ว กรมวิทย พ 2566; 65 (4): 325-338

การเตรียมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลในการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่: ประสบการณ์จากการระบาดใหญ่ของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่สถาบันบำราศนราดูร

สุมนมาลย์ อุทยมกุล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ในปี 2019 หรือ Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2 (SARS-CoV-2) ที่ก่อโรค COVID-19 เริ่มมีรายงานในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 จากการพบกลุ่มผู้ป่วยอาการปอดบวมโดยไม่ทราบสาเหตุ ณ เมืองอู่ฮั่น สาธารณรัฐประชาชนจีน และได้แพร่กระจายไปทั่วโลก การตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนสำคัญในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย รวมทั้งใช้สอบสวน เฝ้าระวัง และป้องกันโรค โดยองค์การอนามัยโลกแนะนำให้วินิจฉัยเชื้อไวรัสนี้ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมสำหรับคัดกรองผู้ที่เข้าข่ายสงสัยติดเชื้อ ประกอบกับรัฐบาลไทยได้ขอความร่วมมือทุกจังหวัดให้ดำเนินการตามนโยบาย หนึ่งจังหวัด-หนึ่งแล็บ ดังนั้นการจัดเตรียมห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) โดยการจัดทำแผนผังลำดับงานที่เป็นมาตรฐานและปฏิบัติงานอย่างปลอดภัยด้วยชีวนิรภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (biosafety level 2 enhance) สำหรับเชื้ออันตรายกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 จึงเป็นสิ่งเร่งด่วนในสถานการณ์ระบาดทั่วโลก การนำระบบจัดการคุณภาพมาปรับใช้ออกแบบห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งพื้นที่สำหรับกิจกรรมก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ห้องเตรียมน้ำยา และห้องสกัดสารพันธุกรรม พื้นที่สำหรับตรวจวัดสารพันธุกรรมที่ตั้งเครื่อง real-time PCR เป็นห้องสำหรับเพิ่มปริมาณและตรวจหาสารพันธุกรรม รวมทั้งวิเคราะห์ผลตรวจ โดยเสนอรูปแบบของการจัดห้องปฏิบัติการ ไว้ 2 ระบบ คือ semi-automation และ fully automation จากประสบการณ์ปฏิบัติงานด้วยเทคนิค PCR และการบริหารจัดการด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจด้านอณูชีวโมเลกุลสำหรับเชื้ออุบัติใหม่อื่น ๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 ต่อไป

คำสำคัญ: การเตรียมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล, เชื้ออุบัติใหม่, ไวรัสโคโรนา 2019

Corresponding author E-mail: sumonmal.u@dmsc.mail.go.th

Received: 22 July 2023 *Revised: 19 October 2023* *Accepted: 20 October 2023*

บทนำ

จากสถานการณ์การระบาดของโรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสที่ไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งภายหลังองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้ตั้งชื่อเป็นโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (coronavirus disease; COVID-19) หรือโรคโควิด 19 ประเทศไทยเริ่มตอบโต้การระบาดของโรคโควิด 19 ด้วยการเปิดศูนย์ปฏิบัติการภาวะฉุกเฉินทางสาธารณสุข (Emergency Operation Center; EOC) เมื่อวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2563 กรณีโรคปอดอักเสบรุนแรงจากเชื้อไวรัส และแต่งตั้งคณะทำงานเพื่อเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การระบาดของโรค วันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2563 มีรายงานพบผู้ป่วยยืนยันติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่รายแรกในประเทศไทย โดยเป็นนักท่องเที่ยวชาวจีนและเป็นผู้ป่วยยืนยันติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่รายแรกนอกสาธารณรัฐประชาชนจีน และในวันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2563 พบผู้ป่วยคนไทยรายแรกติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ที่มีประวัติเดินทางกลับจากต่างประเทศ ต่อมาวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2563 กระทรวงสาธารณสุขแถลงการณ์พบผู้ป่วยคนไทยรายแรกติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ภายในประเทศ

จากสถานการณ์เมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2563 มีรายงานพบผู้ป่วยเข้าเกณฑ์เฝ้าระวัง (patient under investigation; PUI) เป็นนักท่องเที่ยวชาวจีน จากการตรวจ ณ จุดคัดกรองโรคที่สนามบินสุวรรณภูมิ โดยทีมงานกองด่านควบคุมโรคติดต่อระหว่างประเทศ กรมควบคุมโรค[1] ซึ่งถูกส่งต่อไปกักกันโรคและทำการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร โดยเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อคัดกรองหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจ 33 ชนิด ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) ที่ห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลของสถาบันบำราศนราดูร แต่ไม่พบการติดเชื้อใด ๆ ตามแนวทางของการสอบสวนโรคเพื่อหาสาเหตุสำหรับวินิจฉัยโรคจะมีการส่งตัวอย่างไปตรวจเพิ่มเติมที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิง 2 แห่ง ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สภากาชาดไทย ซึ่งได้ตรวจหากลุ่มเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (Family-Wide polymerase chain reaction (PCR))[2] ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหากลุ่มของเชื้อไวรัสโคโรนาที่ตำแหน่งยีนต่าง ๆ และพบผลบวก coronavirus เมื่อนำไปถอดรหัสพันธุกรรมแบบ direct sequencing ได้ผลตรวจเป็น bats severe acute respiratory syndrome (SARS) like coronavirus (CoV) ส่วนกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ตรวจตัวอย่างเชื้อผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย ด้วยวิธี real-time RT-PCR พร้อมกับใช้เทคโนโลยี next generation sequencing ทำการถอดรหัสพันธุกรรมได้สำเร็จ ซึ่งเป็นการตรวจหา whole genome sequencing novel coronavirus 2019 (Wuhan strain) โดยวันที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2563 รัฐบาลสาธารณรัฐประชาชนจีนได้เผยแพร่ข้อมูลรหัสพันธุกรรมทำให้สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกันได้ และวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2563 ผู้เชี่ยวชาญได้ยืนยันว่าผู้ป่วยรายนี้มีเชื้อตรงกัน จึงได้มีการประกาศพบผู้ป่วยยืนยันรายแรกในวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2563 ซึ่งเป็นผู้ป่วยรายแรกนอกสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยสรุปผลจาก 2 ห้องปฏิบัติการที่ให้ผลตรงกันของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ ด้วยวิธี whole genome sequencing[3]

การตรวจด้านอณูชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อหาสารพันธุกรรมมีความจำเป็นในการตรวจวินิจฉัย และการยืนยันการติดเชื้อ เพื่อตอบสนองการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรคของประเทศ ในการเปิดบริการตรวจหาสารพันธุกรรมของ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR จากการใช้น้ำยาที่พัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์หรือน้ำยาสำเร็จรูปที่ผ่านการประเมินคุณภาพโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อตรวจวินิจฉัยสำหรับผู้สงสัยติดเชื้อก่อโรค COVID-19 วางระบบงานตามมาตรฐานการปฏิบัติงาน PCR และมาตรฐานความปลอดภัยสำหรับห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (biosafety level 2 enhanced: BSL-2 enhanced) เมื่อปริมาณสิ่งส่งตรวจมากขึ้นจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนระบบงานไปใช้เครื่องอัตโนมัติ เพื่อลดระยะเวลารอผลการตรวจ

ประเทศไทยในระยะเริ่มต้นให้บริการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อก่อโรค COVID-19 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 15 แห่ง ต่อมามีหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนได้เปิดบริการเพิ่มขึ้น โดยมีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจสอบมาตรฐานและโครงสร้างทางกายภาพ รวมทั้งประเมินคุณภาพด้วยโปรแกรมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ทำให้มีห้องปฏิบัติการเครือข่ายที่ผ่านการรับรองและให้บริการการตรวจได้ครอบคลุมทุกพื้นที่ ซึ่งปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรอง จำนวน 534 แห่ง[4] (ข้อมูลในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2566) อย่างไรก็ตาม องค์ความรู้ในการออกแบบห้องปฏิบัติการ การเตรียมความพร้อมตามมาตรฐานและความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการรองรับการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในอนาคต

ห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล สถาบันบำราศ-นราดูร มีประสบการณ์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง หรือ Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) มาก่อน ซึ่ง MERS-CoV จัดเป็นเชื้ออันตรายในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 ดังนั้นจึงสามารถนำความรู้และประสบการณ์มาประยุกต์ใช้ได้รวดเร็วทันเวลา โดยบทความนี้มีวัตถุประสงค์ถ่ายทอดประสบการณ์ ในช่วงการเตรียมห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SAR-CoV-2 ซึ่งจัดเป็นเชื้ออันตรายในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 (BSL-3) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส กรณีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล สามารถใช้แนวทางปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจตามมาตรฐานความปลอดภัยด้วยเทคนิคชีวนิรภัยแบบเสริมสมรรถนะ (BSL-2 enhanced) เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนจัดเตรียมห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อติดต่ออันตรายสำหรับหน่วยงานอื่นที่อาจต้องทำหน้าที่ตรวจเชื้อในกลุ่มนี้

วัสดุและวิธีการศึกษา

การดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการ: ดำเนินงานตามแนวทางมาตรฐานด้านอณูชีวโมเลกุล และความปลอดภัยในการปฏิบัติงานด้วยเทคนิค BSL-2 แบบเสริมสมรรถนะ มีการประเมินความเสี่ยงก่อนการดำเนินงาน โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งระบบของห้องปฏิบัติการ การบริหารจัดการระบบความปลอดภัยตามกลุ่มเสี่ยงของเชื้อโรค พร้อมทั้งจัดทำแบบประเมินความเสี่ยงของห้องปฏิบัติการ สถานที่และสภาพแวดล้อม มีพื้นที่ปฏิบัติการสำหรับใช้รับสิ่งส่งตรวจ พื้นที่สะอาดสำหรับใช้จัดเก็บชุดสวมและอุปกรณ์เพื่อป้องกันส่วนบุคคล พื้นที่ส่วนปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์ และพื้นที่จัดเก็บตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์หรือใช้อบนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นต้น

บุคลากรที่ทำหน้าที่ตรวจวิเคราะห์: จำเป็นต้องได้รับการอบรมเพื่อพัฒนาศักยภาพในการตรวจด้านอณูชีวโมเลกุล ฝึกทักษะการปฏิบัติงานตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ การสวมและถอดอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (personal protective equipment; PPE) อย่างถูกต้องและได้รับการอบรมการใช้เครื่องมือตามมาตรฐาน เช่น ตู้ชีวนิรภัย ระดับ 2 (biological safety cabinet class II; BSC Class II) สำหรับการปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจ ต้องใช้ความระมัดระวังในการผสมตัวอย่างที่ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายหรือ aerosol การใช้เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รวมทั้งฝึกอบรมการใช้งานน้ำยาสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมและเครื่องมือที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้บุคลากรที่ปฏิบัติงานต้องได้รับการอบรมด้านความปลอดภัยและฝึกปฏิบัติเรื่องการสวมใส่และถอด PPE รวมทั้งทักษะการปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อโรค

เครื่องมือ น้ำยา และวัสดุอุปกรณ์: จำเป็นต้องมีเครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็นและเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ BSC Class II สำหรับเตรียมตัวอย่าง ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ตู้เย็นสำหรับเก็บน้ำยา ตู้แช่สำหรับเก็บหรือรักษาตัวอย่าง เครื่องมือสำหรับสกัดสารพันธุกรรม เครื่องตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR และเครื่อง autoclave

กระบวนการก่อนการทดสอบ: มีพื้นที่สำหรับจัดเก็บและเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนก่อนตรวจวิเคราะห์ มีอุปกรณ์จัดเก็บและขนส่งตัวอย่างที่ปลอดภัย ควบคุมอุณหภูมิตามระยะเวลาในการขนส่งถึงห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์

กระบวนการทดสอบ: วิธีการตรวจด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล จำเป็นต้องจัดทำแผนผังลำดับการปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการจัดเตรียมพื้นที่ให้ถูกต้องตามหลักการตรวจด้วยวิธี PCR ทั้งนี้ขณะเตรียมตัวอย่างสงสัยเชื้ออันตราย ควรบันทึกระยะเวลาที่ต้องปฏิบัติงาน และติดป้ายสถานะห้อง เช่น “ห้ามเข้า ขณะนี้เจ้าหน้าที่กำลังตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจสงสัยเชื้ออันตราย”

การแปลผลและการรายงานผล: แปลผลตามคู่มือและคำแนะนำในเอกสารกำกับน้ำยา และรายงานผลตามระบบมาตรฐานการรายงานผลที่กำหนดไว้

การควบคุมคุณภาพ: ในการตรวจวิเคราะห์มีตัวอย่างที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพภายในด้วยชุดควบคุมที่มาพร้อมกับชุดตรวจวิเคราะห์ และการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญตามระบบของการตรวจ หรือเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระบวนการหลังการทดสอบ: สิ่งส่งตรวจหาสารพันธุกรรมควรเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งและเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เก็บหลอดตัวอย่างที่เหลือจากการปฏิบัติงานไว้ทวนสอบในภาชนะที่ปิดมิดชิด ระบุสัญลักษณ์ติดเชื้อ หรือ biohazard sign และห้องปฏิบัติการมีระบบการทำลายขยะติดเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ก่อนนำออกจากห้องปฏิบัติการ วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้แล้วหรือตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ ชุด PPE และขยะติดเชื้ออื่น ๆ พร้อมทั้งจัดการลดการปนเปื้อน (decontamination) การอบนึ่งฆ่าเชื้อและนำออกไปกำจัดตามระบบของสถานพยาบาล

การประเมินด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ: การปฏิบัติงานตามมาตรฐานที่กำหนดตามกลุ่มเสี่ยงของระดับเชื้อโรค การสวมใส่หรือถอดอุปกรณ์ PPE และการนำไปกำจัดตามหลักวิชาการ รวมทั้งการจัดให้มีชุดจัดการสารปนเปื้อนหรือ biological spill kit ให้พร้อมใช้งานในพื้นที่ปฏิบัติการ

การจัดแบ่งพื้นที่

การจัดเตรียมพื้นที่ห้องปฏิบัติการ: สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR ที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (nucleic acid) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง เพื่อหลีกเลี่ยงกระบวนการปนเปื้อนจากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ลดการรายงานผลผิดพลาด การปฏิบัติงานจำเป็นต้องเตรียมการตั้งแต่การออกแบบห้องปฏิบัติการจัดให้มีพื้นที่แยกออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การเตรียมน้ำยา การสกัดตัวอย่าง การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และวัดผล[5,6] โดยมีพื้นที่ปฏิบัติงาน แบ่งเป็น 3 บริเวณ ได้แก่

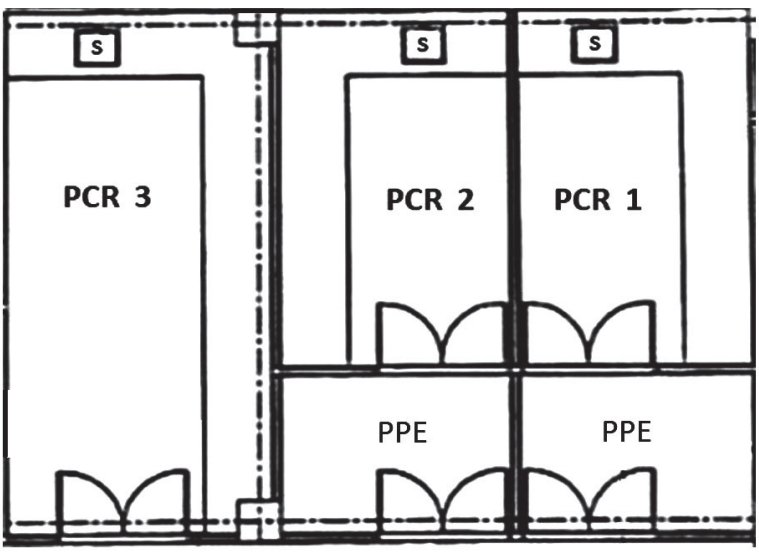
บริเวณที่ 1 ห้องเตรียมน้ำยาสำหรับ PCR (reagent preparation area: PCR 1) บริเวณนี้ควรมีพื้นที่ขั้นต่ำ 2.5 × 3 ตารางเมตร มีประตูที่ใช้เปิดและปิดสะดวก อ่างล้างมือ และมีที่แขวนเสื้อกาวน์สำหรับใช้เฉพาะห้องนี้ อุปกรณ์เครื่องมือพื้นฐานประกอบด้วยตู้เย็น 2–8 องศาเซลเซียส ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บน้ำยา ตู้ PCR cabinet ซึ่งมีจำหน่ายสำเร็จรูปนำเข้าจากต่างประเทศ หรือสั่งทำเป็นตู้พลาสติกติดหลอดแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet; UV) พร้อมสวิตช์เปิด UV หลังการใช้งาน และมีการตั้งเวลาปิดไฟ UV ได้ อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็นวางไว้ใกล้ ๆ ตู้นี้ คือ vortex mixer, spin down centrifuge, autopipette ขนาด P10, P20, P200 และ P1000 พร้อม filter tip และถุงมือยางแบบไร้แป้ง เป็นต้น ห้องนี้จัดไว้เพื่อเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา PCR จัดเป็นห้องที่สะอาด ไม่อนุญาตให้นำสิ่งส่งตรวจและ PCR product เข้ามาในบริเวณนี้โดยเด็ดขาด การเตรียมน้ำยาตั้งต้นสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 (master mix) สามารถผสมน้ำยาใช้เองตามสูตรที่มีและผสมสารตั้งต้นต่าง ๆ ที่จำเป็น หรือนำน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศมาแบ่งเป็นหลอดเล็ก ๆ ก่อนที่จะนำออกไปเติมตัวอย่างที่สกัดแล้วในห้องถัดไป ดังแสดงในภาพที่ 1

บริเวณที่ 2 ได้แก่ ห้องเตรียมตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (specimen preparation area: PCR 2) บริเวณนี้ควรจัดเตรียมพื้นที่ 3 × 4 ตารางเมตร มีประตู 2 ชั้น ไม่จำเป็นต้องเป็นห้องความดันลบ ประตูชั้นแรกเข้าไปภายในเป็นพื้นที่สำหรับสวมใส่และถอด PPE เมื่อผ่านประตูที่ 2 จะเป็นห้องสำหรับปฏิบัติงาน มีอ่างล้างมือ เครื่องมือ และอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็น ประกอบด้วย ตู้ BSC Class II, vortex mixer เครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติหรือสกัดสารพันธุกรรมแบบ manual จำเป็นต้องใช้

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) ที่มีความเร็วรอบในช่วง 12,500–16,000 g ตู้เย็นอุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บตัวอย่างควบคุมคุณภาพ autopipette ขนาด P20, P200 และ P1000 พร้อม filter tip และถุงมือยางแบบไร้แป้ง นอกจากนี้การปฏิบัติงานควรจัดให้มีพื้นที่รับสิ่งส่งตรวจ อาจใช้กล่องส่งผ่านตัวอย่าง (pass box) ก่อนส่งเข้าห้องปฏิบัติการ PCR หากไม่มีกล่องส่งผ่านตัวอย่าง สามารถออกแบบห้องให้มีประตู 2 ชั้น เพื่อส่งตัวอย่างผ่านทางประตูปกติ

บริเวณที่ 3 ห้องตรวจวัดสารพันธุกรรมและวิเคราะห์ผล (post-PCR หรือ detection area: PCR 3) บริเวณนี้ควรจัดเตรียมพื้นที่ 2 × 3 ตารางเมตร พร้อมอ่างล้างมือ เป็นบริเวณที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ห้ามนำหลอด PCR หรืออุปกรณ์ที่อยู่ในส่วนนี้ย้อนกลับไปในห้อง PCR 1 และห้อง PCR 2 โดยเด็ดขาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นได้ ควรมีทิศทางการเดินจากห้อง PCR 1 ไปยังห้อง PCR 2 แต่ห้อง PCR 3 ไม่จำเป็นต้องเป็นห้องติดกับห้อง PCR 2 ซึ่งห้อง PCR 3 ที่มีประตูชั้นเดียว สามารถจัดให้มี pass box และนำอุปกรณ์เข้าห้องโดยผ่านทางนี้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 1

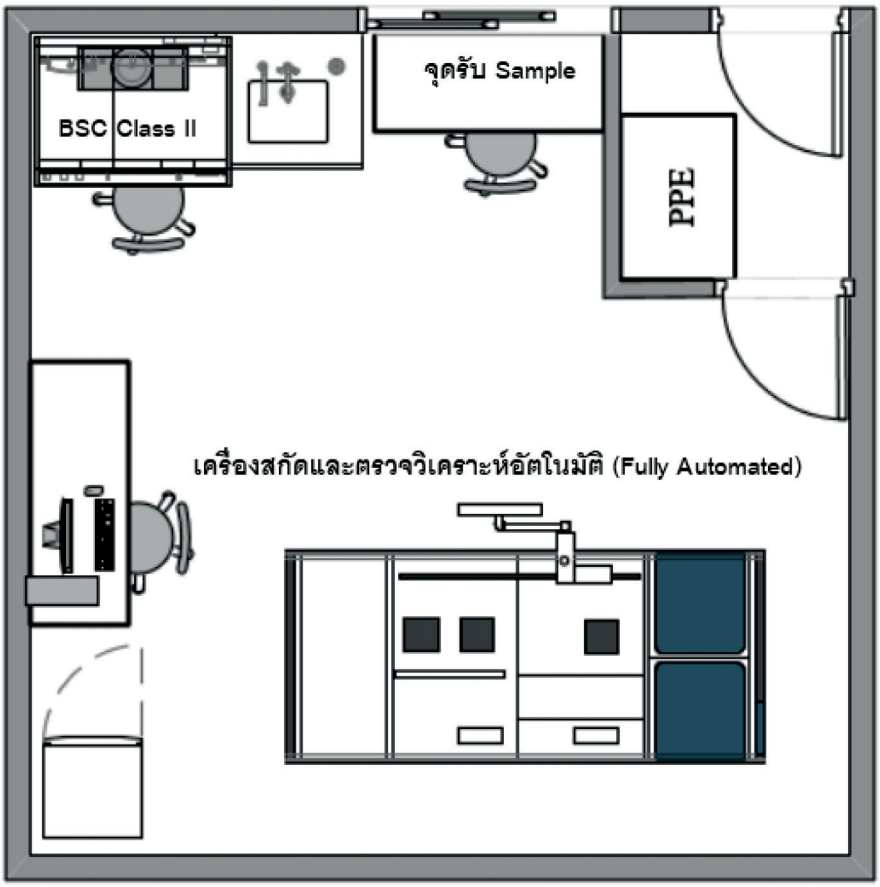
เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็น ประกอบด้วยเครื่องวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (เครื่อง real-time PCR) พร้อมคอมพิวเตอร์และโปรแกรมที่ใช้ประมวลผล รวมทั้งการจัดเตรียมถุงมือยางชนิดไร้แป้งในแต่ละจุด



ภาพที่ 1 การแบ่งพื้นที่สำหรับงาน PCR โดยมีความกว้างของแต่ละห้อง 3–4 เมตร แยกจากกัน โดยแบ่งเป็น 3 พื้นที่ ได้แก่ ห้องเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา สวมรองเท้าและเสื้อกาวน์ผ้าก่อนเข้าพื้นที่เตรียมน้ำยา (PCR 1) ห้องสกัดสารพันธุกรรม สวมอุปกรณ์ personal protective equipment ก่อนเข้าพื้นที่สกัดตัวอย่างตามมาตรฐานความปลอดภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (PCR 2) ห้องเพิ่มปริมาณและตรวจวัดสารพันธุกรรม (PCR 3) และ [S] คือ อ่างล้างมือในแต่ละห้อง

ในสถานการณ์โรคระบาดเมื่อห้องปฏิบัติการได้รับสิ่งส่งตรวจจำนวนมาก จำเป็นต้องมีระบบ fully automation ซึ่งใช้เครื่องมืออัตโนมัติสกัดสารพันธุกรรม พร้อมเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบผล เนื่องจากเป็นระบบการทำงานสกัดและวัดผลด้วยระบบปิด ดังนั้นสามารถใช้ห้องที่มีขนาด 5 × 5 ตารางเมตร ห้องเดียวพร้อมอ่างล้างมือ โดยแบ่งพื้นที่ภายในให้เป็นสัดส่วน ต้องมีบุคลากรทำหน้าที่เตรียมตัวอย่างสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยใส่หลอดเพื่อนำเข้าเครื่องอัตโนมัติ และต้องจัดพื้นที่สำหรับสวมใส่และถอดอุปกรณ์ PPE ดังแสดงในภาพที่ 2

เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็น ประกอบด้วย ตู้ BSC Class II, vortex mixer, ตู้เย็นอุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส, autopipette ขนาด P20, P200 และ P1000 พร้อม filter tip และถุงมือยางแบบไร้แป้ง เป็นต้น



ภาพที่ 2 ตัวอย่างการวางแผนผังห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องอัตโนมัติ (ขนาด 5 × 5 เมตร)

ผล

กระบวนการดำเนินงานและประเมินความพร้อมของห้องปฏิบัติการที่จัดตั้งใหม่ จำเป็นต้องมีการกำหนด checklist เพื่อจัดเตรียมอุปกรณ์ในแต่ละพื้นที่ของห้องปฏิบัติการ PCR ดังแสดงในตารางที่ 1

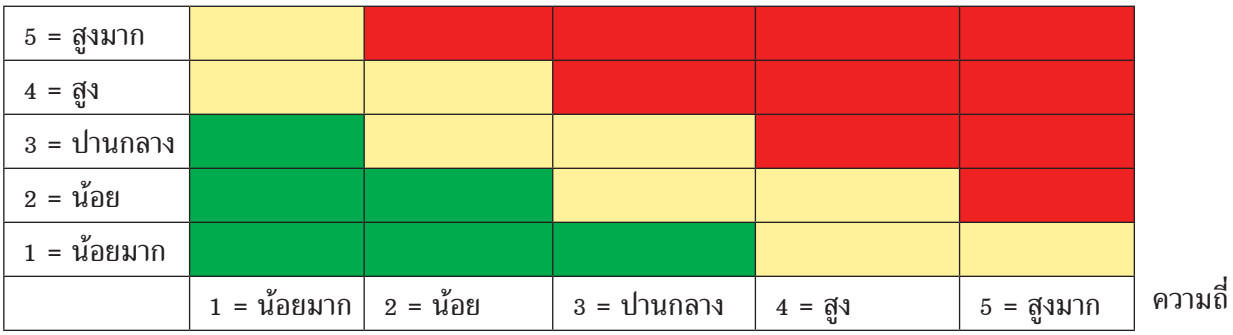
ตารางที่ 1 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการประเมินความพร้อม

ลำดับที่	รายการเครื่องมือและอุปกรณ์	จำนวน	มี	ไม่มี
PCR 1: Reagent preparation room (Master Mix): Clean area				
1	PCR cabinet (with UV) for master mix preparation	1		
2	Freezer -20°C (for reagent storage)	1		
3	Adjustable autopipette 2, 20, 200 and 1000 µL	4		
4	Filtered tips 0.1–10 µL, 2–20 µL, 5–200 µL, 100–1000 µL	4		
5	Vortex mixer	1		

ตารางที่ 1 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการประเมินความพร้อม (ต่อ)

ลำดับที่	รายการเครื่องมือและอุปกรณ์	จำนวน	มี	ไม่มี
6	Spin down centrifuge	1		
7	Microcentrifuge tube 1.5 ml	1		
8	Microcentrifuge tubes rack	1		
9	Disposable gloves latex powder free	1		
10	70% Alcohol	1		
11	Distilled water	1		
12	Gauze pad	1		
PCR 2: Sample preparation room (Biosafety level 2 enhanced practice)				
1	BSC Class ll	1		
2	เครื่องสกัดอัตโนมัติ	1		
3	Adjustable autopipette 20 µL, 200 µL	2		
4	Filtered tips 2-20 µL, 5-200 µL	2		
5	Bench top microcentrifuge (capable of 20,000 x g)	1		
6	Microcentrifuge tube 2.0 ml	1		
7	Microcentrifuge tubes rack	1		
8	Vortex mixer	1		
9	Refrigerator (2-8 °C) (for reagent storage)	1		
10	Disposable gloves latex powder free	1		
11	70% Alcohol	1		
12	Distilled water	1		
13	Gauze pad	1		
PCR 3: Room/Area				
1	เครื่อง real-time PCR	1		
2	Adjustable autopipette 20 µL	1		
3	Filtered tips 2-20 µL	1		
4	Vortex mixer	1		
5	Spin down centrifuge	1		

ขั้นตอนวิเคราะห์ความเสี่ยงและแนวทางปฏิบัติงานด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล โดยมีเกณฑ์มาตรฐานของระดับความเสี่ยง (degree of risk) ตามความรุนแรงของผลกระทบ (impact) ตั้งแต่ 1-5 และโอกาสที่จะเกิดความเสี่ยงตั้งแต่ 1-5 ได้แก่ ระดับ 1 น้อยมาก 2 น้อย 3 ปานกลาง 4 สูง และ 5 สูงมาก[7] ซึ่งพิจารณาความเสี่ยงจากความถี่ของการเกิดเหตุการณ์และความรุนแรงที่เกิดขึ้น หลักการของความเสี่ยง เกิดจากความถี่ × ความรุนแรง สามารถแสดงได้ 3 สี ได้แก่ เขียว เหลือง แดง หมายถึง ความเสี่ยงน้อย ปานกลาง สูง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ความเสี่ยงตามความรุนแรงของผลกระทบและโอกาสเกิดความเสี่ยง

จากการทำแผนภูมิความเสี่ยง (risk map) สามารถนำมาทำแผนบริหารความเสี่ยง รวมทั้งประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แผนการบริหารความเสี่ยงและประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพห้องปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2

ความเสี่ยง	ปัจจัยเสี่ยง	แนวทางการจัดการความเสี่ยง	ผลกระทบ	โอกาสเกิด
ห้องเตรียมน้ำยา master mix	1. มีการปนเปื้อนจากการปฏิบัติงาน	- ต้องแยกห้องและเครื่องมือใช้งานเฉพาะสำหรับเตรียมน้ำยา ในขั้นตอน pre-PCR	1	1
	2. เตรียมน้ำยาไม่ถูกต้อง	- มีคู่มือปฏิบัติงานหรือเอกสารประกอบสำหรับเตรียมน้ำยา master mix - ฝึกอบรมบุคลากรให้ผ่านเกณฑ์ก่อนการปฏิบัติงาน	4	2
ห้องเตรียมตัวอย่าง	1. ติดเชื้อจากการปฏิบัติงานเตรียมตัวอย่าง	- เลือกใช้ PPE ให้เหมาะสม - ปฏิบัติงานเตรียมตัวอย่างในตู้ BSC Class II	5	2
	2. สลับตัวอย่างหรือเตรียมตัวอย่างผิดคน	- ปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติงานอย่างเคร่งครัด ทวนสอบรายละเอียดบนหลอดตัวอย่างทุกครั้ง (primary กับ secondary tube)	4	1
ห้องตรวจวิเคราะห์ real-time RT-PCR	เลือกใช้ protocol ไม่ถูกต้อง	มีคู่มือการปฏิบัติงานหรือเอกสารประกอบสำหรับการทำ real-time RT-PCR	4	1
ห้องตรวจวิเคราะห์ SARS-CoV-2 ด้วยเครื่องอัตโนมัติ	ตัวอย่างหกหล่นในขั้นตอนนำตัวอย่างเข้าเครื่องอัตโนมัติ	เตรียมตัวอย่างใส่กล่องมีฝาปิด-เปิดในตู้ BSC Class II และนำตัวอย่างเข้าเครื่องอัตโนมัติภายใน 3 วินาที	4	1

บุคลากรที่เกี่ยวข้องต้องได้รับการอบรม โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ตรวจวิเคราะห์เพื่อให้มีความรู้ด้านอณูชีวโมเลกุล ฝึกทักษะการปฏิบัติงาน PCR เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ฝึกสวมใส่และถอดอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (PPE) อย่างถูกต้อง และได้รับการอบรมการใช้เครื่องมือตามมาตรฐาน เช่น ตู้ BSC Class II การใช้งานเครื่อง autoclave ฝึกอบรมการใช้งานเครื่องมือและน้ำยาสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรม รวมทั้งเครื่องมืออื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ลักษณะการฝึกอบรมหน้างาน ประเมินผลโดยการทำแบบทดสอบและฝึกภาคปฏิบัติ มีเกณฑ์ผ่านไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 และต้องมีแผนการฝึกอบรมเพื่อฟื้นฟูความรู้อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง มีนักเทคนิคการแพทย์เข้ารับการฝึกอบรมและพัฒนาศักยภาพด้านการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่ และได้รับมอบหมาย

ให้ปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 26 คน มีระบบการทำงานเป็นผลัดช่วงเวลา โดยการปฏิบัติงานกับเชื้ออันตราย จำเป็นต้องมีเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานร่วมกันอย่างน้อย 2 คน เพื่อความปลอดภัย

การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการและเครื่องมืออุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็นสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 นอกจากการแบ่งพื้นที่ปฏิบัติงานตามหลักการ PCR แล้ว ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ ตามชนิดของเครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ ระบบ semi-automation เป็นการใช้วิธีสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจด้วยมือหรือเครื่องอัตโนมัติร่วมกับเครื่อง real-time PCR ในการเพิ่มปริมาณและตรวจวัดสารพันธุกรรม ดังแสดงในภาพที่ 1 เมื่อห้องปฏิบัติการได้รับสิ่งส่งตรวจเพิ่มขึ้นจำนวนมากในสถานการณ์โรคระบาดจำเป็นต้องมีระบบ fully automation ซึ่งใช้เครื่องมืออัตโนมัติสกัดสารพันธุกรรม พร้อมเพิ่มปริมาณและตรวจสอบผล การออกแบบห้องปฏิบัติการสามารถใช้ 1 ห้อง และมีพื้นที่เหมาะสมกับขนาดของเครื่องอัตโนมัติและอุปกรณ์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 2

การควบคุมการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ PCR

นอกจากโครงสร้างทางกายภาพ สิ่งที่สำคัญในการป้องกันผลวิเคราะห์ผิดพลาด คือการควบคุมการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ PCR โดยแยกอุปกรณ์ในแต่ละพื้นที่ไม่ใช้ปะปนกัน จัดให้มีถุงมือยางไร้แป้ง และเสื้อกาวน์ รองเท้าในแต่ละห้องแยกส่วนกัน หลังจากปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70% หรือใช้ bleach agent หรือ 0.5% sodium hypochlorite ทำความสะอาดและเช็ดด้วยน้ำกลั่นตามทุกครั้ง ทำการบำรุงรักษาและสอบเทียบเครื่องมือตามมาตรฐานที่กำหนด การตรวจสอบการปนเปื้อนจำเป็นต้องใช้ negative control ควบคู่ทุกครั้งในการทำปฏิกิริยา PCR รวมทั้งตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ non-template control คือ ผสมน้ำปราศจากสาร DNase และ RNase กับน้ำยา master mix

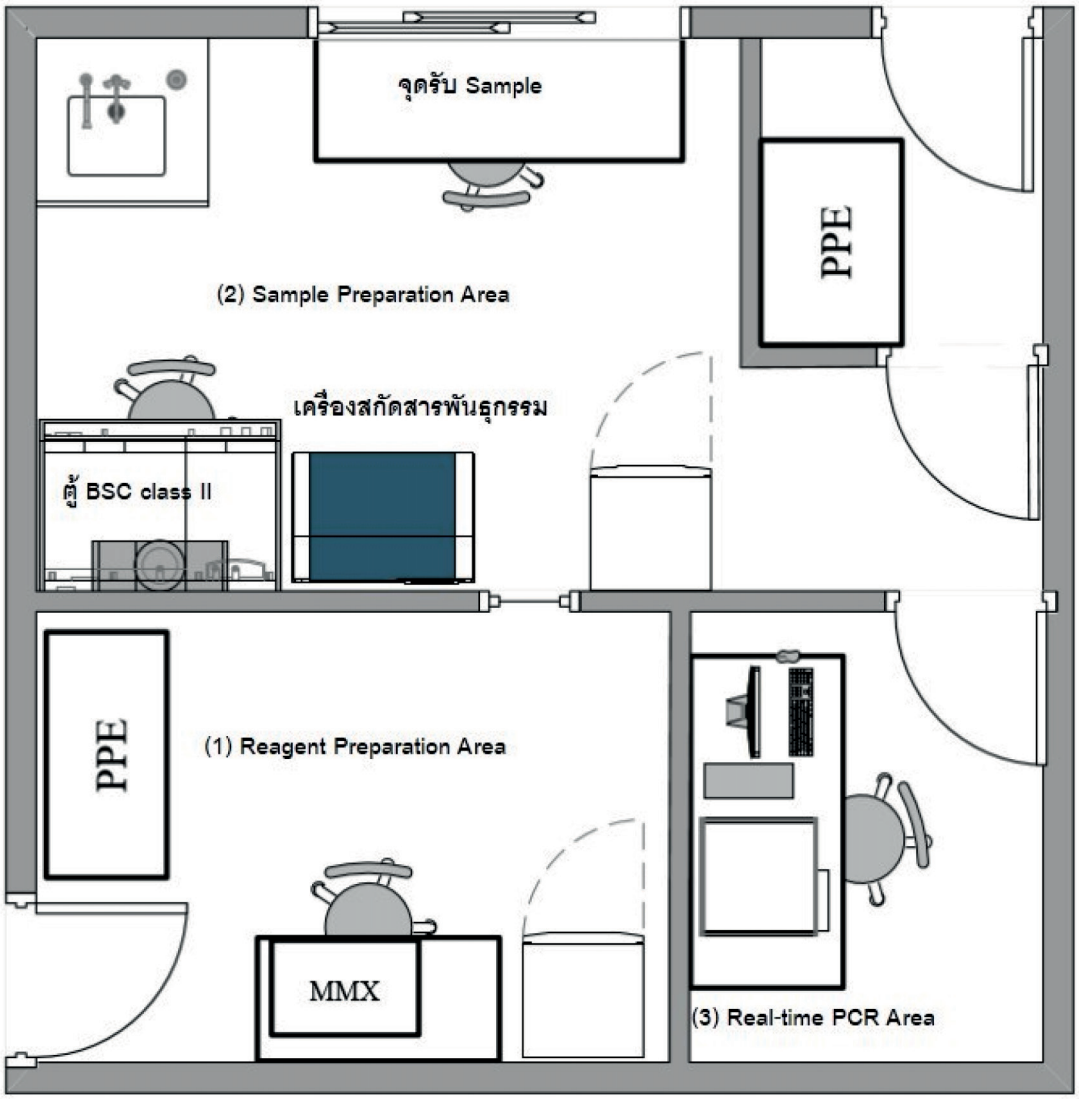
ผลการดำเนินงานในด้านการเตรียมความพร้อมของเครื่องมือและน้ำยา ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นให้มีครบถ้วน โดยมีการนำเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติมาใช้ให้เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ได้รับและเพื่อความรวดเร็วในการรายงานผลตามเวลาที่กำหนด กระบวนการก่อนการทดสอบ กระบวนการทดสอบ กระบวนการหลังการทดสอบ การแปลผลและการรายงานผล เป็นไปตามระบบคุณภาพที่กำหนดไว้ในวิธีการดำเนินงานตามมาตรฐาน เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ และมีผลการประเมินผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

วิจารณ์

เนื่องจากเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นเชื้ออันตรายที่ถูกจัดไว้ในกลุ่มเสี่ยงกลุ่มที่ 3 ตามข้อปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ หากเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสนี้ต้องปฏิบัติงานในมาตรฐานความปลอดภัยระดับ 3 (biosafety level 3; BSL3)[8,9] แต่ในการปฏิบัติงานตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR องค์การอนามัยโลกและคำแนะนำจากหน่วยงานที่มีประสบการณ์ในสาธารณรัฐประชาชนจีน[10] ให้ปฏิบัติงานที่ความปลอดภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (BSL-2 enhanced) คือ จัดพื้นที่ปฏิบัติงานไว้ในระดับ 2 เพิ่มวิธีปฏิบัติงานตามมาตรฐานความปลอดภัยแบบระดับ 3 อย่างเคร่งครัด ได้แก่ การเลือกใช้อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล เพิ่มความระมัดระวังในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม โดยผู้ปฏิบัติงานสวมเสื้อกาวน์ชนิดกันน้ำแบบใช้แล้วทิ้ง หมวก หน้ากาก N-95 face-shield และสวมถุงมือ 2 ชั้น รองเท้าหัวปิด ในกรณีที่ไม่มีเสื้อกาวน์กันน้ำให้ใช้กาวน์ผ้าเสริมด้วยผ้ากันเปื้อนพลาสติกได้ การปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจควรทำในตู้ BSC Class II และเป็นพื้นที่สำหรับผสมตัวอย่างที่สกัดสารพันธุกรรมแล้วกับน้ำยา PCR ที่เตรียมไว้ในหลอดปฏิกิริยา เมื่อปฏิบัติงานเสร็จแล้วต้องทำความสะอาดพื้นผิวที่ปฏิบัติงานด้วยน้ำยาทำลายเชื้อไวรัสและขยะในห้องนี้จำเป็นต้องใส่ถุงเฉพาะและนำออกไปอบฆ่าเชื้อก่อนกำจัดตามระบบต่อไป

นอกจากการออกแบบห้องโดยโครงสร้างแยกเป็น 3 ห้อง ที่กั้นด้วยผนังปูน ในสถานการณ์เร่งด่วนสามารถสร้างห้องอย่างรวดเร็ว โดยใช้ผนังกระจกกั้นห้องแทน หรือถ้าหน่วยงานใดมีพื้นที่โล่ง ขนาด 5 × 5 เมตร จะกั้นแยกส่วนภายในด้วยผนังกระจกให้เป็น 3 ห้องย่อย

เพื่อความรวดเร็วในการจัดเตรียมพื้นที่ปฏิบัติงาน และติดตั้งเครื่องปรับอากาศแยกในแต่ละห้องเพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยเฉพาะห้องเตรียมสิ่งส่งตรวจที่ติดตั้งตู้ชีวนิรภัยต้องคำนึงถึงระบบการไหลเวียนอากาศ และทิศทางลมที่ต้องไม่รบกวนระบบการทำงานของตู้ BSC Class II ทั้งนี้ในแต่ละห้องต้องจัดให้มีพื้นที่สำหรับอุปกรณ์ PPE ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ตัวอย่างการวางแผนผังห้อง PCR (ขนาด 5 × 5 เมตร)

(1) Reagent preparation area พื้นที่เตรียมน้ำยา master mix (MMX) โดยใช้ PCR cabinet

(2) Sample preparation area บริเวณผสมน้ำยา master mix และ RNA template/PCR control ในตู้ BSC Class II หรือใน PCR cabinet (optional)

(3) Real-time PCR area บริเวณเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจวัดผลผลิต

จากสถานการณ์ของโรค COVID-19 ที่ส่งผลกระทบในวงกว้างและแพร่ระบาดไปทั่วโลก และองค์การอนามัยโลกประกาศเป็นภาวะฉุกเฉินทางสาธารณสุขระหว่างประเทศ ข้อมูลการติดเชื้อในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2563 ระยะแรกพบเฉพาะผู้ที่เดินทางมาจากต่างประเทศ จากนั้นจึงเกิดการแพร่ระบาดทั่วประเทศ[1,3] สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค มีบทบาทในการกักกันผู้ป่วยสงสัยโรคติดต่ออันตราย

มีประสบการณ์ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลางมาก่อน ในการตรวจวินิจฉัยโรค COVID-19 ได้ตรวจคัดกรองหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจเบื้องต้นและประสานงานส่งตัวอย่างกับห้องปฏิบัติการอ้างอิง 2 แห่ง ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ โดยห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลของสถาบันบำราศนราดูร เป็นเครือข่ายตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทยช่วงแรก เมื่อ 4 มีนาคม พ.ศ. 2563 และระยะต่อมามีเครือข่ายห้องปฏิบัติการในประเทศเพิ่มขึ้น โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้รับมอบหมายให้ขยายเครือข่ายห้องปฏิบัติการสู่โรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ให้คำแนะนำและแนวทางในการเปิดบริการ พร้อมสนับสนุนตัวอย่างทดสอบความชำนาญและระบบคุณภาพสำหรับห้องปฏิบัติการ[11]

การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการที่ใช้เทคนิค real-time PCR เป็นพื้นฐานของงานด้านอณูชีวโมเลกุลที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้หากไม่มีระบบจัดการที่ดี จากการดำเนินงานด้านแผนการบริหารความเสี่ยงและประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพห้องปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 จากตารางที่ 1 พบว่าปัจจัยเสี่ยงจากการเตรียมน้ำยาไม่ถูกต้องและโอกาสติดเชื้อจากการปฏิบัติงานเป็น 2 ปัจจัย ที่มีผลกระทบในระดับสูงและสูงมาก อย่างไรก็ตามมีโอกาสเกิดได้น้อยหากปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติงาน[11] ให้การฝึกอบรมบุคลากรมีผลประเมินผ่านเกณฑ์ก่อนการปฏิบัติงาน และดำเนินงานตามแนวทางการจัดการความเสี่ยง การออกแบบและสร้างห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้ถูกต้องเหมาะสมทั้งทางวิศวกรรม ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ และการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยเฉพาะเชื้ออุบัติใหม่ที่ต้องปฏิบัติงานให้ถูกต้องตามชนิดกลุ่มเสี่ยงของเชื้อโรค และถูกต้องตามหลักการอณูชีวโมเลกุลสิ่งสำคัญคือ การป้องกันการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งเกิดได้ทั้งจากการปนเปื้อนของตัวอย่างตรวจและโดยเฉพาะจากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (amplicon) ทำให้จำเป็นต้องแยกพื้นที่ก่อน PCR และหลัง PCR ออกจากกันให้ชัดเจน จัดให้มีอุปกรณ์ใช้ปฏิบัติงานเฉพาะในแต่ละพื้นที่ไม่ปะปนกัน การสวมใส่ชุด และอุปกรณ์ป้องกันร่างกาย การใช้ถุงมือยางแบบไร้แป้ง การใช้ filter tip เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อน การตรวจหาการปนเปื้อนทำโดยใช้ตัวอย่างควบคุมลบ ชนิด non-template control ควบคู่ไปทุกครั้งกับการทำ PCR ของสิ่งส่งตรวจ โดยในหลอดปฏิกิริยาของตัวอย่างควบคุมลบชนิดนี้จะมีส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ทุกอย่างยกเว้น DNA template หรือสารพันธุกรรมที่สกัดมาจากสิ่งส่งตรวจ ดังนั้นถ้ามีการตรวจพบผลผลิตของ PCR จากตัวอย่างควบคุมลบ แสดงว่ามีการปนเปื้อนในปฏิกิริยาเกิดขึ้น ซึ่งอาจพบปัญหานี้ได้ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการได้รับตัวอย่างจำนวนมากและมีผลการตรวจที่ให้ผลบวกจำนวนมาก หากไม่มีความระมัดระวังในการเตรียมสิ่งส่งตรวจอาจเกิดการปนเปื้อนในระบบการปฏิบัติงานได้ ดังนั้นหลังการปฏิบัติงานควรทำความสะอาดอุปกรณ์และพื้นที่ปฏิบัติงานด้วย 70% alcohol หรือ bleach agent ทุกครั้ง

ระบบการปฏิบัติงานชนิดที่ใช้วิธีสกัดตัวอย่าง DNA หรือ RNA จากสิ่งส่งตรวจด้วยมือหรือเครื่องสกัดสารพันธุกรรมร่วมกับเครื่องอัตโนมัติในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบผล หรือระบบ semi-automation ควรแบ่งพื้นที่ปฏิบัติงานเป็น 3 ส่วน คือ เตรียมน้ำยา สกัดสารพันธุกรรม และตรวจวัดผลผลิต PCR ส่วนการใช้ระบบ fully automation เป็นการใช้เครื่องอัตโนมัติในการสกัดสารพันธุกรรม พร้อมเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบผล มีข้อดีเนื่องจากเป็นระบบปิด ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องแบ่งพื้นที่แยกเป็นส่วนต่าง ๆ เหมือนระบบ semi-automation ทำให้ประหยัดพื้นที่ แต่ลงทุนสูงในด้านค่าใช้จ่ายของเครื่องตรวจวิเคราะห์

จากประสบการณ์ในกรณีที่ปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจที่สงสัยเชื้ออุบัติใหม่ ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องผ่านการฝึกอบรมเรื่องวิธีปฏิบัติงานด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล การปฏิบัติงานตามหลักความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ BSL-2 แบบเสริมสมรรถนะสำหรับห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล เพื่อความปลอดภัย

ของผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อมภายนอก การจัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการเพื่อขอการรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เพื่อความมั่นใจในคุณภาพผลการตรวจ ตลอดจนการป้องกันและควบคุมการติดเชื้ออย่างมีมาตรฐาน

สรุป

การเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล เพื่อตรวจวินิจฉัยหาเชื้ออุบัติใหม่ในช่วงการระบาดใหญ่ของโรคโควิด 19 มีความสำคัญอย่างมาก จากประสบการณ์ตรวจวินิจฉัยเชื้อ MERS-CoV ในอดีต ทำให้หน่วยงานสามารถปฏิบัติงานได้รวดเร็วทันสถานการณ์ นำผลการตรวจไปใช้บริหารจัดการ ดูแลรักษาผู้ป่วย และเฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรคได้ทันเวลา บุคลากรมีความปลอดภัยและไม่ติดเชื้อจากการปฏิบัติงาน การเตรียมความพร้อมนี้สามารถขยายผลเพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขหรือรับมือกับโรคอุบัติใหม่ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 ในอนาคตได้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการของประเทศต้องเตรียมความพร้อมในทุกด้าน ทั้งบุคลากรและปัจจัยที่เกี่ยวข้องในห้องปฏิบัติการ สภาวะแวดล้อม ขั้นตอนการทำงาน และเครื่องมือ ตลอดจนพื้นที่ปฏิบัติงาน การออกแบบห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐานและปลอดภัย เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการดำเนินงานของหน่วยงานกระทรวงสาธารณสุขและภาคเอกชน จากผลความร่วมมือในการทำงานเป็นเครือข่าย ส่งผลให้บุคลากรทางห้องปฏิบัติการมีความพร้อมในการปฏิบัติงานและเพิ่มศักยภาพในการรักษา ควบคุม ป้องกันโรคอุบัติใหม่ที่เป็นปัญหาได้ทั้งในปัจจุบันและอนาคต สามารถตอบสนองต่อนโยบายรัฐบาลที่ประสงค์ให้บริการประชาชนได้อย่างทั่วถึงด้วยวิธี PCR ที่เป็นมาตรฐาน เพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค และคุณศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล ที่ได้ให้คำปรึกษาและตรวจสอบเนื้อหางานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ อาจารย์ศิริพรรณ วงศ์วานิช ที่ช่วยตรวจสอบข้อความและให้ข้อเสนอแนะในการส่งบทความเพื่อตีพิมพ์จากประสบการณ์ของผู้นิพนธ์ และขอขอบคุณ คุณอำภา ศรีอินแก้ว และคุณชไมพร ตามเดช เจ้าหน้าที่บริษัท โรช ไดแอกนอสติก ประเทศไทย ที่สนับสนุนข้อมูลด้านห้องปฏิบัติการ PCR

เอกสารอ้างอิง

1. แสงทอง จันทร์เฉิด. จะไม่รอให้เกิดพายุ กรมควบคุมโรคและภาคี ท่ามกลางวิกฤติโควิด 19 พ.ศ. 2562-2563 เล่ม 1. นนทบุรี: กองนวัตกรรมและวิจัย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
2. Wacharapluesadee S, Buathong R Iamsirithawon S, Chaifoo W, Ponpinit T, Ruchuisrasarod C, et al. Identification of a novel pathogen using family-wide PCR: initial confirmation of COVID-19 in Thailand. Front Public Health 2020; 8: 555013. (5 pages).
3. แสงทอง จันทร์เฉิด, ญาณี แสงสง่า, พรรณพร กะตะจิตต์. จะไม่รอให้เกิดพายุ กรมควบคุมโรคและภาคี ท่ามกลางวิกฤติโควิด 19 พ.ศ. 2562-2563 เล่ม 2. นนทบุรี: กองนวัตกรรมและวิจัย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายชื่อห้องปฏิบัติการเครือข่ายที่ผ่านการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจ SARS-CoV-2. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 18 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://service.dmsc.moph.go.th/labscovid19/thai
5. Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR primer: a laboratory manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995.
6. ทีมงาน Molecular Diagnostics บริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด. การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการ พี ซี อาร์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไทยพิมพ์; 2550.
7. รติกร กัณฑะพงศ์. การประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพ (Bio risk assessment). [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 18 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/64/EID/Webinar10.pdf.

8. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020 (WHO/COVID-19/laboratory/2020.4). Geneva: World Health Organization; 2020.
9. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. [online]. 2020; [cited 2020 Mar 9]; [7 screens]. Available from: URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf.
10. National Health Commission of People's Republic of China. Laboratory biosafety guide for the novel coronavirus. [online]. 2020; [cited 2023 Oct 27]; [4 screens]. Available from: URL: https://rs.yiigle.com/yufabiao/1179586.htm.
11. อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์, อธิวัฒน์ ปริมสิริคุณาวุฒิ, รติกร กัณฑะพงศ์, บรรณาธิการ. คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทางห้องปฏิบัติการ SARS-CoV-2. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2564.

Preparedness of Biomolecular Laboratories for Detecting Emerging Pathogens: Insights from the COVID-19 Pandemic Experiences at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

Sumonmal Uttayamakul
National Institute of Health, Department of Medical Science, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT In December 2019, the novel coronavirus or severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) was reported as the cause of then unidentified pneumonia (now known as COVID-19) in Wuhan City, Republic of China. Since then disease has spread to all other parts of the world. Laboratory nvestigation is very useful for diagnosing and monitoring patients, including information for disease control and prevention. The World Health Organization has recommended the nucleic acid amplification test for COVID-19 virus screening for patients under investigation. In addition, the Thai government requested cooperation from all provinces to implement the One Province One Laboratory policy. The laboratory preparedness for SARS-CoV-2 detection using the real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique had to be urgently set up to meet the laboratory standard workflow and safety arrangement in compliance with the biosafety level 2 enhanced practices for dangerous pathogens in risk group 3 during the global pandemic. In implementing a quality management for laboratory design, the spaces were divided and designated for pre-PCR activities including reagent preparation and nucleic extraction rooms, and specifically for genetic material measurement in amplification and detection rooms with the real-time PCR machine as well as result analyses in the post-PCR area. In conclusion, two systems of molecular platform were proposed: semi-automation and full automation. The experiences in PCR technique and laboratory safety management could be further applied to other biomolecular laboratories for detecting other emerging infectious pathogens classified in risk group 3.

Keywords: Biomolecular preparedness, Emerging pathogens, Novel coronavirus 2019