

การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบของวิธีตรวจไวรัสในอากาศ เพื่อสร้างวิธีต้นแบบในการตรวจสำหรับสถานพยาบาล

ประยูร ภูวรัตน์าวีวิธ¹, สุพิชชา พรหมฉิม², ขวัญชัย รัตนมณี¹, นินนาท ราชประดิษฐ์³,
สุรัตน์ วรรณเลิศสกุล⁴, วรรณพร วุฒิเอกอนันต์⁵, ชาคกริต หริมพานิช⁶, เจนยุทธ ศรีหิรัญ⁷, ยง ภู่วรรณ⁸

¹ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

²นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

⁴หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

⁵นักวิจัยอาวุโส ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา หน่วยวิจัยโรคเขตร้อนมหิดล-ออกฟอร์ด

⁶กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลเซนต์แมรี่ จังหวัดนครราชสีมา

⁷ภาควิชาศิลปะและการออกแบบ คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

⁸ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: 1) เพื่อทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบในเรื่องวิธีการตรวจไวรัสในอากาศในสถานพยาบาลจากหลักฐานเชิงประจักษ์ที่มีจากอดีตจนถึงปัจจุบัน และ 2) สร้างวิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป
วิธีวิจัย: การศึกษาสืบค้นฐานข้อมูลสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรทั่วโลก และสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องจากฐานข้อมูล ได้แก่ PubMed, Cochrane Central Register of Control Trials (CENTRAL), Google Scholar, ScienceDirect, Web of Science, CINALH, Open Grey, DART-Europe ThaiLIS, ThaiJO และ Thai Index Medicus ผลลัพธ์ที่สนใจ คือ วิธีการตรวจไวรัสในอากาศ **ผลการวิจัย:** ข้อมูลจากการทบทวนวรรณกรรมได้ถูกสังเคราะห์ให้เกิดประเด็นสำคัญและนำมาสร้างวิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป วิธีต้นแบบประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การเตรียมตัวอย่างไวรัสในอากาศ, 2) การเตรียม virus suspension, 3) การย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย fluorescence dye, 4) การล้าง fluorescence dye และ 5) การส่องภายใต้แสงเลเซอร์เพื่อติดตามการเรืองแสงของอนุภาคไวรัส **สรุป:** การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้วิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป ซึ่งต้องมีการทดสอบในห้องปฏิบัติการและการตรวจวัดในสถานพยาบาลจริงต่อไป
คำสำคัญ: การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ ไวรัสในอากาศ วิธีตรวจไวรัสในอากาศ สถานพยาบาลทั่วไป

Systematic Review of the Methodology for Airborne Virus Detection to Propose Prototype for Health Facilities

Prayuth Poowaruttanawit¹, Suphitcha Phromchim², Kwanchai Rattanamanee¹, Ninart Rachapradit³,
Surat Wannalerdsakun⁴, Vanaporn Wuthiekanun⁵, Shakrit Rimpanit⁶, Janyuth Srihirun⁷, Yong Poovorawan⁸

¹Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

²Undergraduate Pharmacy Student, Faculty of Pharmaceutical Science, Naresuan University

³Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering, Naresuan University

⁴Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Faculty of Medicines, Naresuan University

⁵Senior Scientist, Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit

⁶Division of Internal Medicine, St. Mary's Hospital, Nakhon Ratchasima

⁷Department of Fine and Applied Arts, Faculty of Architecture, Naresuan University

⁸Center of Specialization in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Abstract

Objective: 1) To systematically review the literature on the methods for airborne virus detection in health care facilities based on empirical evidences from the past to the present, and 2) to create a prototype for airborne virus detection for health facilities. **Methods:** The study searched worldwide databases on patents and petty patents, and searched related studies from databases, including PubMed, Cochrane Central Register of Control Trials (CENTRAL), Google Scholar, ScienceDirect, Web of Science, CINALH, Open Gray, DART-Europe ThaiLIS, ThaiJO and Thai Index Medicus. Outcome of interest was methods for airborne virus detection. **Results:** Information from literature review had been synthesized into essential issues for creating a prototype method for airborne virus detection for health facilities. The prototype consisted of 5 steps: 1) preparation of airborne virus sample, 2) preparation of virus suspension, 3) virus particle staining with fluorescence dye, 4) removal of fluorescence dye, and 5) examination under laser light for tracing the fluorescence of viral particles. **Conclusion:** This study provides a prototype method for detecting airborne viruses for health facilities. The prototype requires further testing in laboratory and actual health facilities.

Keywords: systematic review, airborne virus, airborne virus detection method, health facilities

บทนำ

ในปัจจุบัน มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) นำไปสู่การเกิดโรค corona virus disease (COVID-19) ในประชากรเป็นวงกว้าง และนำไปสู่การเกิดอาการแทรกซ้อนของระบบทางเดินหายใจและทำให้ประชากรหลายแสนคนต้องเสียชีวิต (1, 2) หลักฐานทางการแพทย์ในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า โรคนี้ระบาดจากคนสู่คนได้ทางละอองฝอยจากทางเดินหายใจ (2) ซึ่งขณะนี้ยังไม่เป็นที่สรุปชัดเจนว่า ละอองฝอยดังกล่าวอยู่ในลักษณะที่เป็น droplets หรือ aerosols ขนาดปานกลางถึงใหญ่ อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกตลอดจนหน่วยงานทางสาธารณสุขของประเทศต่าง ๆ ได้แนะนำให้ประชาชนต้องสวมใส่หน้ากากอนามัย หมั่นล้างมือให้สะอาดอยู่เสมอ และรักษาระยะห่างอย่างน้อยหนึ่งเมตรเพื่อป้องกันการสัมผัสและการแพร่กระจายของเชื้อ (1, 2)

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า การระบาดของเชื้อไวรัสเป็นวงกว้าง (super spread) จะเกิดในสถานที่ปิด เช่น โบสถ์ (กิจกรรมทางศาสนา) สถานบันเทิง สนามมวย และในโรงพยาบาล เช่น หอผู้ป่วย หอผู้ป่วยวิกฤติ (2) อีกประเด็นหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ ในปัจจุบันโรงพยาบาลโดยทั่วไปยังไม่มีมาตรการที่เป็นรูปธรรมในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในอากาศเพื่อนำไปกำหนดเป็นแผนปฏิบัติการในการทำความสะอาด กำจัด หรือควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ ทั้งนี้ วิธีการตรวจไวรัสในอากาศที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันนั้นทำได้ค่อนข้างยาก ด้วยเหตุผลที่สำคัญ คือ ต้องอาศัยทรัพยากรและวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อนและต้องตรวจยืนยันผลหลายขั้นตอน ยกตัวอย่างเช่น จะต้องมีการเก็บตัวอย่างอากาศที่สามารถเก็บตัวอย่างไวรัสได้ จะต้องสามารถตรวจ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อระบุการมีอยู่ของ ribonucleic acid (RNA) ที่จำเพาะของไวรัสนั้น ๆ ได้ นอกจากนี้ ยังต้องยืนยันชนิดและการมีชีวิตของเชื้อไวรัสด้วยวิธีการทำการเพาะเชื้อ (cell culture) อีกด้วย ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การตรวจไวรัสในอากาศแทบจะเป็นไปไม่ได้เลยในบริบทของสถานพยาบาลโดยทั่วไปของประเทศไทย

จากการทบทวนวรรณกรรมพบการวิจัยจำนวนหนึ่งที่ระบุว่า ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจไวรัสในอากาศหลากหลายรูปแบบ และแต่ละวิธีก็มีรายละเอียดของการ

ตรวจ ข้อดี ข้อจำกัด ที่แตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Agranovski และคณะ (3) ซึ่งใช้เครื่องมือ personal bioaerosol sampler combined with the PCR device ในการเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศ และการตรวจจำนวนไวรัสที่มีอยู่โดยใช้วิธีการ คือ 1) standard plaque assay (live microbe), minimal detection concentration และ 2) PCR method จากนั้นแสดงผลออกมาเป็นค่า minimal detection concentration ซึ่งขั้นตอนต่าง ๆ จะใช้ระยะเวลารวมในการตรวจไม่นาน หรือ งานวิจัยของ Takenaka และคณะ (4) ซึ่งเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศโดยหลักการ impaction method โดยให้อากาศไหลผ่าน nozzle (70 μ m) ไปยัง collection plate จากนั้น ปิดฉลากบนอนุภาคไวรัสด้วยสารเรืองแสง (fluorescence dyes; Hilite Fluore™647) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา antigen-antibody แล้วนำไปล้างสารเรืองแสงส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก และตรวจวัดอนุภาคไวรัสด้วย fluorescence detector ซึ่งใช้ระยะเวลารวมในการตรวจทุกขั้นตอนเพียง 10 นาที เท่านั้น

จากหลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ในปัจจุบันมีวิธีการและแนวคิดในการตรวจไวรัสในอากาศอย่างง่ายและรวดเร็วมากขึ้น ซึ่งอาจนำมาสร้างสรรคเป็นวิธีใหม่สำหรับประยุกต์ใช้ในสถานพยาบาลทั่วไปในบริบทของประเทศไทยได้ การวิจัยครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและนำข้อมูลต่าง ๆ มาสรุปเป็นวิธีการอย่างง่ายในการตรวจไวรัสในอากาศที่สามารถนำไปปรับใช้กับสถานพยาบาลในบริบทของประเทศไทยได้

วิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้มีรูปแบบเป็นการวิจัยและพัฒนาที่ใช้ระเบียบวิธีวิจัยแบบผสมผสาน (mixed methods) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบเพื่อรวบรวมวิธีการตรวจไวรัสในอากาศในสถานพยาบาลจากหลักฐานเชิงประจักษ์ที่ปรากฏอยู่ ณ ฐานข้อมูลต่าง ๆ จากอดีตจนถึงปัจจุบัน และ 2) สร้างวิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป

การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ

เกณฑ์คัดเข้าบทความวิจัย

เกณฑ์การคัดเข้าบทความวิจัยสู่การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ คือ 1) เป็นสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรเกี่ยวกับแนวคิด วิธีการ หรือเครื่องมือที่ใช้สำหรับ

การตรวจหาชนิด จำนวน การมีชีวิตอยู่ของไวรัสในอากาศ หรือ 2) เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา งานวิจัยเชิงทดลอง การศึกษาในหลอดทดลอง (*In vitro study*) โดยให้ความสนใจวิธีการ แนวทาง หรือผลการวิจัยที่กล่าวถึง หรือศึกษาเกี่ยวกับ “วิธีการตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาล ต่าง ๆ”

การสืบค้นและคัดเลือกงานวิจัย

ฐานข้อมูลที่ใช้ในการสืบค้นในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

1) ฐานข้อมูลสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรทั่วโลก ได้แก่ Department of Intellectual Property, Korea Intellectual Property Rights Information Service, Japan Patent Office, Intellectual Property Office of Singapore, Office of the Controller- General of Patents, Designs and Trademarks, Intellectual Property Australia, German Patent and Trade Mark Office, US Patent & Trademark Office, European Patent Office, State Intellectual Property Office, Patentscope, Espacenet, TotalPatent, Thomson Reuters และ Google Patent 2) ฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ระดับนานาชาติซึ่งครอบคลุมทั้งงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่และไม่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ได้แก่ PubMed, Cochrane Central Register of Control Trials (CENTRAL), Google Scholar, ScienceDirect, Web of science, CINALH, Open Grey และ DART-Europe และ 3) ฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ในประเทศไทยที่ใช้ในการสืบค้น ได้แก่ Thai Library Integrated System (ThaiLIS) และ Thai Journals Online (ThaiJo)

การสืบค้นใช้คำสำคัญ (key words) ในการค้นหา งานวิจัยและใช้ตรรกบูลีน ดังนี้ ("air sampling") AND ("virus"), ("airborne virus"), ("airborne virus") AND ("hospital"), ("analytical method") AND ("airborne virus"), ("detection") AND ("airborne virus"), ("method") AND ("airborne virus"), ("sampling") AND ("airborne virus"), ("sampler") AND ("airborne virus"), ("measuring") AND ("airborne virus"), ("sampling") AND ("air") AND ("virus"), ("virus") AND ("environment"), ("virus") AND ("environment AND ("sampling"), ("sampling") AND ("bioaerosol"), ("sampling") AND ("virus aerosol"), ("sampling") AND ("virus aerosol") AND ("healthcare setting"), ("Bioaerosol monitoring") AND ("healthcare setting"), ("rapid method") AND ("air") AND ("virus"),

("rapid") AND ("virus detection"), ("rapid") AND ("airborne virus"), ("Rapid detection") AND ("virus aerosol"), ("Rapid method") AND ("virus aerosol"), ("Rapid method") AND ("virus aerosol") AND ("healthcare setting"), ("Rapid detection") AND ("virus aerosol") AND ("healthcare setting") นอกจากนี้ ยังมีการใช้คำสำคัญที่เป็นภาษาไทย ได้แก่ “ไวรัสในอากาศ” “การตรวจไวรัสในอากาศ” “วิธีการวิเคราะห์ไวรัสในอากาศแบบเร็ว” “การตรวจและไวรัสในอากาศ” “การตรวจแบบเร็วและไวรัสในอากาศ” “วิธีการวิเคราะห์และไวรัสในอากาศ” “วิธีการวิเคราะห์แบบเร็วและไวรัสในอากาศ”

การสืบค้นครอบคลุมจนถึงวันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2563 ผู้วิจัยคัดเลือกงานวิจัยจากฐานข้อมูลทั้งหมด โดยตัดงานวิจัยที่ซ้ำซ้อนออกไปผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป คอมพิวเตอร์ จากนั้นคัดเลือกงานวิจัยที่มีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับ “การตรวจไวรัสในอากาศในสถานพยาบาล”

การประเมินคุณภาพงานวิจัย

ผู้วิจัยจำนวน 2 ท่าน ประเมินคุณภาพงานวิจัยตามแนวทางของ Cochrane อย่างเป็นอิสระต่อกัน ในกรณีที่มีความคิดเห็นแตกต่างกัน จะให้ผู้วิจัยท่านที่ 3 เข้ามาร่วมตัดสินใจ สำหรับงานวิจัยแบบ RCT (randomized controlled trial) ประเมินคุณภาพโดยใช้ Cochrane risk of bias version 2 (ROB-2) งานวิจัยแบบ non-RCT ประเมินคุณภาพโดยใช้ Risk of Bias in Non-Randomized Studies of Interventions (ROBINS-I) และประเมินอคติที่อาจเกิดขึ้นในงานวิจัยจากหลักการดังต่อไปนี้ 1) ไม่มีอคติจากการเลือกสถานที่ทำการวิจัย เช่น ไม่เลือกสถานที่ที่มีความเสี่ยงมากที่จะพบเชื้อไวรัสแน่นอนอยู่แล้ว 2) เครื่องมือเก็บอากาศมีความเหมาะสมตามหลักวิทยาศาสตร์ เช่น ใช้เครื่องมือที่ได้รับการรับรองมาตรฐานอุตสาหกรรม มีการกำหนดอัตราการดูดอากาศเข้าเครื่องมือเก็บอากาศที่ชัดเจน มีการกำหนดระยะเวลาการเก็บอากาศที่ชัดเจน มีการระบุสมรรถภาพการทำงานภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงต่าง ๆ อย่างชัดเจน เป็นต้น 3) ใช้วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสที่เหมาะสม เช่น ใช้วิธีวิเคราะห์ตามแนวทางที่กำหนดโดย World Health Organization (WHO), United States Environmental Protection Agency (US EPA) หรือ American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers guidance (ASHRAE) 4) ไม่มีอคติจากการรายงานผล และ 5) ต้องมีความสมบูรณ์ของข้อมูล

หรือระบุวิธีการจัดการในกรณีที่ข้อมูลขาดหายหรือไม่สมบูรณ์ ที่จะส่งผลต่อการแปลผลการศึกษาย่างเหมาะสม งานวิจัยที่ได้ผลประเมินว่า “อดีตทุกด้านมีความเสี่ยงต่ำ” จะผ่านเกณฑ์การประเมินคุณภาพงานวิจัย

หลังจากประเมินคุณภาพงานวิจัยแล้ว จึงรวบรวมผลการศึกษาและสรุปผลลัพธ์ลงในตารางเพื่อนำไปวิเคราะห์เชิงพรรณนา โดยผลลัพธ์ที่สนใจ คือ ชนิดของไวรัสที่ศึกษา บริเวณที่เก็บตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่าง วิธีตรวจปริมาณ RNA ของไวรัส และการตรวจการมีชีวิตของไวรัส ผลการศึกษาที่สำคัญ และข้อจำกัดต่าง ๆ ของการศึกษา

การสร้างวิธีต้นแบบ

ผู้วิจัยในสหสาขาวิชาชีพประกอบด้วยอายุรแพทย์ ด้านโรคติดเชื้อ อายุรแพทย์ วิศวกรผู้เชี่ยวชาญด้านระบบปรับอากาศ ผู้เชี่ยวชาญด้านการออกแบบผลิตภัณฑ์ นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา และอาจารย์เภสัชกรผู้มีความเชี่ยวชาญด้านเภสัชวิทยา ระดมสมองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการออกแบบและพัฒนาแนวคิดสำหรับวิธีการตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป การระดมสมองทำเพื่อตอบคำถามปลายเปิดจำนวน 3 ข้อ ได้แก่ 1) จะสามารถตรวจการมีอยู่ของไวรัสในอากาศได้อย่างไร 2) หากจะทำให้วิธีการตรวจดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับสถานพยาบาลทั่วไปจะต้องมีประเด็นที่ควรระวังอะไรบ้าง และ 3) ความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจไวรัสในอากาศในบริบทของการนำไปใช้กับสถานพยาบาลทั่วไปควรเป็นอย่างไร และยอมรับได้ ณ จุดใด ผู้วิจัยเปิดโอกาสให้สหสาขาวิชาชีพสามารถแสดงความคิดเห็นอย่างอิสระจนได้ข้อมูลที่อ้อมตัวและไม่มีประเด็นอื่น ๆ เพิ่มเติม จากนั้น จึงนำมาแยกแยะประเด็นต่าง ๆ และวิเคราะห์เชิงเนื้อหา หากยังคงมีประเด็นที่ขัดแย้งกัน ผู้วิจัยจะระดมสมองซ้ำอีกครั้งเพื่อหาข้อสรุปให้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่หากยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่ชัดเจนได้ ผู้วิจัยจะนำประเด็นทั้งหมดมาเป็นประเด็นที่ต้องพิจารณาในการคิดหาวิธีต้นแบบต่อไป

ผู้วิจัยรวบรวมประเด็นที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและผลการระดมสมอง และนำมาคิดหาวิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไปโดยใช้เทคนิคการคิดอย่างสร้างสรรค์ (systematic inventive thinking) ซึ่งประกอบด้วย 5 หลักการ ได้แก่

1) การแยกส่วน (division) ได้แก่ การแบ่งวิธีการทั้งหมดที่ค้นพบออกเป็นแต่ละขั้นตอนย่อย ๆ เพื่อสรุปว่าในการตรวจไวรัสในอากาศต้องประกอบด้วยขั้นตอนอะไรบ้าง

2) การลบออก (subtraction) ได้แก่ การตัดขั้นตอนที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายสูง และไม่จำเป็นในการตรวจสำหรับบริบทของสถานพยาบาลโดยทั่วไปออก

3) การเพิ่มจำนวน (multiplication) ได้แก่ การเพิ่มขั้นตอนใหม่ ที่สามารถนำไปปฏิบัติได้จริงในบริบทของสถานพยาบาลโดยทั่วไปได้ง่ายขึ้น และลดค่าใช้จ่ายที่อาจจะเกิดขึ้นจริงได้มากกว่าเข้าไปแทนที่ขั้นตอนเดิม

4) การรวมหน้าที่ (task unification) ได้แก่ การทบทวนขั้นตอนทั้งหมดและพิจารณาว่ามีขั้นตอนการปฏิบัติใดบ้าง ที่อาจนำมารวมกันหรือทำไปพร้อม ๆ กันได้ ทั้งนี้ เพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาในการปฏิบัติงานให้สั้นที่สุดเท่าที่จำเป็น

5) การเชื่อมโยงสิ่งต่าง ๆ เข้าด้วยกัน (attribute dependency) ได้แก่ การวิเคราะห์วิธีต้นแบบที่ได้้อย่างละเอียด โดยพิจารณาว่ายังมีขั้นตอนใดบ้างที่ต้องพึ่งพาทรัพยากรอื่น ๆ และพยายามออกแบบให้วิธีการทั้งหมดสามารถทำไปได้อย่างต่อเนื่องกันโดยใช้ข้อจำกัดของทรัพยากรเท่าที่มีอยู่ในสถานพยาบาลโดยทั่วไปในบริบทของประเทศไทยมาพิจารณา ซึ่งประกอบด้วย ทรัพยากรบุคคล เครื่องมือ เงินทุน ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง ระยะเวลาในการวิเคราะห์ผล การรายงานค่าแสดงผลลัพธ์ และความยากง่ายของวิธีต้นแบบในภาพรวมทั้งหมด ทั้งนี้ เพื่อให้ได้วิธีต้นแบบการตรวจไวรัสในอากาศที่มีความเป็นไปได้สูงที่สุดในการนำไปปฏิบัติจริง หลังจากนั้น นำวิธีต้นแบบที่ได้ไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลการสืบค้นสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรทั่วโลกว่ามีความซ้ำซ้อนกันหรือไม่ หากพบความซ้ำซ้อนใด ๆ จะนำประเด็นที่พบมาพิจารณาและปรับวิธีต้นแบบใหม่ ให้ยังคงมีความเป็นไปได้ในการนำไปปฏิบัติจริงและไม่มีความซ้ำซ้อนเกิดขึ้น

ผลการวิจัย

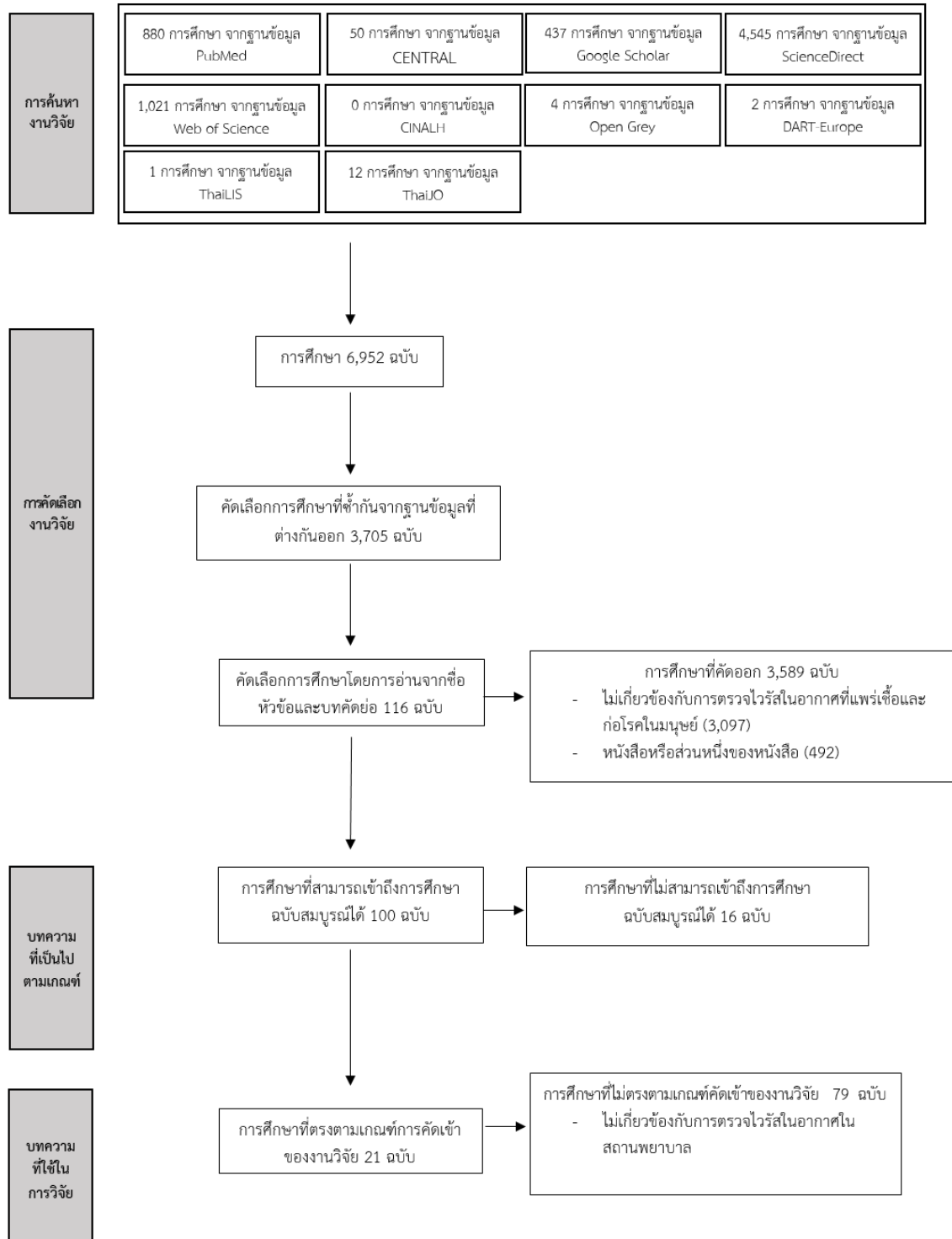
ผลการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ

ผลการสืบค้นพบงานวิจัยจำนวน 6,952 ฉบับ และเมื่อตัดงานวิจัยที่ซ้ำซ้อนออกพบว่าจำนวน 21 ฉบับ ที่ถูกคัดเข้าร่วมการศึกษา ประกอบด้วยงานวิจัยเชิงพรรณนาจำนวน 12 ฉบับ งานวิจัยเชิงทดลอง จำนวน 1 ฉบับ การศึกษาในหลอดทดลอง จำนวน 8 ฉบับ แสดงดังรูปที่ 1

ผลการประเมินคุณภาพงานวิจัย

งานวิจัยที่สืบค้นได้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) วิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบทั่วไป และ 2) วิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบรวดเร็ว เมื่อนำมาประเมินคุณภาพงานวิจัยตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้พบว่า อคติของงานวิจัยทั้งหมด “มีความเสี่ยงต่ำ” แสดงดังตารางที่ 1 และ 2

ผลการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบแสดงให้เห็นว่า จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีวิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ 1) แบบทั่วไป และ 2) แบบรวดเร็ว ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวมีความแตกต่างที่สำคัญ คือ ทรัพยากรที่ใช้ ความซับซ้อนของวิธีการตรวจ และความสามารถในการแสดงผล เป็นต้น ผู้อ่านสามารถศึกษา



รูปที่ 1. ผลการสืบค้นและการคัดเลือกรงานวิจัย

ตารางที่ 1. ผลการประเมินคุณภาพงานวิจัยวิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบทั่วไป¹

	เกณฑ์การประเมินคุณภาพงานวิจัย ²				
	1	2	3	4	5
Booth และคณะ ปี 2005 (5)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ไม่ชัดเจน
D'Arcy และคณะ ปี 2014 (6)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน
Verani และคณะ ปี 2014 (7)	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ไม่ชัดเจน
Bonifait และคณะ ปี 2015 (8)	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ
Nguyen และคณะ ปี 2016 (9)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Wan และคณะ ปี 2016 (10)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน
Pan และคณะ ปี 2017 (11)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Ryu และคณะ ปี 2018 (12)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ไม่ชัดเจน
Yadana และคณะ ปี 2019 (13)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน
Faridi และคณะ ปี 2020 (14)	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Ong และคณะ ปี 2020 (15)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน
Shiu และคณะ ปี 2020 (16)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ

1: ผลการประเมินภาพรวมเป็น “ความเสี่ยงต่ำ” เมื่อผลการประเมินในทุกเกณฑ์เป็น “ความเสี่ยงต่ำ” ผลการประเมินภาพรวมเป็น “ความเสี่ยงสูง” เมื่อผลการประเมินในเกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งเป็น “ความเสี่ยงสูง” ผลการประเมินภาพรวมเป็น “ไม่ชัดเจน” เมื่อผลการประเมินในเกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งเป็น “ไม่ชัดเจน” และไม่มีเกณฑ์ใดมีผลการประเมินเป็น “ความเสี่ยงสูง”

2: เกณฑ์ 1 คือ อคติจากการเลือกสถานที่ทำการวิจัย; เกณฑ์ 2 คือ อคติของความเหมาะสมของวิธีการเก็บตัวอย่างในอากาศ; เกณฑ์ 3 คือ อคติของวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสในอากาศ; เกณฑ์ 4 คือ อคติของการรายงานผลการศึกษา; เกณฑ์ 5 คือ อคติด้านความสมบูรณ์ของข้อมูลหรือระเบียบวิธีการจัดการในกรณีที่เกิด missing data หรือ incomplete data ที่จะส่งผลต่อผลการศึกษาอย่างเหมาะสม

รายละเอียดของวิธีทั้งสองในแต่ละการศึกษาในอดีตโดยสแกน QR code ที่แสดงในภาคผนวก ก

ประเด็นที่พบในวิธีตรวจไวรัสแบบทั่วไป

ในภาพรวมพบว่า วิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบทั่วไปเป็นวิธีที่ใช้ในงานวิจัยโดยทั่วไปและมีการนำไปใช้จริง ณ สถานพยาบาลต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม มีข้อสังเกตที่สำคัญคือ วิธีดังกล่าวต้องใช้อุปกรณ์หลายอย่างที่ราคาสูง และต้องใช้เทคนิคทางห้องปฏิบัติการขั้นสูงในการวิเคราะห์ แต่ผลลัพธ์ที่ได้ก็มีความน่าเชื่อถือสูงมากและสามารถนำไปใช้อ้างอิงในทางคลินิกได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

เครื่องมือเก็บอากาศ: เครื่องมือเก็บอากาศที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศมีหลากหลาย สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ solid impactor และ liquid impactor ซึ่งแสดงรายละเอียดในรูปที่ 2 solid impactor มีหลักการสำคัญของเครื่องมือ คือ การดูดอากาศผ่านแผ่นกรองเพื่อเก็บอนุภาคไวรัส อัตราเร็วลมดูดอากาศขึ้นกับแต่ละเครื่องมือส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 3–8 L/min ใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ 15 นาที–4 ชั่วโมง ยกตัวอย่างเช่น Closed-face, 3-piece disposable plastic cassette, SKC filters cassette เป็นต้น ภายในเครื่องมือเหล่านี้มีการบรรจุแผ่นกรอง

อนุภาคชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) teflon membrane filter ขนาด 0.2-0.3 μm (5, 9, 10, 13, 15) นอกจากนี้ ยังมีเครื่องมือเก็บอากาศชนิดอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) two-stage cyclone samplers ซึ่งมีองค์ประกอบทั้งหมด 3 ส่วน ดังนี้ 1) centrifuge tube ขนาด 15 mL (สำหรับเก็บอนุภาคขนาด $> 4 \mu\text{m}$) 2) tube ขนาด 1.5 mL (สำหรับเก็บอนุภาคขนาด 1-4 μm) 3) PTFE polymer membrane filter ขนาด 3.0 μm (สำหรับเก็บอนุภาคขนาด $< 1 \mu\text{m}$) (8, 13, 16), เครื่องมือเก็บอากาศ viable virus aerosol sampler (VIVAS) ภายในเครื่องมือมีการบรรจุแผ่นกรองอนุภาคชนิด Amicon Ultra-15 centrifugal filters units (11) และ เครื่องมือเก็บอากาศ Sartorius MD8 microbiological sampler ภายในเครื่องมือมีการบรรจุแผ่นกรองอนุภาคชนิด gelatin membrane filters (12, 15)

ส่วน liquid impactor มีหลักการสำคัญ คือ การดูดอากาศเข้าไปในเครื่องมือและเก็บอนุภาคไวรัสที่ของเหลวหรือบนพื้นผิวที่อยู่ภายในเครื่องมือ อัตราเร็วลมดูดอากาศขึ้นกับแต่ละเครื่องมือส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 8–30 L/min ใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ 1–10 ชั่วโมง ยกตัวอย่างเช่น SKC BioSampler (9, 11), high-resolution slit sampler

ตารางที่ 2. ผลการประเมินคุณภาพงานวิจัยวิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบรวดเร็ว¹

	เกณฑ์การประเมินคุณภาพงานวิจัย ²				
	1	2	3	4	5
Agranovski และคณะปี 2006 (3)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Takenaka และคณะปี 2012 (17)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Pyankov และคณะปี 2012 (18)	ไม่ชัดเจน	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ
Usachev และคณะปี 2013 (19)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ
Usachev และคณะปี 2014 (20)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ
Usachev และคณะปี 2015 (21)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ
Takenaka และคณะปี 2016 (4)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Ladhani และคณะปี 2017 (22)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ไม่ชัดเจน	ต่ำ
Yu และคณะปี 2018 (23)	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ

1: ผลการประเมินภาพรวมเป็น “ความเสี่ยงต่ำ” เมื่อผลการประเมินในทุกเกณฑ์เป็น “ความเสี่ยงต่ำ” ผลการประเมินภาพรวมเป็น “ความเสี่ยงสูง” เมื่อผลการประเมินในเกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งเป็น “ความเสี่ยงสูง” ผลการประเมินภาพรวมเป็น “ไม่ชัดเจน” เมื่อผลการประเมินในเกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งเป็น “ไม่ชัดเจน” และไม่มีเกณฑ์ใดมีผลการประเมินเป็น “ความเสี่ยงสูง”

2: เกณฑ์ 1 คือ อคติจากการเลือกสถานที่ทำการวิจัย; เกณฑ์ 2 คือ อคติของความเหมาะสมของวิธีการเก็บตัวอย่างในอากาศ; เกณฑ์ 3 คือ อคติของวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสในอากาศ; เกณฑ์ 4 คือ อคติของการรายงานผลการศึกษา; เกณฑ์ 5 คือ อคติด้านความสมบูรณ์ของข้อมูลหรือระเบียบวิธีการจัดการในกรณีที่เกิด missing data หรือ incomplete data ที่จะส่งผลต่อผลการศึกษาอย่างเหมาะสม

(5), Burkard C90M cyclone sampler (6) และ Impactor sampler (Micro flow, Aquaria, Italy) (7)

วิธีเก็บรักษาตัวอย่างไวรัสในอากาศก่อนส่ง

ตรวจ: ทุกการวิจัยระบุให้เก็บรักษาตัวอย่างไวรัสในอากาศใน culture media ที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสที่สงสัย ณ อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะส่งตรวจวิเคราะห์

วิธีตรวจปริมาณไวรัส: จากการทบทวน

วรรณกรรมพบว่า มีการใช้เทคนิค quantitative หรือ real time RT-PCR คิดเป็นร้อยละ 91.67 ของงานวิจัยที่นำมาทบทวนทั้งหมด โดยค่าแสดงผลลัพธ์ที่แสดงว่าพบเชื้อไวรัสคือ cycle threshold value (6, 12-16) ซึ่งมี cut point อยู่ระหว่าง 30-40 หรือ แสดงผลลัพธ์เป็นค่า genomes/ m^3 (8) นอกจากนี้ ยังมีวิธีการตรวจปริมาณไวรัสด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยค่าแสดงผลลัพธ์ว่าพบเชื้อไวรัส คือ การพบขีดสีแดงบนแผ่นทดสอบ (11)

วิธีตรวจการมีชีวิตของไวรัส: จากการทบทวน

วรรณกรรมพบว่า วิธีที่นิยมใช้ คือ การเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ (viral culture) ซึ่งจะทำให้การตรวจหลังจากพบเชื้อไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR อย่างไรก็ดี เชื้อไวรัสแต่ละชนิดจะใช้เซลล์เพาะเลี้ยงต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น Influenza A/B virus (RNA viruses) ใช้ Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells (9, 11, 13, 16), Adenovirus (DNA virus)

ใช้ adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (7, 9, 13), Norovirus (RNA viruses) ใช้ Inactivation of Murine Norovirus (MNV-1) และ macrophage RAW 264.7 cells (8), RSV-A (RNA viruses) ใช้ A549, Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells (LLC-MK2), และ Vero cells (11) โดยค่าที่แสดงผลว่าพบเชื้อไวรัส คือ การเกิดปฏิกิริยา cytopathic effect (CPE) (11, 13, 16) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไปจากเดิมภายหลังการติดเชื้อ นอกจากนี้ มีการแสดงผลลัพธ์เป็นค่า infectivity (%) (7, 8) หรือ viable virus (9)

ผู้อ่านสามารถเข้าถึงรายละเอียดของงานวิจัยเกี่ยวกับวิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบทั่วไปจาก QR code ที่แสดงในภาคผนวก ก

ประเด็นที่พบในวิธีตรวจไวรัสแบบเร็ว

ในภาพรวมพบว่า วิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบเร็วเป็นแนวคิดใหม่ที่อยู่ระหว่างการพัฒนาหรือใช้ในงานวิจัยแบบเฉพาะ และยังไม่ถูกแนะนำให้ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน โดยมีรายละเอียดดังนี้

เครื่องมือเก็บอากาศ: จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีเครื่องมือเก็บอากาศเป็นจำนวนมาก และมีหลักการที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ดี พบจุดร่วมที่สำคัญ คือ ใช้หลักการดูดอากาศเข้ามายังเครื่องมือ

และมีกระบวนการที่สามารถแสดงผลการปรากฏอยู่ของเชื้อไวรัสซึ่งจะแสดงผลได้อย่างรวดเร็ว

1. sensing system for biological aerosol particles (SSBAP) with a disposable device (4) และ The mist-labeling (17) หลักการของเครื่องมือ คือ เก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศโดยการดูดอากาศเข้ามาในเครื่องมือ จากนั้นติดฉลากอนุภาคไวรัสด้วยสารเรืองแสง (fluorescence dyes) และล้างสารเรืองแสงออกไป (4, 17)

2. electrostatic precipitation (ESP) sampler หลักการของเครื่องมือ คือ การอาศัยความต่างศักย์ระหว่าง 2 electrodes ทำให้เกิดสนามไฟฟ้า โดยบริเวณที่เป็น high voltage จะสร้าง corona discharge ทำให้โมเลกุลไวรัสในอากาศที่มีประจุไฟฟ้าเคลื่อนที่เข้าไปยังบริเวณ liquid collector ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็น low voltage เพื่อเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศ (22)

3. surface plasmon resonance (SPR) based real time viral aerosol detection biosensor หลักการของเครื่องมือ คือ อาศัยการตรึง (immobilization) ของ anti-MS2 antibody หรือ anti-Influenza A virus antibody บน amine coupling kit แสดงผลการจับของ antibody บน biosensor (19-21)

4. personal bioaerosol sampler combined with PCR device หลักการของเครื่องมือ คือ การหา minimal detection concentration จากการเจือจาง virus suspension (3)

5. new personal sampling device หลักการของเครื่องมือ คือ การติดตามการรอดชีวิตของไวรัสภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อม เช่น อัตราเร็วในการหมุนของ rotating aerosol chamber การควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ (18)

6. batch adiabatic-expansion for size intensification by condensation (BASIC) หลักการของเครื่องมือ คือ การทำให้เกิด supersaturation ภายใน the expansion bag และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไวรัสด้วยเครื่องมือ optical particle counter (OPC) (23)

วิธีเก็บรักษาตัวอย่างไวรัสในอากาศก่อนส่งตรวจ: เก็บรักษาตัวอย่างไวรัสในอากาศ ใน culture media ที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสที่สงสัย ณ อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะส่งตรวจวิเคราะห์

วิธีตรวจปริมาณไวรัส: sensing system for

biological aerosol particles (SSBAP) with a disposable device (4) และ mist-labeling (17) ตรวจปริมาณไวรัสด้วย fluorescence detector ที่ความยาวคลื่น 650 nm เพื่อดูการเรืองสีแดงของไวรัส ค่าแสดงผลลัพธ์ คือ detection rate (%) ข้อดีของเครื่องมือนี้ คือ เป็นระบบอัตโนมัติที่สามารถใช้งานได้ง่ายและใช้เวลาในการตรวจวัดน้อย (ประมาณ 5 นาที) (4, 17)

1. electrostatic precipitation (ESP) sampler ตรวจปริมาณไวรัสนำไปวิเคราะห์ปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ค่าแสดงผลลัพธ์ คือ $\log_{10}$ copies/ml ข้อดีของเครื่องมือนี้คือ ลดระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศ ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (22)

2. surface Plasmon Resonance (SPR) based real time viral aerosol detection Biosensor ตรวจวัดปริมาณไวรัสโดยแสดงผลการจับของ antibody บน biosensor ค่าแสดงผลลัพธ์ คือ Response unit (RU) ข้อดีของเครื่องมือนี้คือ ลดระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัส (19-21)

3. personal bioaerosol sampler combined with the PCR device ตรวจปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR หรือ standard plaque assay ค่าแสดงผลลัพธ์ คือ PFU m^3 ข้อดีของเครื่องมือนี้คือ ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสในอากาศโดยการคำนวณค่า minimal detection concentration (3)

4. new personal sampling device ตรวจปริมาณไวรัสโดยค่าแสดงผลลัพธ์ คือ จำนวนไวรัสที่มีชีวิต (live viral particles), % ข้อดีของเครื่องมือนี้ คือ เป็นการตรวจปริมาณไวรัสทางอ้อมจากการศึกษาความทนทานของอนุภาคไวรัส (18)

5. batch adiabatic-expansion for size intensification by condensation (BASIC) ตรวจปริมาณไวรัสด้วยเครื่องมือ optical particle counter (OPC) ค่าแสดงผลลัพธ์ คือ total number concentration, ($\#/\text{cm}^3$) และ count median diameter (CMD), μm และวิเคราะห์ปริมาณไวรัส virus plaque assay (VPA) ค่าแสดงผลลัพธ์ คือ MS2 Titer (PFU/L air) ข้อดีของเครื่องมือนี้ คือ เป็นวิธีที่ง่าย และใช้เครื่องมือเก็บอากาศที่มีราคาไม่แพง (23)

วิธีตรวจการมีชีวิตของไวรัส: จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าใช้การทำ virus plaque assay (VPA) มี

ค่าแสดงผลพลัฟฟ์ คือ Titer (PFU/L air) (23) การทำ standard plaque assay (live microbe) มีค่าแสดงผลพลัฟฟ์ คือ PFU/m³ (3) และ การหาจำนวนไวรัสที่มีชีวิต (live viral particles) มีค่าแสดงผลพลัฟฟ์ แสดงเป็นร้อยละ โดยคำนวณจากสูตร I (ร้อยละ) = $\frac{(FFU/FU)_t}{(FFU/FU)_{t=0}} \times 100\%$ โดย I (ร้อยละ) คือ ร้อยละของจำนวนไวรัสที่มีชีวิต FFU คือ Focus Foaming Units, FU คือ Fluorescence unit (18)

ผู้อ่านสามารถเข้าถึงรายละเอียดของงานวิจัยเกี่ยวกับวิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบเร็วจาก QR code ที่แสดงในภาคผนวก ก

วิธีต้นแบบสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป

จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบพบประเด็นสำคัญที่สามารถนำไปสร้างแนวคิดวิธีการตรวจไวรัสในอากาศอย่างง่ายในสถานพยาบาลโดยทั่วไป ประกอบด้วย 1) เครื่องมือเก็บอากาศที่สามารถใช้ได้จริงในสถานพยาบาลตั้งแต่ระดับปฐมภูมิขึ้นไป 2) เครื่องมือเก็บตัวอย่างอากาศที่มีราคาไม่แพง หรือสามารถประยุกต์ใช้อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการได้ 3) การเก็บตัวอย่างอากาศที่ใช้ระยะเวลาสั้น และ 4) การตรวจหาปริมาณไวรัสที่ใช้ระยะเวลาสั้น โดยอาจไม่จำเป็นต้องระบุปริมาณหรือชนิดของไวรัส เพียงแต่ระบุการปรากฏอยู่ของไวรัสได้

จากนั้นผู้วิจัยนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เชิงพรรณนาและสรุปจนได้วิธีต้นแบบในการตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป (รูปที่ 2) ดังนี้

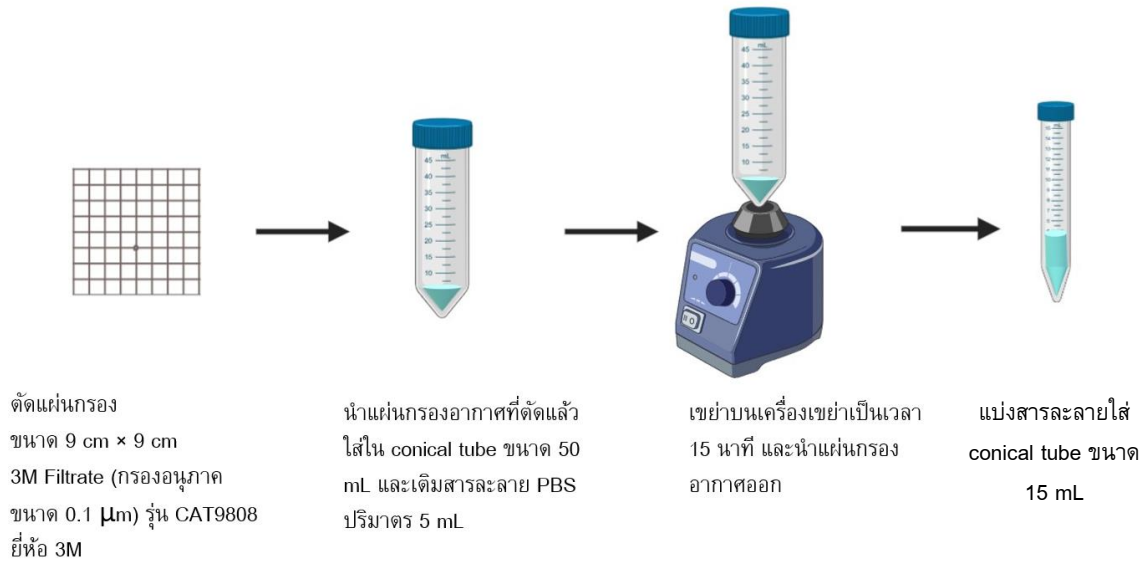
1. การเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศ โดยอาจประยุกต์ใช้ commercial instrument ที่มีจำหน่ายทั่วไป หรือเก็บตัวอย่างโดยตรงจากเครื่องปรับอากาศ โดยใช้แผ่นกรองอนุภาคขนาด 1 µM เป็นตัวดักจับเชื้อไวรัส
2. การเตรียม virus suspension
3. การย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย fluorescence dye
4. การล้าง fluorescence dye
5. การส่องภายใต้แสงเลเซอร์เพื่อติดตามการเรืองแสงของอนุภาคไวรัส

วิธีการดังกล่าวได้มาจากการรวบรวมจุดเด่นของวิธีการตรวจไวรัสในอากาศต่าง ๆ ที่ได้มาจากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ เช่น แนวคิดของ Takenaka และคณะ ปี 2012 (17) และ Takenaka และคณะ ปี 2016 (4) โดยมีหลักการ คือ การเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศและ

ย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย fluorescence dye จากนั้นทำการล้างสี และตรวจวัดการเรืองแสงด้วย fluorescence detector ซึ่งพบว่าอาจช่วยให้สามารถลดระยะเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ตัวอย่างไวรัสได้อย่างมาก การย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย fluorescence dye อาจเป็นแนวทางที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการของแต่ละโรงพยาบาลได้ ส่วนการตรวจวัดอนุภาคไวรัส คณะผู้วิจัยพบว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้หลักการดูการเรืองแสงของอนุภาคไวรัสด้วยตาเปล่าภายใต้แสงเลเซอร์ ซึ่งผู้วิจัยประยุกต์ใช้หลักการจากเครื่องมือ flow cytometry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดยอาศัยหลักการกระเจิงของแสงเลเซอร์เมื่อตกกระทบเซลล์หรือโมเลกุลของสารเรืองแสงที่ติดกับสารภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะแขวนลอยอยู่ในสารละลายและเครื่องมือจะผลักให้เซลล์ไหลผ่านท่อขนาดเล็กที่ละเซลล์ เมื่อแสงตกกระทบกับฉากรจะเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า จากนั้นเกิดการส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังคอมพิวเตอร์ประมวลผลแสดงเป็นรูปร่างของเซลล์ (24) งานวิจัยครั้งนี้เสนอให้ประยุกต์ใช้แนวทางการเตรียมตัวอย่างไวรัสจากแผ่นกรองอากาศของ Goyal และคณะ ปี 2011 (25) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย มีต้นทุนต่ำ และสามารถเตรียมตัวอย่างไวรัสได้อย่างรวดเร็ว และประยุกต์ใช้เทคนิคการย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วยวิธี PKH67 fluorescent cell linker kits for general cell membrane labeling (26) เนื่องจากมีรายละเอียดของหลักการซึ่งระบุวิธีทำที่ชัดเจนและสามารถดำเนินการทดลองโดยใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่มีอยู่ในสถานพยาบาลโดยทั่วไปได้ และตรวจอนุภาคไวรัสโดยการฉายแสงเลเซอร์และดูการเรืองแสง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและเครื่องฉายแสงเลเซอร์ที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดในปัจจุบันก็มีราคาถูกลงมาก ขั้นตอนการปฏิบัติแสดงดังภาคผนวก ข

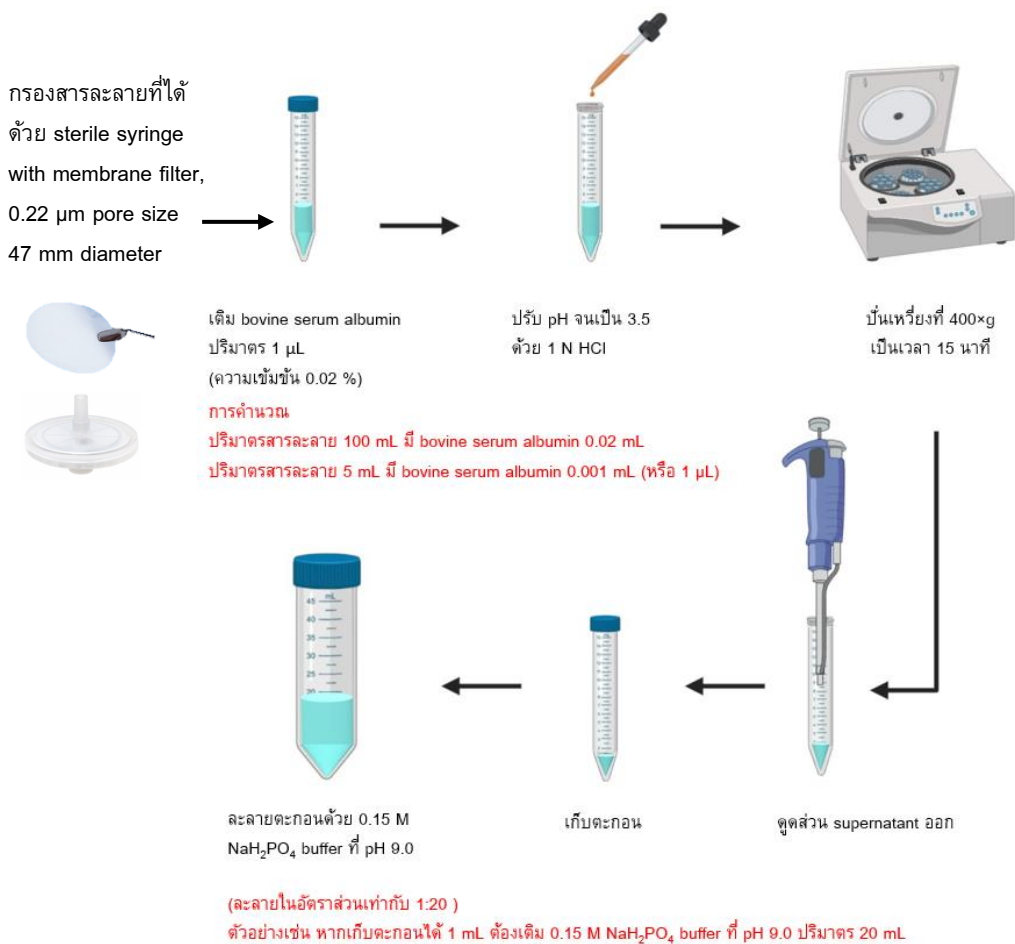
สรุปและการอภิปรายผล

จากอดีตจนถึงปัจจุบัน มีแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวกับการตรวจไวรัสในอากาศเป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่มีการใดที่สามารถนำมาสู่การปฏิบัติจริงได้ในสถานพยาบาลทั่วไป จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีหลายปัจจัยที่เป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ในสถานการณ์จริง เช่น ต้องใช้ทรัพยากรที่มีราคาสูงมาก (คน เงิน เครื่องมือ สถานที่ทำการวิจัยที่มีมาตรฐาน) ต้องใช้ความเชี่ยวชาญ



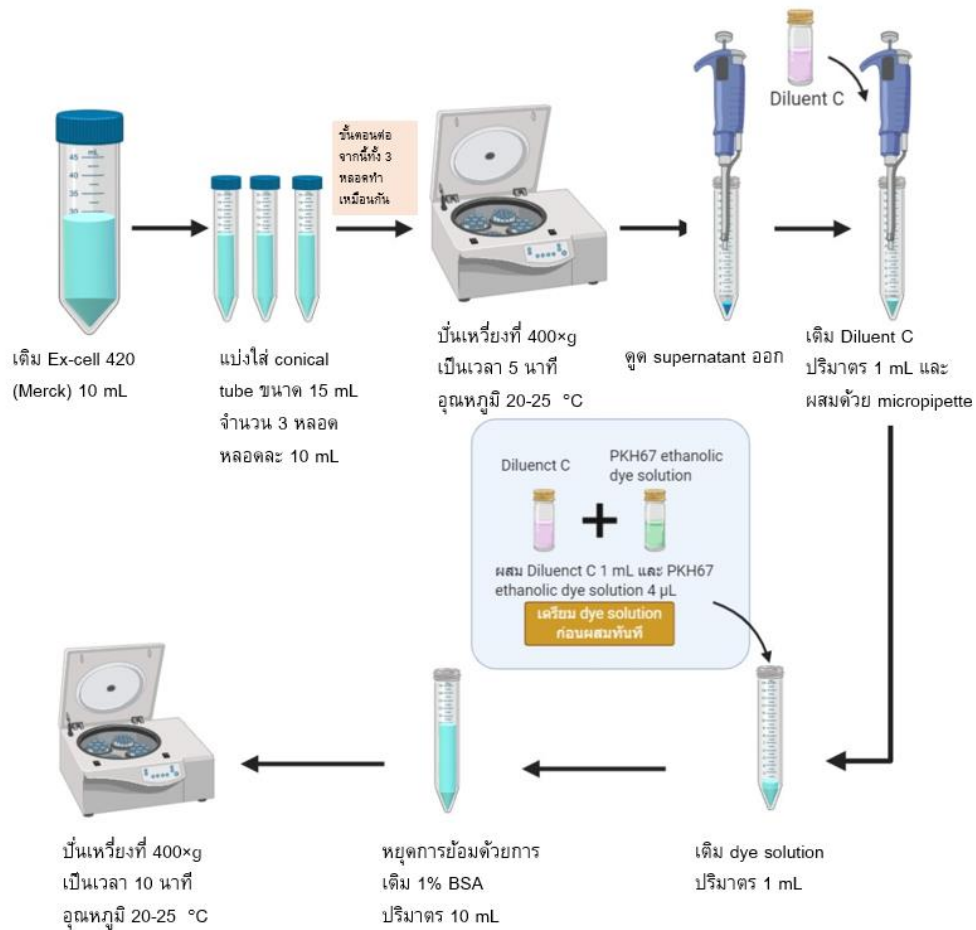
ก. การเก็บตัวอย่างไวรัสในอากาศ

หมายเหตุ “ปริมาตรของอากาศที่ใช้เก็บตัวอย่าง” จะต้องถูกคำนวณหรือพิจารณาตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษา เช่น จะเก็บอากาศกี่ลูกบาศก์เมตรต่อหน่วยเวลา หรือ จะใช้
เป็น air changes per time (ซึ่งจะต้องเก็บตรงตำแหน่ง return air) เพื่อเวลาคำนวณกลับในขั้นตอนสุดท้ายในกรณีที่มีการทำ viral culture จะได้มีความหมายทาง
คลินิกหรือสะดวกในการแปลผลการศึกษา เช่น พบปริมาณไวรัส A เท่ากับ XX ตัว ในปริมาตรอากาศ XX หน่วย เป็นต้น

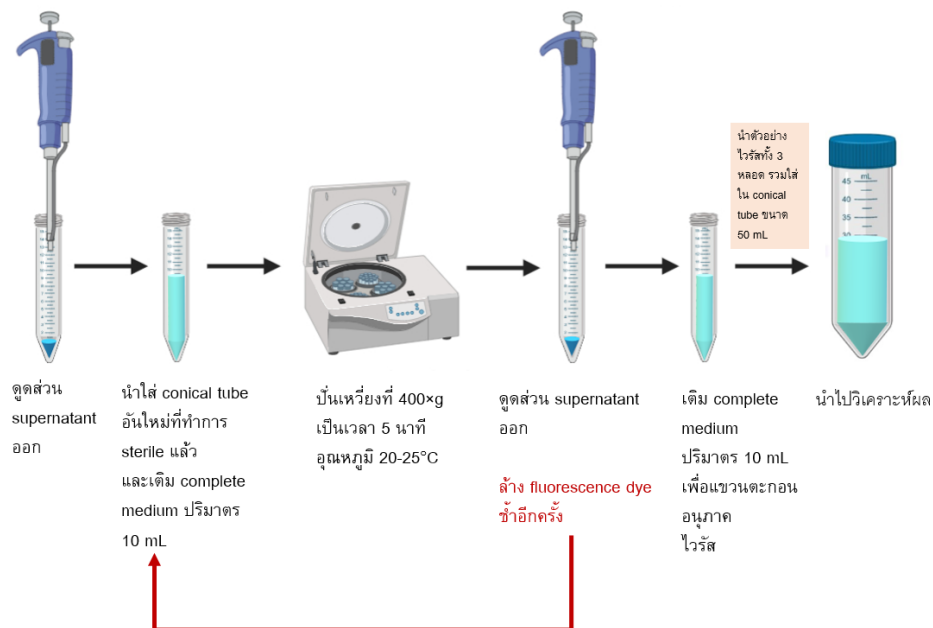


ข. การเตรียม virus suspension

รูปที่ 2. วิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป (25, 26)



ค. การย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย fluorescence dye



ง. การล้าง fluorescence dye

รูปที่ 2. วิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป (25, 26) (ต่อ)



ดูการเรืองแสงของอนุภาคไวรัสด้วยตาเปล่า
ภายใต้แสงเลเซอร์โดยทำในที่มืด

จ. การตรวจอนุภาคไวรัส (หมายเหตุ: หากพบการเรืองแสงในที่มืดจะหมายถึงการพบเชื้อไวรัสในตัวอย่าง)

รูปที่ 2. วิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป (25, 26) (ต่อ)

เฉพาะด้านเชิงลึกของบุคลากรที่ทำวิจัย และพบว่า มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในสิ่งแวดล้อม ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Irwin และคณะ (27) ที่พบว่า อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ เป็นปัจจัยที่สำคัญในการคงอยู่ของ influenza virus ในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไป โดยพบว่าอุณหภูมิในช่วง 17 ถึง $<22^{\circ}\text{C}$ และความชื้นสัมพัทธ์ 30 ถึง $<70\%$ เป็นปัจจัยที่ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของ influenza virus ในอากาศมีค่ายาวนานขึ้นเป็น 22 และ 13 ชั่วโมง ตามลำดับ ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับผลสำรวจช่วงอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของสถานพยาบาลโดยทั่วไปในประเทศไทย (28) หลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สถานพยาบาลในประเทศไทยมีความเสี่ยงพื้นฐานที่ส่งเสริมให้มีการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในอากาศได้นานมากขึ้น ดังนั้น หากไม่มีตัวชี้วัดใด ๆ เพื่อเตือนให้สถานพยาบาลทำความสะอาดหรือดำเนินการมาตรการใด ๆ เพื่อการกำจัดเชื้อไวรัสในอากาศ ก็อาจนำไปสู่การเกิดเหตุการณ์อันไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อผู้ป่วยหรือผู้เข้ารับบริการ หรือเกิดการแพร่กระจายจากสถานพยาบาลสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้

จุดเด่นของงานวิจัยนี้ คือ การรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูลสากล และส่วนใหญ่ผลงานที่นำมาศึกษาและวิเคราะห์มาจากผลงานวิจัยคุณภาพสูงและมีอคติโดยรวมต่ำ ทำให้ได้วิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไปในประเทศไทย ที่สร้างขึ้นจาก

หลักฐานเชิงประจักษ์จากอดีตจนถึงปัจจุบัน มีการประเมินคุณภาพของงานวิจัยที่นำเข้ามาวิเคราะห์และสรุปเป็นวิธีต้นแบบโดยกลุ่มสหสาขาวิชาชีพ

อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญของการวิจัยในครั้งนี้ คือ 1. งานวิจัยนี้ไม่มีการกล่าวถึง deoxyribonucleic acid ; DNA virus มากนัก ซึ่ง DNA virus จะใช้วิธีการตรวจโดยเทคนิค PCR 2. ยังไม่มีการทดสอบการนำไปใช้จริงของวิธีต้นแบบนี้ ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการและในสถานพยาบาลจริงต่อไป โดยจะต้องพิสูจน์ให้ได้ว่า ไวรัสที่ตรวจพบในขั้นตอนสุดท้าย มีชีวิตหรือไม่ เป็นไวรัสชนิดใด หรือ พบเฉพาะซาก DNA หรือ RNA ของไวรัสเท่านั้น และระบุเป็นค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจ เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษาจะต้องมีค่ามาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบหรือระบุความรุนแรงของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในอากาศ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Chia และคณะ ระบุว่าพบ Airborne SARS-CoV-2 concentrations ของผู้ป่วย อยู่ในช่วงระหว่าง $1,000-2,000 \text{ RNA copies m}^3 \text{ air}$ (29) ซึ่งหากทำ viral culture จากตัวอย่างแล้วพบว่า ได้ค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่าดังกล่าว จะถือว่าเกิดการปนเปื้อนของห้องเกิดขึ้นแล้ว 3. ประเด็นที่ยังไม่ได้พิจารณามากนักในการวิจัยนี้ คือ ในขั้นตอนการเก็บรักษาสารละลายตัวอย่าง การวิจัยต่าง ๆ ระบุว่าให้ใช้ viral หรือ universal media อะไร ทั้งนี้เนื่องจากชนิดของ media ปริมาตรที่ใช้ หรือ การเติม

สารประกอบบางอย่าง เช่น antibiotic เพิ่มลงไป จะส่งผลต่อการทำ viral culture (หากต้องการทำในอนาคต) 4. การวิจัยนี้คัดการวิจัยที่ไม่ได้ศึกษาในสถานพยาบาลออกไป ซึ่งการศึกษาดังกล่าวอาจมีประเด็นบางอย่างที่สามารถนำมาปรับหรือประยุกต์ใช้ได้ 3. วิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ยังไม่สามารถตรวจวัดการมีชีวิตของไวรัสได้ ข้อมูลที่ได้จึงเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพเท่านั้น อย่างไรก็ตาม หากต้องการทราบชนิดของไวรัสที่แน่นอนก็สามารถใช้วิธี VPA หรือ viral culture ตรวจสอบเพิ่มเติมได้ วิธีนี้ทำให้ได้ข้อมูลขั้นต้นว่ามีการปนเปื้อนของไวรัสอยู่ในอากาศของสถานที่ที่ตรวจหรือไม่ ดังนั้น จึงอาจสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อเตือนหน่วยงานที่เกี่ยวข้องหรือผู้ใช้สถานที่ ให้ต้องทำความสะอาดสถานที่ดังกล่าวด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป 4. fluorescence dye ที่ใช้ในการย้อมสีจะต้องใช้สีที่มีความเฉพาะเจาะจงอย่างมากกับชนิดของไวรัสที่ต้องการตรวจ ทั้งนี้ เพื่อให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบน่าจะเป็นชนิดใด ยกตัวอย่างเช่น หากต้องการตรวจ SARS-CoV-2 จะต้องใช้ F1-EU 010 fluorescent red, diameter (μm): 0.13-0.19, >300 -COOH (30), หากต้องการตรวจ influenza A จะต้องใช้ cyanine (Cy3, Amersham), Cy5 (Amersham), phycoerythrin (PE, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Gaithersburg, MD), allophycocyanin (APC, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) เป็นต้น (31) 5. การตรวจการเรืองแสงของอนุภาคไวรัสด้วยตาเปล่าอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติอาจมีภาพสีมาตรฐานของการเรืองแสงตามความยาวคลื่นต่าง ๆ เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับสีที่สังเกตได้จากหลอดทดลอง ทั้งนี้ เพื่อลดอคติจากการวัดและแปลผลของผู้ทดลองลงได้ และ 6. อุปสรรคที่อาจพบในการนำวิธีต้นแบบที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ไปปฏิบัติจริง คือ ความพร้อมของคน เครื่องมือ และงบประมาณที่จำเป็นต้องลงทุน ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นเรื่องของการบริหารงานและเงินทุนของโรงพยาบาล แต่หากคิดในแง่ความคุ้มค่าในระยะยาว ความปลอดภัยต่อผู้ป่วยและบุคลากรที่ปฏิบัติงาน และภาพลักษณ์ของโรงพยาบาล ก็ น่าจะมีความคุ้มค่าในการลงทุน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณการสนับสนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

- Centers for Disease Control and Prevention. How to protect yourself & others [online]. 2020 [cited Apr 5, 2020]. Available from: www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention-H.pdf.
- Kumar S, Jha S, Rai SK. Significance of super spreader events in COVID-19. *Indian J Public Health*. 2020 ;64:S139-S141.
- Agranovski IE, Safatov AS, Sergeev AA, Pyankov OV, Petrishchenko VA, Mikheev MV, et al. Rapid detection of airborne viruses by personal bioaerosol sampler combined with the PCR device. *Atmos Environ* 2006; 40: 3924-9.
- Takenaka K, Togashi S, Miyake R, Sakaguchi T, Hide M. Airborne virus detection by a sensing system using a disposable integrated impaction device. *J Breath Res* 2016; 10: 036009.
- Booth TF, Kournikakis B, Bastien N, Ho J, Kobasa D, Stadnyk L, et al. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *J Infect Dis*. 2005; 191: 1472-7.
- D'Arcy N, Cloutman-Green E, Klein N, Spratt DA. Environmental viral contamination in a pediatric hospital outpatient waiting area: implications for infection control. *Am J infection Control* 2014; 42: 856-60.
- Verani M, Bigazzi R, Carducci A. Viral contamination of aerosol and surfaces through toilet use in health care and other settings. *Am J infection Control* 2014; 42: 758-62.
- Bonifait L, Charlebois R, Vimont A, Turgeon N, Veillette M, Longtin Y, et al. Detection and quantification of airborne norovirus during out breaks in healthcare facilities. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 299-304.
- Nguyen TT, Poh MK, Low J, Kalimuddin S, Thoon KC, Ng WC, et al. Bioaerosol sampling in clinical settings: a promising, noninvasive approach for detecting respiratory viruses. *Open Forum Infect Dis* 2016; 4: ofw259-ofw.
- Wan GH, Huang CG, Chung FF, Lin TY, Tsao KC, Huang YC. Detection of common respiratory viruses

- and mycoplasma pneumoniae in patient-occupied rooms in pediatric wards. *Medicine*. 2016; 95: e3014.
11. Pan M, Bonny TS, Loeb J, Jiang X, Lednicky JA, Eiguren-Fernandez A, et al. Collection of viable aerosolized influenza virus and other respiratory viruses in a student health care center through water-based condensation growth. *mSphere*. 2017; 2: e00251-17.
 12. Ryu BH, Kim JY, Kim T, Kim MC, Kim MJ, Chong YP, et al. Extensive severe fever with thrombocytopenia syndrome virus contamination in surrounding environment in patient rooms. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 911.
 13. Yadana S, Coleman KK, Nguyen TT, Hansen-Estruch C, Kalimuddin S, Thoon KC, et al. Monitoring for airborne respiratory viruses in a general pediatric ward in Singapore. *J Public Health Res* 2019; 8: 1407.
 14. Faridi S, Niazi S, Sadeghi K, Naddafi K, Yavarian J, Shamsipour M, et al. A field indoor air measurement of SARS-CoV-2 in the patient rooms of the largest hospital in Iran. *Sci Total Environ* 2020; 725: 138401.
 15. Ong SWX, Tan YK, Chia PY, Lee TH, Ng OT, Wong MSY, et al. Air, surface environmental, and personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient. *JAMA*. 2020; 323: 1610-2.
 16. Shiu EYC, Huang W, Ye D, Xie Y, Mo J, Li Y, et al. Frequent recovery of influenza A but not influenza B virus RNA in aerosols in pediatric patient rooms [online]. 2020 [cited May 5, 2020]. Available from: onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ina.12669
 17. Takenaka K, Togashi S, Miyake R, editors. Rapid airborne virus detection using mist-labeling based on micro reaction process. [online] 2012 [cited Apr 5, 2020]. Available from: www.rsc.org/images/loc/2012/pdf/W.7.156.pdf
 18. Pyankov OV, Pyankova OG, Agranovski IE. Inactivation of airborne influenza virus in the ambient air. *J Aerosol Sci* 2012; 53: 21-8.
 19. Usachev EV, Usacheva OV, Agranovski IE. Surface plasmon resonance-based real-time bioaerosol detection. *J Appl Microbiol* 2013; 115: 766-73.
 20. Usachev EV, Tam AM, Usacheva OV, Agranovski IE. The sensitivity of surface plasmon resonance based viral aerosol detection. *J Aerosol Sci* 2014; 76: 39-47.
 21. Usachev EV, Agranovski E, Usacheva OV, Agranovski IE. Multiplexed surface plasmon resonance based real time viral aerosol detection. *J Aerosol Sci* 2015; 90: 136-43.
 22. Ladhani L, Pardon G, Meeuws H, van Wesenbeeck L, Schmidt K, Stuyver L, et al. Sampling and detection of airborne influenza virus towards point-of-care applications. *Plos One*. 2017; 12: e01743 14.
 23. Yu H, Afshar-Mohajer N, Theodore AD, Lednicky JA, Fan ZH, Wu CY. An efficient virus aerosol sampler enabled by adiabatic expansion. *J Aerosol Sci*. 2018; 117: 74-84.
 24. Moloney M, Shreffler WG. Basic science for the practicing physician: flow cytometry and cell sorting. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 544-9.
 25. Goyal SM, Anantharaman S, Ramakrishnan MA, Sajja S, Kim SW, Stanley NJ, et al. Detection of viruses in used ventilation filters from two large public buildings. *Am J Infect Control* 2011; 39: e30-8.
 26. Sigmaaldrich. Technical bulletin PKH67 [online] 2012 [cited Apr 5, 2020]. Available from: www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pkh67glbul.pdf.
 27. Irwin CK, Yoon KJ, Wang C, Hoff SJ, Zimmerman JJ, Denagamage T, et al. Using the systematic review methodology to evaluate factors that influence the persistence of influenza virus in environmental matrices. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77: 1049-1060. doi:10.1128/AEM.02733-09
 28. Sookchaiya T, Monyakul V, Thepa S. Assessment of the thermal environment effects on human comfort and health for the development of novel air conditioning system in tropical regions. *Energy Build* 2010; 42: 1692-702

29. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, Ong SWX, Gum M, Lau SK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. Nat Commun. 2020; 11: 2800.
30. Coronavirus COVID-19 (SARS-CoV-2) detection, characterization, vaccine and therapy production

[online]. 2020 [cited Apr 5, 2020]. Available from: www.sigmaaldrich.com/covid-19.html

31. Xie D. Fluorescent dye labeled influenza virus mainly infects innate immune cells and activated lymphocytes and can be used in cell-mediated immune response assay. J Immunol Methods. 2009; 343: 42-8.

ภาคผนวก ก

รายละเอียดของงานวิจัยเกี่ยวกับวิธีการตรวจไวรัส



ก1. วิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบทั่วไป (สามารถสแกนดูรายละเอียดได้จาก QR code)



ก2. วิธีการตรวจไวรัสในอากาศแบบรวดเร็ว (สามารถสแกนดูรายละเอียดได้จาก QR code)

ภาคผนวก ข

รายละเอียดของวิธีต้นแบบสำหรับตรวจไวรัสในอากาศสำหรับสถานพยาบาลทั่วไป

1. อุปกรณ์

- 1.1 แผ่นกรองอากาศ 3M Filtrete (กรองอนุภาคขนาด 0.1 μm) รุ่น CAT9808 ยี่ห้อ 3M (ปราศจากเชื้อ)
- 1.2 กรรไกร (ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ)
- 1.3 Conical tube ขนาด 15, 50 mL (ปราศจากเชื้อ)
- 1.4 Sterile syringe with MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.22 μm pore size
- 1.5 เครื่องเขย่าสาร
- 1.6 เครื่องให้ความร้อนและกวนสารละลาย
- 1.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง
- 1.8 ไมโครปิเปต และทิป (ปราศจากเชื้อ)
- 1.9 BLUE LASER at 450 nm รุ่น blue laser pointer 3026 007 303 Teaching Hunting ยี่ห้อ xin zhe shang mao (ตรวจสอบราคา ณ วันที่ 19 สิงหาคม พ.ศ. 2563 ราคา 40.5\$)

2. สารเคมี

- 2.1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (1X, ที่ pH 7.4)
- 2.2 Bovine serum albumin (BSA)
- 2.3 Monobasic sodium phosphate buffer (NaH_2PO_4) 0.15 M ที่ pH 9.0
- 2.4 Hydrochloric acid
- 2.5 Ex-cell 420 (Merck)
- 2.6 PKH67 ethanolic dye solution
- 2.7 Diluent C
- 2.8 Complete medium

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์การเรืองแสงของอนุภาคไวรัส

1. ติดตั้งแผ่นกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ณ ตำแหน่งใด ๆ ของห้องที่ต้องการตรวจ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับงบประมาณและวัตถุประสงค์ของการตรวจ เช่น บริเวณที่อากาศเข้าห้องหรือบริเวณที่อากาศตก บริเวณที่มีผู้ป่วยพักอาศัยหรือคาดว่าจะมีการปนเปื้อนสูง บริเวณที่อากาศไหลกลับหรือไหลออกจากห้อง หรือ ณ แผงกระจังหน้าของเครื่องปรับอากาศที่ต้องการตรวจสอบ เป็นต้น แต่ประเด็นที่สำคัญ คือ “ปริมาณของอากาศที่ใช้เก็บตัวอย่าง” จะต้องถูกคำนวณหรือพิจารณาตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษา เช่น จะเก็บอากาศกี่ลูกบาศก์เมตรต่อหน่วยเวลา หรือ จะใช้เป็น air changes per time (ซึ่งจะต้องเก็บตรงตำแหน่ง return air) เพื่อเวลาคำนวณกลับในขั้นตอนสุดท้ายในกรณีที่มีการทำ viral culture จะได้มีความหมายทางคลินิกหรือสะดวกในการแปลผลการศึกษา เช่น พบปริมาณไวรัส A เท่ากับ XX ตัว ในปริมาณอากาศ XX หน่วย เป็นต้น
2. ตัดแผ่นกรองอนุภาคให้ได้ขนาด 9 cm × 9 cm ด้วยกรรไกรที่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ
3. นำแผ่นกรองอากาศที่ตัดแล้ว ใส่ใน conical tube (ปราศจากเชื้อ) ขนาด 50 mL
4. เติมสารละลาย PBS (ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ) ปริมาตร 5 mL
5. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 15 นาที
6. นำแผ่นกรองอากาศออก
7. นำสารละลายใส่ใน conical tube (ปราศจากเชื้อ) ปริมาตร 15 mL (นำไปทำต่อในหัวข้อ 3.2)

3.2 การเตรียม virus suspension

1. กรองสารละลายด้วย MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.22 µm pore size
2. เติม bovine serum albumin ปริมาตร 1 µL (ความเข้มข้น 0.02%)

การคำนวณ

ปริมาตรสารละลาย 100 mL มี bovine serum albumin ปริมาตร 0.02 mL

ปริมาตรสารละลาย 5 mL มี bovine serum albumin ปริมาตร 0.001 mL (หรือ 1 µL)

3. ปรับ pH จนเป็น 3.5 ด้วย 1 N HCl
4. บั่นเหวี่ยงที่ 400 × g เป็นเวลา 15 นาที
5. ทิ้งส่วน supernatant และเก็บตะกอน
6. ละลายตะกอนด้วย 0.15 M NaH_2PO_4 buffer ที่ pH 9.0 (ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ) (อัตราส่วน = 1:20) ตัวอย่างเช่น หากเก็บตะกอนได้ปริมาตร 1 mL ต้องเติม 0.15 M NaH_2PO_4 buffer ที่ pH 9.0 ปริมาตร 20 mL

3.3 การย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย Fluorescence dye

1. นำ virus suspension จากข้อ 3.2 ล้างด้วย Ex-cell 420 (Merck) ปริมาตร 10 mL
2. แบ่งใส่ conical tube (ปราศจากเชื้อ) ขนาด 15 mL จำนวน 3 หลอด หลอดละ 10 mL
3. แต่ละหลอดทำขั้นตอนเดียวกันตั้งแต่ ข้อ 4-10
- 4.ปั่นเหวี่ยงที่ $400 \times g$ เป็นเวลา 5 นาทีอุณหภูมิ $20-25^{\circ}\text{C}$
5. ดูดส่วน supernatant ออก
6. เติม Diluent C ปริมาตร 1 mL ใช้ไมโครปิเปตผสมจนเข้ากัน
7. เตรียมสารละลาย Fluorescence dye ที่จำเพาะกับชนิดของไวรัสที่ต้องการตรวจ (เตรียมก่อนผสมลงในตัวอย่างไวรัสข้อ 6 ทันที) โดยผสมในปริมาตร $4 \mu\text{L}$ และ Diluent C ปริมาตร 1 mL
8. นำตัวอย่างไวรัสข้อ 6 ผสมกับสารละลาย Fluorescence dye ปริมาตร 1 mL ข้อ 7
9. หยุดการย้อมด้วยการเติม 1% BSA ปริมาตร 10 mL
10. ปั่นเหวี่ยงที่ $400 \times g$ เป็นเวลา 10 นาทีอุณหภูมิ $20-25^{\circ}\text{C}$

3.4 การล้าง Fluorescence dye

1. ดูดส่วน supernatant ออก
2. นำใส่ conical tube (ปราศจากเชื้อ)
3. เติม complete medium ปริมาตร 10 mL
4. ปั่นเหวี่ยงที่ $400 \times g$ เป็นเวลา 5 นาทีที่ $20 - 25^{\circ}\text{C}$
5. ดูดส่วน supernatant ออก
6. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 2-5 อีกครั้ง
7. นำใส่ conical tube อันใหม่ (ปราศจากเชื้อ) เติม complete medium ปริมาตร 10 mL เพื่อแขวนตะกอนอนุภาคไวรัส
8. นำตัวอย่างไวรัสทั้ง 3 หลอด รวมใส่ใน conical tube (ปราศจากเชื้อ) ขนาด 50 mL
9. นำไปวิเคราะห์ผล

3.5 การตรวจอนุภาคไวรัส

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.4 ไปส่องภายใต้แสงเลเซอร์ ตรวจวัดโดยใช้ BLUE LASER at 450 nm เพื่อดูการเรืองแสงของอนุภาคไวรัสด้วยตาเปล่าภายใต้แสงเลเซอร์ หากพบการเรืองแสงจะแสดงว่า มีไวรัสในตัวอย่าง