่งต้นตอปริมาณอาร์เอ็นเอของซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่พบในละอองลอยชนิดละเอียดสูงกว่าในละอองลอยชนิดหยาบ และหน้ากาก็มีประสิทธิภาพในการสกัดกั้นการปล่อยละอองลอยชนิดหยาบมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคไข้หวัดใหญ่ก่อนหน้านี้ [10,13,25,26] ประสิทธิภาพของหน้ากากในการสกัดกั้นการปล่อยละอองลอยชนิดละเอียด (1.9 เท่า) ก็ใกล้เคียงกับประสิทธิภาพที่เราได้รายงานก่อนหน้านี้สำหรับกรณีไข้หวัดใหญ่ (2.8 เท่า) แต่อย่างไรก็ตามการลดลง 4.3 เท่า (หรือคิดเป็น 77%) ของปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสในละอองลอยชนิดหยาบก็น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ การลดลง 25 เท่าของปริมาณอาร์เอ็นเอไวรัสที่สังเกตพบก่อนหน้านี้ในกรณีของไข้หวัดใหญ่ [13] ความคลาดเคลื่อนนี้มีความเป็นไปได้ว่าเกิดขึ้นเพราะว่าการเปลี่ยนแปลงที่หนักแน่นมากกว่าและในช่วงระยะเวลาที่ยาวนานกว่าในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับการคาดว่าจะทำให้การรั่วไหลรอบ ๆ บริเวณหน้ากากที่สวมปิดไม่แน่นสนิทเกิดขึ้นได้มากที่สุด หน้ากากทำหน้าที่ได้ดีพอ ๆ กันสำหรับการสกัดกั้นการปล่อยละอองลอยไวรัสระหว่างสายพันธุ์อัลฟา กับสายพันธุ์ปกติ ("wild-type")

ละอองลอยอาร์เอ็นเอไวรัสที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคโควิด 19 จำนวน 22 คนในสิงคโปร์โดยใช้เครื่องเก็บตัวอย่างอากาศชนิด G-II มีปริมาณอาร์เอ็นเอและอัตราการมีผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างลมหายใจเป็นบวกโดยรวมใกล้เคียงกัน (59% เปรียบเทียบกับ 51% ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้) ในระหว่างการร้องเพลงกับการพูดคุยด้วยเสียงอันดังอย่างเช่นที่สังเกตพบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ [27] ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (68%) ในการศึกษาวิจัยในสิงคโปร์มีการติดเชื้อจากสายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้นในขณะที่ 18% ของการติดเชื้อไม่ได้เกิดจากสายพันธุ์ที่เป็นที่กังวลหรือเป็นที่สนใจและผู้ป่วยแต่ละรายได้รับการเก็บตัวอย่างส่งตรวจในวันเดียวเท่านั้น โดยการเปรียบเทียบกันแล้วตัวอย่างของเราได้รวมเอาผู้ติดเชื้อจากสายพันธุ์ปกติ ("wild-type") ในปริมาณที่มากกว่า และจำนวนวันที่เก็บตัวอย่างต่อผู้ป่วยหนึ่งรายทำให้สามารถวิเคราะห์ผลกระทบของสายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อปริมาณการปล่อยไวรัส มีการศึกษาวิจัยสายพันธุ์เดลตาสายพันธุ์หนึ่งในสิงคโปร์แต่ไม่มีการศึกษาวิจัยสายพันธุ์นี้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อย่างไรก็ตามอัตราการปล่อยไวรัสที่ตรวจพบโดยใช้เครื่อง G-II ในการศึกษาวิจัยทั้งสองขึ้นนี้ก็ต่ำกว่าที่รายงานโดยหมาและคณะซึ่งใช้อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างที่ผู้ป่วยจะต้องเป่าลมผ่านหลอดแคบ ๆ [28] หมาและคณะและข้อมูลของเรามีความสอดคล้องกันว่าในบรรดาผู้ที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์ปกติ ("wild-type" strains) มีเพียงส่วนน้อย (26% และ 31% ตามลำดับ) ที่ปล่อยอาร์เอ็นเอไวรัสออกมาในระดับที่สามารถตรวจพบได้เข้าสู่ละอองลอย อย่างไรก็ตามข้อมูลของเราเกี่ยวกับการติดเชื้อจากสายพันธุ์อัลฟา และข้อมูลจากสิงคโปร์ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าสิ่งนี้กำลังมีการเปลี่ยนแปลงและตอนนี้ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่อาจจะกำลังปล่อยละอองลอยไวรัสบ่อยครั้งขึ้น เราจึงต้องลงทะเบียนรับอาสาสมัครที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์เดลตาและทำการศึกษาวิจัยผู้ป่วยเหล่านี้โดยใช้ Maryland protocol ในการทดสอบสิ่งที่เราคาดคิดโดยอิงตามสิ่งที่เราค้นพบในขณะนี้ว่าสายพันธุ์เดลตาน่าจะมีความสัมพันธ์กับการปล่อยละอองลอยที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก

การศึกษาวิจัยของเรามีข้อจำกัดหลายประการ ถึงแม้ว่าเราได้พยายามที่จะค้นหาหระบตัวและตรวจผู้ป่วยตั้งแต่เนิ่น ๆ โดยผ่านทาง การตรวจกลุ่มผู้ป่วยประจำสัปดาห์ ๆ ละครั้ง และการติดตามผู้ที่มีการสัมผัสติดต่ออย่างใกล้ชิดกับผู้ป่วยอย่างเข้มข้นก็ตาม แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ก็ได้รับการศึกษาวิจัยหลังจากเริ่มมีอาการหรือหลังการตรวจที่มีผลเป็นบวกครั้งแรกได้หลายวันแล้ว มีความเป็นไปได้ว่าสิ่งนี้ส่งผลให้พลาดจากช่วงระยะเวลาที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้มากที่สุด [29,30] นอกจากนี้แล้วผู้ป่วยทุกรายล้วนมีอาการต่ำ ๆ ในระหว่างการตรวจ และมีเพียง 2 รายที่มีการพัฒนาอาการจนถึงขั้นรุนแรงปานกลางและจำเป็นต้องได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล ด้วยเหตุนี้ข้อมูลของเราจึงอาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนของสเปกตรัมการปล่อยไวรัสที่สมบูรณ์ (full spectrum of shedding) ประเภทของหน้ากากที่ผู้ป่วยอาสาสมัครสวมใส่ก็มีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอตลอดช่วงระยะเวลาของการศึกษาวิจัย เช่นเดียวกันกับคุณภาพของหน้ากากอนามัยที่เราสามารถจัดหาให้ ดังนั้นเราจึงไม่สามารถรายงานในเรื่องประสิทธิภาพของหน้ากากที่สวมใส่อย่างปิดไม่แน่นสนิทเป็นการเฉพาะ (specific loose-fitting masks) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณเฉลี่ยของการควบคุมที่แหล่งต้นตอที่ได้จากการสวมหน้ากากอนามัย ประการสุดท้ายเหตุผลทางด้านโลจิสติกส์ทำให้เราจำเป็นต้องมีการแข่งขันตัวอย่างสังครวหลังการเก็บตัวอย่างจนถึงก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะสูญเสียความสามารถในการทำให้ติดเชื้อได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับตัวอย่างละอองลอยที่เจือจาง

โดยรวมแล้วผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ของเราได้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 อย่างต่ำ ๆ หรือไม่มีอาการมีการปล่อยละอองลอยที่ทำให้ติดเชื้อได้ผ่านทางลมหายใจออก หน้ากากสามารถช่วยในการควบคุมที่แหล่งต้นตอที่มีความสำคัญ ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่าการสวมใส่หน้ากากกันทั้งชุมชน แม้แต่เป็นหน้ากากที่สวมปิดไม่แน่นสนิท (loose-fitting masks) แต่ก็สามารถช่วยลดปริมาณละอองลอยไวรัสในอากาศภายในตัวอาคารลงได้ครึ่งหนึ่ง ซึ่งมีส่วนช่วยอย่างสำคัญในการลดการแพร่กระจายโรคโควิด 19 ข้อมูลของเรายังทำให้น่าเชื่อได้ว่าเชื้อไวรัสกำลังมีวิวัฒนาการในการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยผ่านทางละอองลอย และแสดงให้เห็นว่าไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้สามารถเล็ดรอดออกจากหน้ากากที่สวมไม่ปิดแน่นสนิท เนื่องจากความโดดเด่นของสายพันธุ์ใหม่ ๆ เหล่านี้ซึ่งมีขีดความสามารถในการทำให้ติดเชื้อได้ง่ายและรุนแรงกว่าสายพันธุ์ก่อนหน้านี้ที่เราเคยศึกษา ดังนั้นการเพิ่มความใส่ใจต่อการระบายอากาศที่ดีขึ้น การกรองและการฟอกอากาศ ตลอดจนการใช้หน้ากากที่สวมปิดแน่นสนิทและมีคุณภาพสูงหรือหน้ากากกรองอากาศ เช่น หน้ากากมาตรฐาน ASTM ของสหรัฐอเมริกา รุ่น F3502-21 หรือหน้ากากกรองอากาศชนิด N95 ที่ผ่านการอนุมัติจาก NIOSH และเครื่องช่วยหายใจแบบยืดหยุ่น (elastomeric respirator) สำหรับการปกป้องระบบทางเดินหายใจจะมีความสำคัญมากยิ่งขึ้นในการควบคุมการระบาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เกิดการได้รับวัคซีนยังอยู่ในระดับต่ำ ๆ หรือมีการขาดแคลนวัคซีน และสำหรับในผู้ที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันไม่ดีหรือมีภูมิคุ้มกันต่ำ ดังนั้นข้อมูลของเราจึงสนับสนุนคำสั่งบังคับให้สวมหน้ากากในชุมชนและการสวมหน้ากากหรือหน้ากากกรองอากาศที่ปิดแน่นสนิทสำหรับบุคลากรทางการแพทย์ รวมทั้งในสถานประกอบการทุกแห่งที่ผู้คนหายใจใช้อากาศภายในอาคารร่วมกันหรือมีการสัมผัสติดต่อกับสาธารณะบ่อยครั้ง

การเข้าถึงข้อมูล (Data Availability)

ข้อมูลที่ปกปิด (deidentified data) และรหัสสำหรับผลงานการศึกษาวิจัยที่ได้รับการยอมรับจะมีการเผยแพร่ผ่านทาง github

คำปฏิเสธข้อเรียกร้องและเงินทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัย (Disclaimers and Funding)

ข้อมูลต่าง ๆ ได้รับการสอบทวนจากสถาบันวิจัยของกองทัพบกที่วอลเตอร์รีด (Walter Reed Army Institute of Research) ไม่มีคำคัดค้านในการนำเสนอและ/หรือการตีพิมพ์เผยแพร่ข้อมูลเหล่านี้ ผู้วิจัยได้ยึดถือและปฏิบัติตามนโยบายต่าง ๆ ในการปกป้องคุ้มครองอาสาสมัครตามที่ระบุไว้ในระเบียบข้อบังคับของกองทัพบกข้อที่ AR 70-25 ความคิดเห็นต่าง ๆ ที่นำเสนอมาเป็นความคิดเห็นของตัวผู้เขียนเอง และไม่จำเป็นต้องสะท้อนถึงความคิดเห็นที่เป็นทางการของกระทรวงสุขภาพและการบริการมนุษย์ (Department of Health and Human Services) กระทรวงกองทัพบก กระทรวงกองทัพเรือ หรือกระทรวงกองทัพอากาศ (the Departments of the Army,

Navy or Air Force) กระทรวงกลาโหม (Department of Defense) หรือรัฐบาลสหรัฐอเมริกา (U.S. Government) สิ่งที่คุณพบและข้อสรุปต่าง ๆ ในรายงานนี้เป็นของผู้เขียนเอง และไม่จำเป็นต้องเป็นตัวแทนของจุดยืนที่เป็นทางการหรือนโยบายของหน่วยงานเหล่านี้ และไม่ควรมีการอนุมานว่ามีการรับรองอย่างเป็นทางการจากหน่วยงานเหล่านี้

การศึกษารายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจาก Prometheus-UMD ซึ่งได้รับการสนับสนุนทางการเงินจาก the Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) BTO ภายใต้การอุปถัมภ์ของพันเอกแมทธิว เฮฟเบิร์นผ่านทางข้อตกลงเลขที่ N66001-18-2-4015 การศึกษารายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจาก the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Centers of Excellence for Influenza Research and Surveillance (CEIRS) ผ่านทางข้อตกลงเงินอุดหนุนเลขที่ HHSN272201400008C จาก the Centers for Disease Control and Prevention ผ่านทางข้อตกลงเลขที่ 200-2020-09528 สิ่งที่คุณพบและข้อสรุปต่าง ๆ ในรายงานนี้เป็นของผู้เขียนเองและไม่จำเป็นต้องเป็นตัวแทนของจุดยืนที่เป็นทางการหรือนโยบายของหน่วยงานผู้สนับสนุนเงินทุนการศึกษารายงานนี้ และไม่ควรมีการอนุมานว่ามีการรับรองอย่างเป็นทางการจากหน่วยงานเหล่านี้

การศึกษารายงานนี้ยังได้รับการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุนจากมูลนิธิบิลและเมลินดาเกตส์ และได้รับของขวัญความเอื้ออาทรจากห้องปฏิบัติการใช้หวัดใหญ่ (<https://theflulab.org>) ผู้สนับสนุนเงินทุนในการศึกษารายงานไม่ได้มีบทบาทใด ๆ ในการออกแบบโครงการการศึกษารายงาน การจัดเก็บข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล หรือการตัดสินใจในการตีพิมพ์ เผยแพร่หรือจัดเตรียมเอกสารผลงานการศึกษารายงาน

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

เราขอขอบคุณ Dr. Jacques Ravel, Dr. Luke Tallon และสถาบัน the Institute of Genome Sciences at the University of Maryland School of Medicine สำหรับความช่วยเหลือในการทำ deep sequencing ตัวอย่างซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เราขอขอบคุณ Dr. Jamal Fadul และคลินิกของท่านที่วิทยาเขต College Park, Maryland สำหรับความช่วยเหลือในการลงทะเบียนรับสมัครผู้ป่วยอาสาสมัครเข้าร่วมในการศึกษารายงานนี้

เชิงอรรถ (Footnotes)

- ↩* Dr. Donald K. Milton, University of Maryland School of Public Health, 4200 Valley Drive, College Park, MD 20742 email: dmilton@umd.edu; phone: 301-405-0389 (Alternate: Dr. Filbert Hong, at the same address, email fhong@umd.edu, phone: 301-405-4081)

เอกสารอ้างอิง (References)

1. ↩
World Health Organization. *Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?* 2021. Available at: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>. Accessed 31 May 2021.
[Google Scholar](#)
2. ↩

CDC. *Scientific Brief: SARS-CoV-2 Transmission*. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html>. Accessed 8 May 2021.

[Google Scholar](#)

3. [3.↵](#)
Morawska L, Milton DK. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020; **71**:2311–2313.
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
4. [4.↵](#)
Greenhalgh T, Jimenez JL, Prather KA, Tufekci Z, Fisman D, Schooley R. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *Lancet* 2021; **397**:1603–1605.
[Google Scholar](#)
5. [5.↵](#)
Lednicky JA, Lauzardo M, Fan ZH, et al. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis* 2020; **100**:476–482.
[CrossRefGoogle Scholar](#)
6. [6.↵](#)
Lednicky JA, Lauzardo M, Alam MdM, et al. Isolation of SARS-CoV-2 from the air in a car driven by a COVID patient with mild illness. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*, 2021. Available at: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.01.12.21249603>. Accessed 1 February 2021.
[Google Scholar](#)
7. [7.↵](#)
Chia PY, Coleman KK, Tan YK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun* 2020; **11**:2800.
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
8. [8.↵](#)
Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* 2020; **582**:557–560.
[PubMedGoogle Scholar](#)
9. [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* 2020;
[Google Scholar](#)
10. [10.↵](#)
Yan J, Grantham M, Pantelic J, et al. Infectious virus in exhaled breath of symptomatic seasonal influenza cases from a college community. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; **115**:1081–1086.
[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)
11. [11.↵](#)
McDevitt JJ, Koutrakis P, Ferguson ST, et al. Development and Performance Evaluation of an Exhaled-Breath Bioaerosol Collector for Influenza Virus. *Aerosol Sci Technol* 2013; **47**:444–451.
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
12. [12.↵](#)
Harris PA, Taylor R, Minor BL, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *Journal of Biomedical Informatics* 2019; **95**:103208.
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
13. [13.↵](#)
Milton DK, Fabian MP, Cowling BJ, Grantham ML, McDevitt JJ. Influenza virus aerosols in human exhaled breath: particle size, culturability, and effect of surgical masks. *PLoS Pathog* 2013; **9**:e1003205.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

14. 14.↵
Vogels CBF, Brackney D, Wang J, et al. SalivaDirect: Simple and sensitive molecular diagnostic test for SARS-CoV-2 surveillance. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*, 2020. Available at: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.08.03.20167791>. Accessed 17 August 2020.
[Google Scholar](#)
15. 15.↵
Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Current Protocols in Microbiology* 2020; **57**:e100.
[Google Scholar](#)
16. 16.↵
O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Scher E, Rambaut A. cov-lineages/pangolin. *CoV-lineages*, 2021. Available at: <https://github.com/cov-lineages/pangolin>. Accessed 15 July 2021.
[Google Scholar](#)
17. 17.↵
Trevor Bedford, Richard Nehe, James Hadfield, et al. *Nextstrain SARS-CoV-2 resources*. 2020. Available at: <https://nextstrain.org/sars-cov-2/>. Accessed 29 July 2021.
[Google Scholar](#)
18. 18.↵
R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Available at: <https://www.R-project.org/>.
[Google Scholar](#)
19. 19.↵
Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd ed. Springer International Publishing, 2016. Available at: <https://www.springer.com/gp/book/9783319242750>. Accessed 11 June 2020.
[Google Scholar](#)
20. 20.↵
Vaida F, Fitzgerald AP, DeGruttola V. Efficient Hybrid EM for Linear and Nonlinear Mixed Effects Models with Censored Response. *Comput Stat Data Anal* 2007; **51**:5718-5730.
[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)
21. 21.↵
Vaida F, Liu L. Fast Implementation for Normal Mixed Effects Models With Censored Response. *J Comput Graph Stat* 2009; **18**:797-817.
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
22. 22.↵
CDC. *SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions*. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html>. Accessed 12 July 2021.
[Google Scholar](#)
23. 23.↵
Haas CN. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am J Epidemiol* 1983; **118**:573-582.
[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)
24. 24.↵
Pohl MO, Busnadiego I, Kufner V, et al. SARS-CoV-2 variants reveal features critical for replication in primary human cells. *PLoS Biol* 2021; **19**:e3001006.
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
25. 25.↵

Lindsley WG, Noti JD, Blachere FM, et al. Viable influenza A virus in airborne particles from human coughs. *J Occup Environ Hyg* 2015; **12**:107-113.

[CrossRefGoogle Scholar](#)

26. [26.↵](#)

Leung NHL, Chu DKW, Shiu EYC, et al. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks. *Nat Med* 2020; **26**:676-680.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

27. [27.↵](#)

Coleman KK, Tay DJW, Tan KS, et al. Viral Load of SARS-CoV-2 in Respiratory Aerosols Emitted by COVID-19 Patients while Breathing, Talking, and Singing. *medRxiv* 2021; :2021.07.15.21260561.

[Google Scholar](#)

28. [28.↵](#)

Ma J, Qi X, Chen H, et al. COVID-19 patients in earlier stages exhaled millions of SARS-CoV-2 per hour. *Clin Infect Dis* 2020; Available at: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1283/5898624>.

[Google Scholar](#)

29. [29.↵](#)

He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine* 2020; **26**:672-675.

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

30. [30.↵](#)

Yang Q, Saldi TK, Gonzales PK, et al. Just 2% of SARS-CoV-2-positive individuals carry 90% of the virus circulating in communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; **118**:e2104547118.

[AbstractFREE Full TextGoogle Scholar](#)

Paper in collection [COVID-19 SARS-CoV-2 preprints from medRxiv and bioRxiv](#)