

Innovation

ประสิทธิภาพของตู้ฉายแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัส
ที่ปนเปื้อนหน้ากากอนามัยที่นำกลับมาใช้ซ้ำยิ่งฤทธิ์ จันทรสข¹, สายธาร ปะปาลี¹, วิเศษ นามวาท¹, สุปราณี พันธุ์ธนวิบูลย์^{1,2}¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น² ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (RCEID)ผู้รับผิดชอบบทความ : ยิ่งฤทธิ์ จันทรสข ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002, email:cyingr@kku.ac.th

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: การระบาดของเชื้อไวรัสอุบัติใหม่โควิด-19 ที่มีผลต่อทุกประเทศทั่วโลก ทำให้นักกากอนามัยซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้งานที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างฉับพลัน โดยเฉพาะในกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์ซึ่งมีความเสี่ยงในการติดเชื้อสูงจากการปฏิบัติงาน การนำหน้ากากอนามัยมาใช้ซ้ำหลังทำการทำลายเชื้อแล้วเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการบรรเทาปัญหาความขาดแคลนนี้ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของตู้ฉายแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนบนหน้ากากอนามัยเพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างปลอดภัย

วิธีการศึกษา: เชื้อที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาคือไวรัสเดงกี (Dengue virus) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม เช่นเดียวกับกับ SAR CoV2 ที่ก่อโรคโควิด-19 (COVID-19) เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ COVID-19 ได้ ไวรัสตัวแทนที่ทราบความเข้มข้นจะถูกนำมาป้ายลงบนพื้นผิวหน้ากากอนามัยที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง และนำไปเข้าเครื่องฉายแสงยูวีซีที่ช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากนั้นจะนำเชื้อที่เหลือมาตรวจหาความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี focus forming assay และตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่เหลืออยู่ ด้วยวิธี RT-PCR เพื่อดูว่าการฉายด้วยแสงยูวีซีสามารถทำลายความสามารถในการติดเชื้อและทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อได้ที่ระยะเวลาเท่าใด

ผลการศึกษา: พบว่าการใช้แสงยูวีซีในตู้ต้นแบบขนาด $0.42 \times 0.68 \times 0.95$ ลูกบาศก์เมตร ที่มีปริมาณความเข้มของแสงยูวีภายในตู้ระหว่าง $0.198 - 0.656 \text{ mW/cm}^2$ มีความสามารถในการทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อของไวรัสและทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ภายในระยะเวลา 10 นาที

สรุป: การใช้แสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัสนั้นเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและใช้เวลาไม่นาน สามารถนำไปใช้ในการทำลายความสามารถในการติดเชื้อรวมถึงสารพันธุกรรมของเชื้อบนหน้ากากอนามัยที่ใช้แล้วเพื่อให้นำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างมั่นใจและมีความปลอดภัย

คำสำคัญ: โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019, หน้ากากอนามัยชนิดใช้แล้วทิ้ง, แสงยูวีซี

บทนำ

จากสถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โควิด-19; COVID-19) ที่เกิดขึ้นกว่า 215 ประเทศทั่วโลก ทำให้ความต้องการใช้หน้ากากอนามัยชนิดใช้แล้วทิ้ง (disposable surgical mask) เพิ่มขึ้นมาก ทั้งในประชาชนทั่วไป และกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์ที่จำเป็นต้องใช้หน้ากากอนามัยเป็นอุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (personal protective equipment; PPE) ในการคัดกรองหาผู้ติดเชื้อและในการดูแลรักษาผู้ป่วย จนทำให้เกิดการขาดแคลนภายในประเทศ เนื่องจากผลิตและจัดหาได้ไม่ทันต่อความต้องการใช้ ดังนั้น การนำหน้ากากอนามัยมาใช้ซ้ำ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาสถานการณ์วิกฤตินี้ ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) ได้แนะนำแนวทางปฏิบัติในการจัดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสบนหน้ากากกรองอากาศชนิดใช้แล้วทิ้ง (disposable filtering facepiece respirators; FFRs) เพื่อนำกลับมาซ้ำด้วย 3 วิธีการ ได้แก่ การใช้ความร้อนชื้น (moist heat) การฉายรังสียูวี (Ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) และการอบด้วยไอระเหยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (vaporous hydrogen peroxide ; VHP) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดี สามารถทำซ้ำได้หลายครั้ง โดยไม่ทำให้คุณสมบัติในการกรองเชื้อโรคของหน้ากากเสียไป¹ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวิธีการทำลายเชื้อที่ปนเปื้อนบนหน้ากากกรองอากาศชนิดต่าง ๆ ที่พบว่า การฉายแสงยูวี (UVGI) การอบด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide; EtO) การอบด้วยไอระเหยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (VHP) ในระดับที่เหมาะสม เป็นวิธีที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติในการกรองของหน้ากากกรองอากาศชนิดต่าง ๆ^{2,3} อย่างไรก็ตาม การใช้ความร้อนชื้น และการอบด้วยไอระเหยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน จึงอาจไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในหน่วยงานที่ดูแลรักษาผู้ป่วย ในขณะที่การใช้แสงยูวีซีเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้เวลาในการทำลายเชื้อไม่นาน จากการศึกษาพบว่า การใช้รังสีปริมาณ 1 - 1.8 J/cm² มีประสิทธิภาพในทำลายเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ (H1N1 Influenza A virus) โดยสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้อย่างน้อย 10³ เท่า ภายในเวลา 1 นาที⁴ และลดลง 10⁴ - 10⁵ เท่าภายในเวลา 15 นาที⁵ และจากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข แนะนำให้ฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนหน้ากากกรองอากาศชนิด N95 ด้วยการฉายแสงยูวีบนพื้นผิวหน้ากากทั้งสองด้านด้วยปริมาณรังสีไม่น้อยกว่า 0.5 J/cm² เพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำได้⁶ ดังนั้นจึงนับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดี

และสะดวกในการใช้งาน ด้วยแนวคิดนี้ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จึงได้พัฒนาตู้ฉายแสงยูวีสำหรับทำลายเชื้อบนหน้ากากอนามัยทั้งด้านในและด้านนอกของหน้ากากในเวลาเดียวกัน เพื่อให้หน้ากากกลับมาใช้ซ้ำได้ในระยะเวลาดังนั้น และเนื่องจากยังไม่มีรายงานถึงประสิทธิภาพของแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อบนหน้ากากอนามัยชนิดใช้แล้วทิ้ง คณะผู้ศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการประเมินประสิทธิภาพของตู้ฉายแสงยูวีต้นแบบในการทำลายเชื้อไวรัสโดยการศึกษาเลือกใช้ไวรัสเดงกี (Dengue virus) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม เช่นเดียวกับเชื้อ SAR CoV2 ที่ก่อโรคโควิด-19 เป็นตัวแทน โดยทำการทดสอบคุณสมบัติในการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดวีโรเซลล์ซึ่งมีต้นกำเนิดจากไตของลิง (African green monkey) และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีที่ปนเปื้อนบนหน้ากากอนามัยซึ่งผ่านการฉายแสงยูวีซีแล้ว ณ เวลาต่าง ๆ ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อให้บุคลากรทางการแพทย์นำหน้ากากอนามัยมาใช้ซ้ำได้อย่างมั่นใจในความปลอดภัย

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของตู้ฉายแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนบนหน้ากากอนามัยเพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างปลอดภัย

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพของตู้ฉายแสงยูวีซีต้นแบบ ในการทำลายเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนบนหน้ากากอนามัย ที่ห้องปฏิบัติการบริการและวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 25 มีนาคม ถึง 5 เมษายน 2563 โดยทำการทดสอบคุณสมบัติในการติดเชื้อของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ลดลง รวมถึงการทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสภายหลังการสัมผัสแสงยูวีซีที่ช่วงเวลาที่ต่าง ๆ โดยมีวิธีการและอุปกรณ์ที่ใช้ ดังนี้

ตู้ฉายแสงยูวีซีต้นแบบ (UVC chamber)

เป็นตู้แบบเคลื่อนที่ได้ พัฒนาขึ้นโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วัสดุทำจากไม้ซึ่งสามารถดูดซับแสงยูวีซีได้ มีขนาด $0.42 \times 0.68 \times 0.95$ ลูกบาศก์เมตร ภายในตู้มีหลอดกำเนิดแสงยูวีซี (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) ขนาด 20 วัตต์ จำนวน 4 หลอด ติดตั้งที่ผนังด้านในตู้ ด้านละ 2 หลอด ส่วนกลางของตู้เป็นราวไม้ซึ่งมีตะขอสำหรับแขวนหน้ากากอนามัยแบบใช้แล้วทิ้ง ได้จำนวน 16 อัน มีพัดลมระบายความร้อนซึ่งอากาศภายในตู้จะถูกกรองผ่านแผ่นกรองอากาศก่อนปล่อยออกสู่ภายนอก

การเตรียมตัวอย่างหน้ากากอนามัย

หน้ากากอนามัยที่นำมาศึกษาเป็นหน้ากากชนิดใช้แล้วทิ้ง ยี่ห้อ Green Air (KHÄU TRANG; Vietnam) ซึ่งใช้งานในโรงพยาบาลศรีนครินทร์นำมาเจาะให้เป็นช่องขนาด 2×2 ตารางนิ้ว และนำไปแขวนบนราวไม้ซึ่งมีตะขอสำหรับเกี่ยวของหน้ากาก สำหรับตัวอย่างหน้ากากอนามัยที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ ทำการตัดหน้ากากเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร และนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปหยดเชื้อตัวแทนที่มีความเข้มข้น 10,000 Foci เพื่อทำการทดสอบ จากนั้นนำมาหมักกับหน้ากากอนามัยที่เจาะเป็นช่องไว้้อยู่ภายในตู้ฉายแสงยูวีซี ทำการเปิดแสงยูวีซีที่เวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 5, 10, 20, 30 นาที เมื่อครบเวลาแต่ละช่วง ทำการปิดแสงยูวีซีและนำตัวอย่างหน้ากากไปทำการทดสอบวัดประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ

การเตรียมไวรัส

ไวรัสที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ ไวรัสเดงกี หรือไวรัสก่อโรคไข้เลือดออก โดยจะทำการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ C6/36 โดยมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน flask T75 MOI 0.1 (ความเข้มข้นของไวรัสต่อเซลล์) ในที่นี้หมายถึง ไวรัส 1 ตัว ต่อ เซลล์ 10 เซลล์ เพื่อให้ได้ไวรัสตัวใหม่เพิ่มขึ้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากนั้นเก็บ supernatant ในวันที่ 7 หลังการใส่ไวรัสเข้าไป แล้วนำไปทำการหาความเข้มข้นของไวรัส ด้วยวิธี IFA (indirect immunofluorescent assay)

วิธีการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ วีโรเซลล์ (Vero cell) เป็นเซลล์ที่มาจากเยื่อบุไตของลิงสีเขียวแอฟริกัน ซึ่งมีคุณสมบัติในการติดเชื้อไวรัสได้สูงและการแยกไวรัสหลักได้อย่างมีประสิทธิภาพ เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และมีการใส่ supplement เพื่อส่งเสริมการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) 10% ของอาหารที่ใช้เลี้ยง จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้หาความเข้มข้นไวรัสด้วยวิธี IFA (indirect immunofluorescent assay) การเตรียมเซลล์สำหรับการทำการทดลองจะเริ่มจากนำ Vero cell ที่เลี้ยงไว้ มาทำการนำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก จากนั้นล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (mL) เอียง flask ไปมาเพื่อให้ PBS ล้างไปทั่วผิวหน้าเซลล์ จากนั้นดูด PBS ออกให้หมด เติมน้ำ 0.25% EDTA Trypsin ปริมาตร 1 mL บ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที จนเซลล์หลุดออกจากพื้น flask หมด จากนั้น resuspension ด้วย 10% FBS-DMEM ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 10 mL ดึงเซลล์ออกมา นับจำนวนโดยใช้เซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (μL) ผสมสี trypan blue ปริมาตร 10 μL แล้วนับ

ด้วย hemacytometer จากนั้นนำมาคำนวณให้ได้ปริมาณเซลล์ที่จะทำการทดลอง โดยจะใช้เซลล์ 2.5×10^5 cell/mL นำเซลล์มาแบ่งออกตามปริมาณที่จะใช้ แล้วเติมอาหารเข้าไปให้ครบปริมาณที่ต้องการใช้ จากนั้น seed ลงใน 96 well plate ปริมาณ 100 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการตรวจสอบความเข้มข้นของไวรัสและการอ่านผล

ไวรัสที่มีความเข้มข้น 1×10^6 FFU/mL จะถูกนำไปป้ายบนชิ้นส่วนของหน้ากากอนามัยที่เตรียมไว้ 10 μ L (10,000 foci) จากนั้นหน้ากากอนามัยจะถูกนำไปบ่มในตู้ฉายแสงยูวีที่ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0, 2, 5, 10, 20 และ 30 นาที ก่อนจะถูกนำออกมาเพื่อเพาะไวรัสที่เหลือนบนหน้ากากลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 400 μ L ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อและการทำลายสารพันธุกรรม

การ Infect virus เข้าสู่เซลล์

นำ Vero cell ที่ทำการ seed ใน 96 well มาทำการนำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก 70 μ L/well จากนั้นนำไวรัสที่ได้จากการทำการทดลองแต่ละตัวอย่าง ใส่ลงไปปริมาตร 50 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เคาะเพลตทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบเวลาให้เติม 2% CMC (carboxyl methyl cellulose) ปริมาตร 150 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้ว ดูดเอา 2% CMC ออก ล้างด้วย PBS ปริมาตร 100 μ L/well 3 ครั้ง แล้วเติม 4% formaldehyde ปริมาตร 100 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดเอา 4% formaldehyde ออก ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติม 0.1% Triton X-100 ปริมาตร 100 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติม 4G2 supernatant (primary antibody) ปริมาตร 50 μ L/well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ plate ออกจากอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไปใส่ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติม secondary anti-mouse IgG – HRP (1:1000 with 0.1% T-20-0.1% FBS in PBS) ปริมาตร 50 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติม DAB staining ลงไปปริมาตร 40 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติม PBS 300 μ L/well หลังจากนั้นนำไปอ่านผลได้กล้องจุลทรรศน์ (4x) แล้วนับ Foci ที่พบและนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัส โดยใช้สูตร

ความเข้มข้นของไวรัส = ผลรวม (จำนวน Foci x dilution factor) x 20/ จำนวน well ที่พบ

การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสหลังจากการทำลายเชื้อด้วยแสงยูวี

หลังจากทำการทดลองแล้ว นำไวรัสมาทำการสกัด RNA ของไวรัส โดยใช้ชุดสกัด QIAamp Viral RNA Mini Kit

วิธีการสกัด RNA ด้วยชุดสกัด QIAamp Viral RNA Mini Kit

เตรียม master mix โดยนำ buffer AVL ปริมาตร 560 μ L ผสมกับ carrier RNA ปริมาตร 5.6 μ L/sample ใน 1.5 mL microcentrifuge tube จากนั้น นำไวรัสที่ได้จากการทดลอง ปริมาตร 140 μ L มาเติมใส่ใน master mix ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นาน 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม absolute EtOH ปริมาตร 560 μ L ลงไปใน 1.5 mL microcentrifuge tube และผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำ solution ปริมาตร 630 μ L ใส่ลงใน QIAamp mini column ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000g/ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทั้ง flow-through นำ column ไปใส่ 2 mL collection tube ใหม่ แล้วเติม buffer AW1 ปริมาตร 500 μ L จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000g/ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทั้ง flow-through จากนั้นเติม buffer AW2 ปริมาตร 500 μ L ปั่นเหวี่ยงที่ 20,000g/ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วทั้ง flow-through นำไปปั่นเหวี่ยง full speed เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ solution ออกจาก column ให้ได้มากที่สุด แล้วนำ column ไปใส่ 1.5 mL microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม buffer AVE ปริมาตร 40 μ L บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000g/ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะเอา RNA ของไวรัสออกมา และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เมื่อได้ RNA จากตัวอย่างใน แต่ละการทดลองจะนำไปตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมด้วยน้ำยา one step RT-PCR (Thermo, USA) โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อไวรัสเด็งกี⁷ ทำการเตรียมน้ำยา PCR และตั้งค่าการทำงานของ เครื่อง thermal cycler (Biorad CFX96) ดังนี้

One-step RT PCR

- Prime Script 1 step enzyme mix	0.5 μ L
- 2x 1 step buffer	6.25 μ L
- DN-F	0.25 μ L
- DN-R	0.25 μ L
- RNA	3 μ L
- RNase free water	2.25 μ L
Total	12.5 μ L

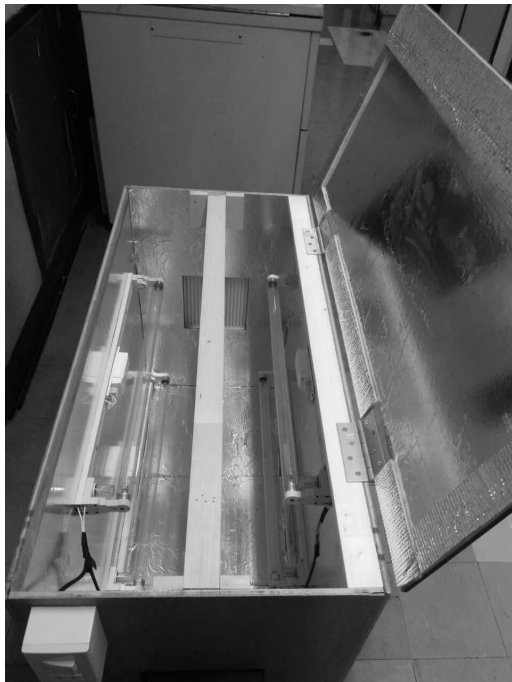
Condition RT-PCR

	50°C	15 min
	95°C	2 min
40 cycles	95°C	15 sec
	60°C	30 sec

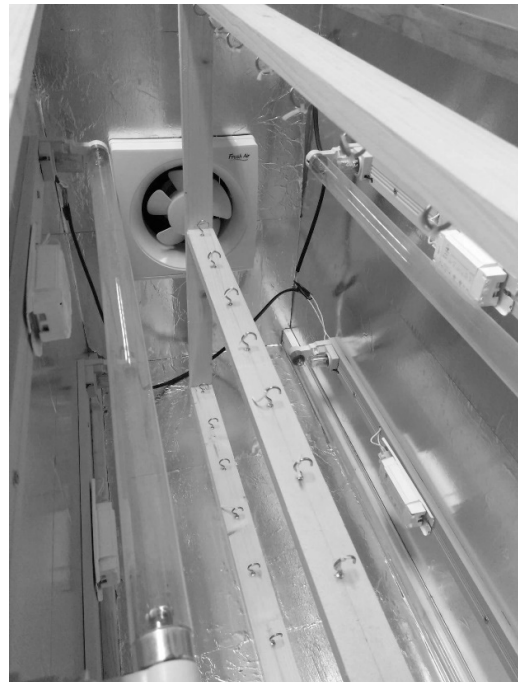
ผลการศึกษา

การเตรียมตู้ฉายแสงยูวีซีต้นแบบ

ทำการติดตั้งตู้ฉายแสงยูวีซีต้นแบบ โดยใช้ไฟฟ้าขนาด 220 โวลต์ ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 1) ก่อนใช้งานได้ทำการตรวจวัดหาปริมาณรังสีที่อาจรั่วออกมาครอบตู้ขณะใช้งานที่บริเวณรอบนอกของตู้และขอบฝาตู้ด้านบนด้วยเครื่อง UV meter พบปริมาณรังสีเท่ากับ 0 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (mW/cm^2) นั่นคือไม่มีการรั่วของแสงยูวีขณะใช้งาน



(ก)



(ข)

ภาพที่ 1 ตู้ฉายแสงยูวีต้นแบบ (ก) ภายในตู้ประกอบด้วยหลอดกำเนิดแสงยูวี ขนาด 20 วัตต์ จำนวน 4 หลอด (ข) ภายในตู้มีราวสำหรับแขวนหน้ากากอนามัยจำนวน 16 อัน (ปกด้านใน)

การทดสอบประสิทธิภาพเครื่องฉายแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัสตัวแทนที่มีความสามารถในการติดเชื้อ (Infectivity)

ชิ้นส่วนหน้ากากอนามัยที่ถูกหยดด้วยเชื้อไวรัสแดงที่มีปริมาณเชื้อ 10^4 FFU จะถูกนำไปหนีบไว้กับหน้ากากอนามัยที่จะเป็นช่องและแขวนไว้ภายในตู้ (ภาพที่ 2) ทำการเปิดแสงยูวีซีที่เวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 5, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาแต่ละช่วง ทำการปิดแสงยูวีซีและนำตัวอย่างหน้ากากไปทำการชะเอาไวรัสออกมาเพื่อทำการตรวจสอบปริมาณไวรัสที่ยังมีความสามารถในการติดเชื้อโดยวิธี focus forming assay ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าที่เวลา 0 นาที ปริมาณไวรัสที่มีบนหน้ากากนับได้จนถึงความเข้มข้นที่ 10^{-3} โดยนับจำนวน foci และแปลงค่าเป็น FFU/mL ได้เท่ากับ 25,000 FFU/mL หลังจากถูกฉายแสงยูวีซีที่เวลา 2 นาที พบว่าปริมาณของไวรัสลดลงมากกว่า 10^3 เท่า เหลือ 100 FFU/mL และที่ 5 นาที พบว่าสามารถทำลายความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด (ตารางที่ 1)



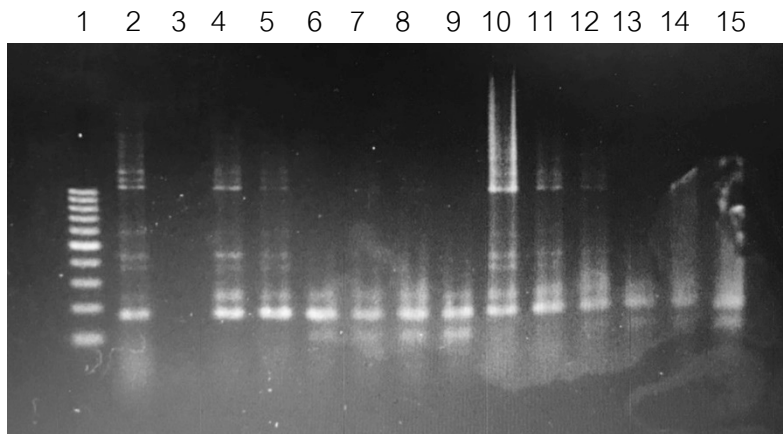
ภาพที่ 2 หน้ากากอนามัยที่ทำกรเจาะเป็นช่องไว้สำหรับหนีบชิ้นส่วนหน้ากากที่ทำกรหยดเชื้อทดสอบ (ปกด้านใน)

ตารางที่ 1 ผลการศึกษา Focus forming assay แสดงการกำจัดเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ หลังจากฉายแสงยูวีที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เวลา	0 นาที	2 นาที	5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
จำนวน foci ที่นับได้ที่ non-diluted condition (duplicate)	>100	6.5	0	0	0	0
FFU/mL	25,000	100	0	0	0	0

การทดสอบประสิทธิภาพตู้ฉายแสงยูวีซีในการทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตัวแทน

แสงยูวีซีมีคุณสมบัติในการทำลายสารพันธุกรรมทั้งชนิด DNA และ RNA ในการทดลองนี้ได้ทดสอบการทำลายสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัส เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการนำน้ำกากอนามัยกลับมาใช้ซ้ำ เชื้อไวรัสที่ได้จากการชะออกมาจากน้ำกากอนามัยที่เวลาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น จะถูกนำไปสกัดสารพันธุกรรมชนิด RNA เพื่อตรวจสอบปริมาณ RNA ของเชื้อที่เหลืออยู่ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยพบว่า ที่เวลา 10 นาที RNA ของไวรัสจะถูกกำจัดจนไม่สามารถตรวจสอบได้ โดยวิธี gel electrophoresis เมื่อใช้ product จากวิธี RT-PCR ปริมาตร 5 μ L ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Gel electrophoresis ของตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรจาก RT-PCR

Lane ที่ 1 Molecular weight marker ขนาด 1 kbp Lane ที่ 2 Positive control Lane ที่ 3 Negative control Lane ที่ 4 PCR product ที่ 0 นาที (untreated) Lane ที่ 5 PCR product ที่ 2 นาที Lane ที่ 6 PCR product ที่ 5 นาที Lane ที่ 7 PCR product ที่ 10 นาที Lane ที่ 8 PCR product ที่ 20 นาที Lane ที่ 9 PCR product ที่ 30 นาที Lane ที่ 10-15 คือ PCR product ที่ทำซ้ำที่ 0, 2, 5, 10, 20, 30 นาที ตามลำดับ (ปกด้านใน)

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาพบว่าตู้ฉายแสงยูวีซีต้นแบบ ที่มีปริมาณความเข้มของแสงยูวีซี ภายในตู้ระหว่าง $0.198 - 0.656 \text{ mW/cm}^2$ (30 mJ/cm^2) มีความสามารถทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อของไวรัสตัวแทนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้มากกว่า 10^3 เท่า ภายในเวลา 2 นาที จนไม่สามารถติดเชื้อได้ภายในระยะเวลา 5 นาที และสามารถทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตัวแทนได้ภายใน 10 นาที แสดงถึงประสิทธิภาพของแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัสให้สิ้นสภาพการก่อโรคโดยใช้เวลาไม่นาน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mills และคณะ⁴ ที่พบว่าการฉายแสงยูวีซีปริมาณ 1 J/cm^2 ($1.1 \pm 0.1 \text{ J/cm}^2$) บนหน้ากากกรองอากาศชนิด N95 สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ ชนิดเอช1 เอ็น1 ที่ปนเปื้อน ได้มากกว่า 10^3 เท่า ภายในเวลา 1 นาที โดยวิธี $50\% \text{ tissue culture infectious dose (TCID}_{50}$) assay และผลการศึกษา ของ Heimbuch BK และคณะ⁵ ที่พบว่า แสงยูวีซี ปริมาณ $1.6\text{-}2.0 \text{ mW/cm}^2$ (18 KJ/m^2) สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ ชนิดเอช1 เอ็น1 ที่ปนเปื้อนบนหน้ากากกรองอากาศ N95 ชนิดต่าง ๆ ได้มากกว่า 10^4 เท่า ภายใน 15 นาที โดยวิธี TCID_{50} assay โดยส่วนใหญ่สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตู้ฉายแสงยูวีซีต้นแบบสามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ในระยะเวลาสั้นโดยไม่จำเป็นต้องใช้ความเข้มของแสงยูวีซีมากถึง 2 mW/cm^2 ซึ่งมีผลต่อต้นทุนการผลิตตู้และอาจมีความเสี่ยงจากปริมาณรังสีที่สูงเกินไป

ปัจจัยสำคัญที่มีผลในการทำลายเชื้อไวรัส คือ ปริมาณความเข้มของแสงยูวีซีและระยะเวลาในการสัมผัส รวมถึงระยะห่างระหว่างหน้ากากกับแหล่งกำเนิดแสง แบบของหน้ากากที่ปิดกั้นแสงยูวีซีไม่ให้แทรกซึมเข้าไปสัมผัสกับพื้นผิวชั้นใน จะลดประสิทธิภาพของแสงยูวีซีในการทำลายเชื้อไวรัสได้⁶ นอกจากนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การฉายแสงยูวีซีไม่ทำความเสียหายต่อเส้นใยของแผ่นกรองและไม่ลดประสิทธิภาพในการกรองของหน้ากากกรองอากาศแม้จะทำซ้ำถึง 3 ครั้ง^{2,3,9,10} ดังนั้นการฉายแสงยูวีซีบนหน้ากากอนามัยจึงยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อย่างปลอดภัย

สรุป

จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า ตู้ฉายแสงยูวีซีที่มีปริมาณความเข้มไม่น้อยกว่า 0.198 mW/cm^2 มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัสและกำจัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิด RNA ที่มีเปลือกหุ้มได้สมบูรณ์ที่เวลา 10 นาที อย่างไรก็ตามในการนำหน้ากากอนามัยกลับมาใช้ซ้ำควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงระยะเวลาและความเข้มของแสงยูวีซีที่ใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ชนิษฐา คำวิไลย์ศักดิ์ รศ.ดร.ลัดดา ตันวานิชกุล และ รศ.ดร.พรนภา เกษมศิริ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลแสงยูวีที่ต้นแบบ สำหรับใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ พร้อมทำการทดสอบหาการรั่วของแสงยูวีที่บริเวณรอบตู้ขณะเปิดใช้งาน

เอกสารอ้างอิง

- Centers for Disease Control and Prevention. Decontamination and Reuse of Filtering Facepiece Respirators [Internet]. 2020 [updated 2020 Apr 9; cited April 15, 2020]; Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/ppe-strategy/decontamination-reuse-respirators.html>
- Viscusi DJ, Bergman MS, Eimer BC, Shaffer RE. Evaluation of five decontamination methods for filtering facepiece respirators. *Ann Occup Hyg* 2009; 53: 815–27.
- Lindsley WG, Martin Jr. SB, Thewlis RE, Sarkisian K, Nwoko JO, Mead KR, *et al.* Effects of ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) on N95 respirator filtration performance and structural integrity. *J Occup Environ Hyg* 2015; 12: 509–17.
- Mills D, Harnish DA, Lawrence C, Sandoval-Powers M, Heimbuch BK. Ultraviolet germicidal irradiation of influenza-contaminated N95 filtering facepiece respirators. *Am J Infect Control* 2018 ; 46: e49–e55. doi: 10.1016/j.ajic.2018.02.018
- Heimbuch BK, Wallace WH, Kinney K, Lumley AE, Wu CY, Woo MH, *et al.* A pandemic influenza preparedness study: Use of energetic methods to decontaminate filtering facepiece respirators contaminated with H1N1 aerosols and droplets. *Am J Infect Control* 2011 ; 39: e1-9. doi: 10.1016/j.ajic.2010.07.004.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. วิธีการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนหน้ากากมี 3 วิธี [อินเทอร์เน็ต]. 9 เมษายน 2563. [ค้นเมื่อ 15 เมษายน 2563]. จาก <https://www3.dmsc.moph.go.th/post-view/747>
- Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, *et al.* Development of Group- And Serotype-Specific One-Step SYBR Green I-based Real-Time Reverse transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *J Clin Microbiol* 2003 ;41:2408-16. doi: 10.1128/jcm.41.6.2408-2416.2003

8. Mechler S. Covid-19 Pandemic: Face Mask Disinfection & Sterilization for Viruses [Internet]. 2020 [updated 2020 Apr 10; cited April 15, 2020]; Available from: <https://consteril.com/covid-19-pandemic-disinfection-and-sterilization-of-face-masks-for-viruses/>
9. Viscusi DJ, King WP, Shaffer RE. Effect of decontamination on the filtration efficiency of two filtering facepiece respirator models. *J Int Soc Respir Prot* 2007; 24: 93–107.
10. Fisher EM, Shaffer RE. A method to determine the available UV-C dose for the decontamination of filtering facepiece respirators. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 287-95. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04881.x