บทที่ 7

กระบวนการที่ก่อให้เกิดอันตรายทางชีวภาพ

อันตรายทางชีวภาพ(Biohazard) อาจนิยามได้ว่าเป็นสิ่งอันตรายที่เกิดขึ้นเนื่องจากการใช้จุลชีพ เช่น โปรโตซัว (Protozoa), รา (Mold), แบคทีเรีย (Bacteria)และไวรัส (Virus) หรืออันตรายที่เกิดจากการใช้ส่วนประกอบของจุลชีพ เช่น สารโปรตีน, กรดนิวคลีอิด (Nucleic acid) หรืออันตรายเนื่องจากการใช้สิ่งที่เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลชีพ เช่น สารพิษ (Toxin) โดยทั่วไปความหมายของอันตราย(Hazard)จะหมายถึงการก่อความเจ็บป่วยต่อมนุษย์ แต่ในบางกรณี เราจะพิจารณาว่าเป็นสิ่งอันตรายทางชีวภาพ ถ้าสิ่งนั้นก่อให้เกิดอันตรายต่อสภาพแวดล้อม โดยอาจก่อให้เกิดโรคต่อพืชและสัตว์ แม้ว่าจะไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์โดยตรงก็ตาม

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับอันตรายทางชีวภาพ(Biohazard)สามารถพิจารณาได้ 2 สาขา(Field) คือ

1. กระบวนการที่ใช้จุลชีพจำพวก Etiological organism ซึ่งเป็นจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อแก่มนุษย์

2. กระบวนการที่ใช้จุลชีพที่ผ่านวิธีการทางพันธุวิศวกรรม(Genetic engineering)หรือ Recombination DNA microorganism.

7.1 ห้องปฏิบัติการกักกันจุลชีพ

ห้องปฏิบัติการกักกันจุลชีพ จะถูกออกแบบมาให้สำหรับการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่เป็นอันตรายทางชีวภาพ (Biohazard process)ในการดำเนินการ(Treatment)กับสารวัสดุอันตรายทางชีวภาพ จะต้องประกอบด้วย

การกักกันทางกายภาพ(Physical containment) และวิธีการจำกัดการแพร่กระจายทางชีวภาพ (Biological isolation) และระบบการกักกันจะต้องสามารถดำเนินได้ทั้งจุลชีพพวก Etiological organism และจุลชีพพวกที่ผ่านกรรมวิธีการพันธุวิศวกรรม

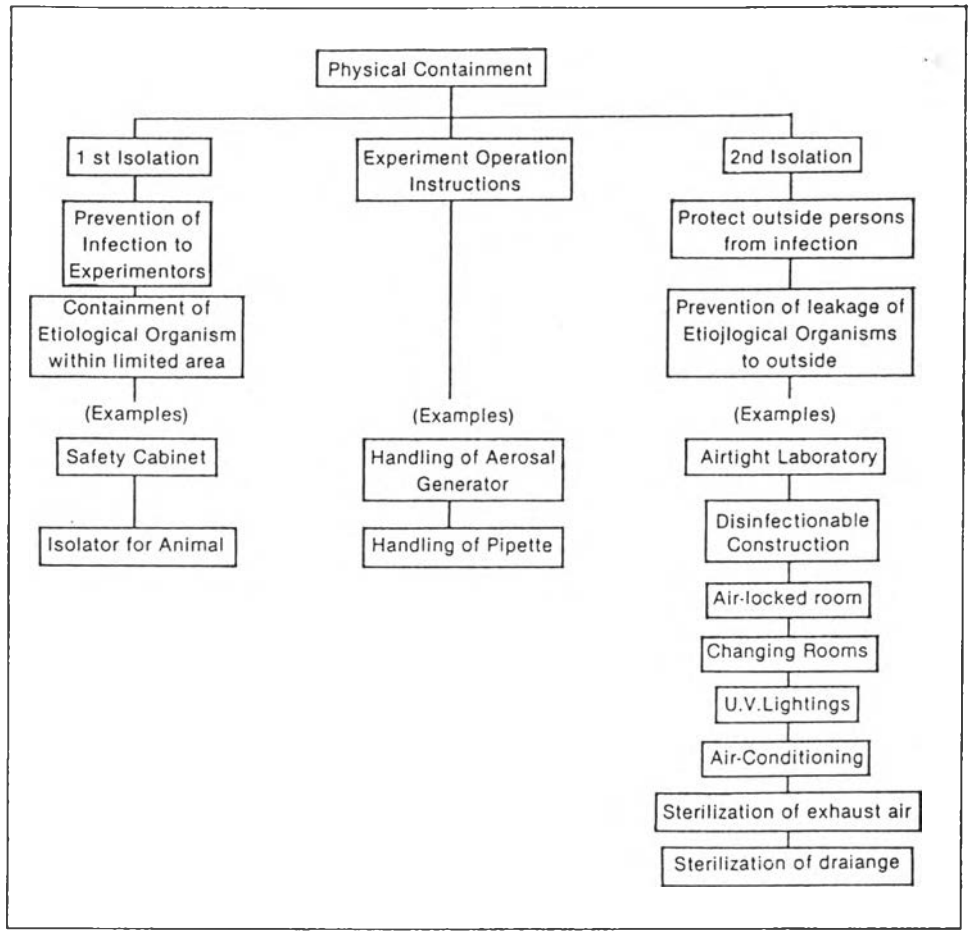
วิธีการจำกัดการแพร่กระจาย(Biological isolation) จะเป็นวิธีการปฏิบัติ(Practice) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับระดับของความเสี่ยงต่ออันตราย (Level of risk)ของจุลชีพหรือสารชีวภาพนั้น และมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ (Code of practice)ได้มีการออกหลักเกณฑ์ต่าง ๆ มากมาย การวิจัยนี้จะวิเคราะห์และสรุปหลักเกณฑ์มาตรฐานที่สำคัญได้แก่ NIH guideline for reserch involving recombinant DNA molecules และ WHo biosafety manual เพื่อใช้เป็นหลักเกณฑ์พิจารณาลักษณะเฉพาะและวิธีในการจัดตั้งโรงปฏิบัติการนำทางเอนกประสงค์

ส่วนการกักกันทางกายภาพ(Physical containment)จะเป็นลักษณะการออกแบบโครงสร้างระบบป้องกัน (Protection system) ของอาคารและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการป้องกันการหลุดลอดของสารชีวภาพไม่ให้ออกจากระบบสู่สภาพแวดล้อมภายนอก ลักษณะรูปแบบโดยทั่วไปของห้องปฏิบัติการนำทางกักกันจุลชีพจะเป็นเช่นเดียวกันกับห้องปฏิบัติการนำทางปราศจากเชื้อ ส่วนแตกต่างที่สำคัญคือระบบป้องกันจะมีทิศทางตรงข้ามกัน โดยที่ห้องปฏิบัติการนำทางกักกันจุลชีพมีวัตถุประสงค์จะป้องกันการแพร่กระจายของสารชีวภาพ จากระบบไม่ให้ออกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก แต่ห้องปฏิบัติการนำทางปราศจากเชื้อมีวัตถุประสงค์สำคัญคือการป้องกันการแพร่กระจายของสารชีวภาพจากสภาพแวดล้อมภายนอกไม่ให้เข้าสู่ระบบ

การกักกันทางกายภาย(Physical containment) ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ที่สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 13

รูปที่ 13 แสดงส่วนประกอบของระบบกักกันทางกายภาพ

ที่มา : Air filtration with emphasis on clean room and energy saving, TPA(Thai-Japan),August 1986 by Tagasaco company staff



7.1.1 หลักเกณฑ์เบื้องต้นสำหรับห้องปฏิบัติการน่าทางกักกันจุลชีพ คือ

7.1.1.1 ควบคุมสิ่งที่เข้า-ออก (Control access)

สิ่งที่เข้าและออกไม่ว่าจะเป็นบุคคลหรือวัสดุสิ่งของต่าง ๆ จะต้องผ่านระบบกักอากาศ(Air lock system) เมื่อบุคคลเข้าสู่ห้องปฏิบัติการน่าทาง จะต้องมีการเปลี่ยนเสื้อผ้าสำหรับการปฏิบัติการภายในบริเวณนั้นโดยเฉพาะ และจะต้องมีการชะล้าง(Shower) ตัวก่อนออกจากห้องปฏิบัติงาน

7.1.1.2 ควบคุมระบบอากาศ

ความดันอากาศของห้องปฏิบัติการน่าทางจะต้องรักษาให้ต่ำกว่าภายนอกและจะต้องใช้ระบบเฉพาะแต่ละห้อง(Individual system) อากาศที่ระบายออกจะต้องผ่านระบบฆ่าเชื้อ หรือระบบระบายอากาศต้องผ่านเครื่องกรองชนิด HEPA filter รวมทั้งอากาศที่เข้าสู่ห้องปฏิบัติการน่าทางอาจจะต้องผ่านเครื่องกรองชนิดนี้ด้วยในกรณีที่มีความจำเป็น

7.1.1.3 ลดการปนเปื้อนของของเหลวที่ออกมา (Decontamination of effluents)

ของเหลวทุกชนิดที่ออกจากห้องกักกันจุลชีพจะต้องทำให้แน่ใจว่ามีความปลอดภัย รวมทั้งน้ำที่ใช้อาบชำระร่างกายของบุคคลที่ออกจากห้องปฏิบัติการน่าทาง

7.1.1.4 ฆ่าเชื้อวัสดุและของเสียที่ออกจากห้องปฏิบัติการน่าทาง (Sterilizationof waste and materials)

ของเสียทุกชนิดตลอดจนวัสดุเครื่องใช้ต่าง ๆ จะต้องฆ่าเชื้อทุกครั้งที่นำออกจากห้องปฏิบัติการนำทางและจะต้องนำออกผ่านหม้ออบเชื้อ(Autoclave) ที่มีประตู 2 ทาง (Double-door pass-through) การออกแบบระบบกักกัน (Containment system) ต้องการคุณลักษณะพิเศษและรายละเอียดข้อมูลของศักยภาพในการหลุดลอดจากระบบของจุลชีพทั้งในขณะที่ปฏิบัติงานในสภาพปกติและในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุไม่คาดหมายต่าง ๆ ระดับของการกักกันทางกายภาพ (Degree of physical containment)ขึ้นอยู่กับระดับความร้ายแรงของจุลชีพที่ใช้เป็น Host-vector ในปัจจุบันมีข้อกำหนดแนวทางปฏิบัติ (Guidelines) สำหรับการปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ใช้จุลชีพอันตราย โดยเฉพาะกับจุลชีพที่ผ่านการใช้เทคโนโลยีทางด้านวิศวพันธุกรรมที่เป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ข้อปฏิบัติของสถาบันสุขภาพแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (The National institute of health (NIH) guidelines) ซึ่งได้แบ่งระดับของการกักกันทางกายภาพของการปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับจุลชีพพวก Recombinant DNA ในระดับขนาดใหญ่ (มากกว่า 10 ลิตร ขึ้นไป) ออกได้เป็น 3 ระดับ คือ BL1-LS, BL2-LS และ BL3-LS โดย BL1-LS จะมีความเข้มงวดน้อยสุดและ BL3-LS จะมีความเข้มงวดสูงสุด ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบความต้องการของทั้ง 3 ระดับ สำหรับกระบวนการชีวภาพทางการค้าปัจจุบันจะอยู่ในระดับแค่ BL1-LS ทั้ง BL1 - LS และ BL2 - LS ระบบกักกันจะอยู่ที่กระบวนการโดยเครื่องจักรอุปกรณ์จะถูกออกแบบให้ป้องกันการหลุดลอดของจุลชีพ แต่โครงสร้างอาคารที่กระบวนการนั้นปฏิบัติงานอยู่ จะไม่ได้มีการออกแบบระบบกักกันเพิ่มเติม ส่วนในระดับ BL3- LS นั้นจะประกอบทั้งระบบกักกันเบื้องต้นของกระบวนการร่วมกับระบบกักกันระดับสอง (Secondary facility containement) ของอาคารและสิ่งปลูกสร้างซึ่งกระบวนการนั้นติดตั้งและดำเนินการอยู่

7.1.2 ระดับของการกักกันจุลชีพ

ข้อกำหนดความต้องการของห้องปฏิบัติการกักกันจุลชีพ ตามข้อ

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบระดับการกักกันในแต่ละระดับ

ที่มา : Robert J. Giorgio andJames J. Wu "Design of large scale containment facilities for recombinant DNA fermentation,"TIBTECH (March1986):60-66

Physical containment requirements for large scale fermentations using organisms containing recombinant DNA molecules[a]

Item No.	Description	BL1-LS	BL2-LS	BL3-LS
1	Closed vessel	X	X	X
2	Inactivation of cultures by validated procedure before removing from the closed system	X	X	X
3	Sample collection and addition of material in a closed system	X	X	X
4	Exhaust gases sterilized by filters before leaving the closed system	X	X	X
5	Sterilization by validated procedures before opening for maintenance or other purposes	X	X	X
6	Emergency plans and procedures for handling large losses	X	X	X
7	No leakage of viable organisms from rotating seals and other mechanical devices		X	X
8	Integrity evaluation procedures – monitors and sensors		X	X
9	Containment evaluation with the host organism before introduction of viable organism		X	X
10	Permanent identification of closed system (fermentor) and identification to be used in all records		X	X
11	Posting of universal biohazard sign on each closed system and containment equipment when working with viable organism		X	X
12	Posting of universal biohazard sign on entry doors when work is in progress			X
13	Operations to be in a controlled area:			X
	Separate specified entry			X
	Double doors – air locks			X
	Walls, ceiling and floors to permit ready cleaning and decontamination			X
	Utilities and services (process piping and wiring) to be protected against contamination			X
	Handwashing facilities			X
	Shower facilities in close proximity			X
	Area designed to preclude release of culture fluids outside the controlled area in the event of an accident			X
	Ventilation – movement of air, filtration of air, etc.			X

[a] This table compares the NIH physical containment guidelines to the levels of containment required.

กำหนดใน NIH guidelines สามารถจำแนกความต้องการทางวิศวกรรมของระบบกักกันได้3 ระดับ คือ

7.1.2.1 ระบบกักกันมูลฐานเบื้องต้น (Basic primary containment) สำหรับกระบวนการทุกระดับ

7.1.2.2 ระบบกักกันเบื้องต้นเพิ่มเติม (Addition primary containment) สำหรับกระบวนการระดับ BL2-LS และ BL3-LS

7.1.2.3 ระบบกักกันอันดับ 2 ของโครงสร้างอาคารเพิ่มเติม (Secondary facilities containment) สำหรับกระบวนการระดับ BL3-LS

7.2 ระบบกักกันมูลฐานเบื้องต้น

7.2.1 การปฏิบัติการใด ๆ จะต้องอยู่ภายในภาชนะที่ปิดสนิท โดยเฉพาะสำหรับจุลชีพอันตรายหรือจุลชีพที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ Recombinant DNA

การที่จะปฏิบัติการให้ตรงตามข้อกำหนดในทางปฏิบัติการจริง ๆ แล้วเป็นสิ่งที่ยากลำบาก ทั้งนี้เนื่องจากภาชนะทุกชนิด (Vessels) จะต้องมีช่องหรือรูระบายอากาศ(Vent) ดังนั้น วิธีการที่ดีที่สุดก็คือ จะต้องมีระบบการกรองที่สามารถฆ่าเชื้อได้(Sterilable filter) ติดตั้งอยู่ที่ช่องระบายอากาศทุกชนิด เพื่อป้องกันการหลุดลอดของจุลชีพภายในภาชนะ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีวิธีการใดดีที่สุดที่จะหยุดยั้งปฏิกิริยาชีวภาพของจุลชีพ โดยไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ ดังนั้น จึงอาจต้องมีระบบป้องกันเพิ่มเติมมากขึ้น โดยเฉพาะกรณีที่ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่เกิดขึ้นนอกเซลล์ละปะปนอยู่กับสารอาหาร ภายหลังการแยกเอาเซลล์ออกแล้ว สารอาหารที่เหลือจะต้องผ่านเครื่องกรองขนาด 0.2 um เพื่อป้องกันการหลุดลอดของจุลชีพ ก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ต่อไป ส่วนเซลล์จุลชีพที่แยกได้ จะนำต้องนำไปฆ่าหรือหยุดยั้งปฏิกิริยาชีวภาพก่อนที่จะปล่อยทิ้งออกนอกระบบกักกัน ระบบกักกันสำหรับสารชีวภาพที่อยู่นอกเซลล์สามารถแสดงได้

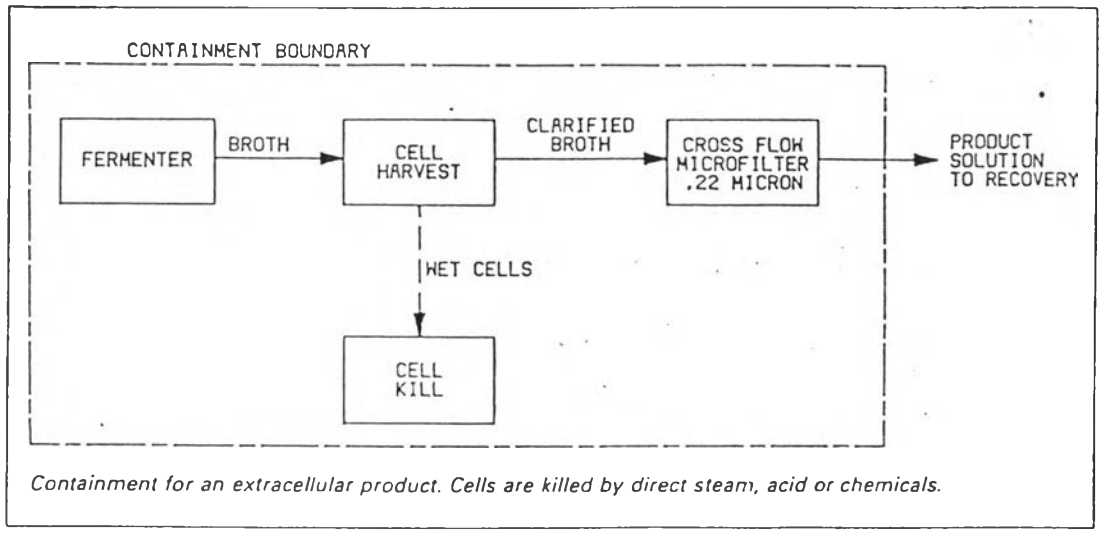
ดังรูปที่ 14 สำหรับกรณีที่ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่อยู่ภายในเซลล์ ระบบกักกันจะรวมไปถึงขั้นตอนการสลายเซลล์ เพื่อแยกสกัดเอาสารผลิตภัณฑ์ออก และจะต้องผ่านเครื่องกรองขนาด 0.2 um ก่อนที่จะปล่อยเข้าสู่ขั้นตอนอื่นต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 15

7.2.2 จะต้องหยุดปฏิกิริยา (Inactivation)ของสารชีวภาพทุกชนิด (Culture) โดยวิธีการที่เหมาะสมก่อนที่จะเคลื่อนย้ายออกจากภาชนะหรือระบบที่ปิดสนิท (Closed system)

มีวิธีการหลายวิธีในการหยุดยั้งปฏิกิริยา(Inactivation) ของสารชีวภาพ เช่น การใช้ความร้อน การใช้สารเคมี และการใช้สารปฏิชีวนะ สิ่งที่ต้องคำนึงก็คือวิธีการที่เลือกใช้ จะต้องไม่มีผลต่อสารชีวภาพที่ต้องการทดลองวิจัยทั้งคุณภาพ และผลผลิตที่จะได้(Yield) สารชีวภาพที่ไม่ทนความร้อน เช่น สารโปรตีนต่าง ๆ วิธีการหยุดยั้งปฏิกิริยาด้วยความร้อนจะมีผลต่อสภาพของโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ในแต่ละวิธีก็เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการพิจารณาด้วย ซึ่งจะต้องพิจารณาทั้งกระบวนการ ตัวอย่างเช่น ถ้าเลือกใช้กรดเข้มข้นเป็นตัวหยุดยั้งปฏิกิริยาชีวภาพ ผลกระทบที่เกิดขึ้นก็ คือจะต้องเลือกใช้โลหะของภาชนะที่จะใช้ให้เหมาะสมทนต่อการกัดกร่อนในขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ และระบบบำบัดของเสีย จะต้องเพิ่มขั้นตอนของการทำกรดที่เหลืออยู่ให้เป็นกลาง(Neutralized)เสียก่อน ซึ่งจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการและสารเคมีที่ต้องใช้เพิ่มมากขึ้น ประเด็นสำคัญต่อมาที่ต้องพิจารณา คือ การหยุดยั้งปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินการที่จุดใด จะดำเนินการภายในถังปฏิกิริยาหรือถังหมัก หรือกระทำในขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ถังเก็บ (Holding tank) หรือจะกระทำภายหลังการแยกเซลออกจากสารอาหาร (Broth)แล้ว ซึ่งในความหมายของการกักกัน (Containment) วิธีการหยุดยั้งปฏิกิริยาชีวภาพ ควรจะกระทำที่ถังหมัก (Fermenter)โดยตรง ทั้งนี้เพื่อลดปัญหายุ่งยากในการออกแบบ และโอกาสของการหลุดลอดของจุลชีพ

รูปที่ 14 ระบบกักกันสำหรับสารชีวภาพที่อยู่นอกเซล

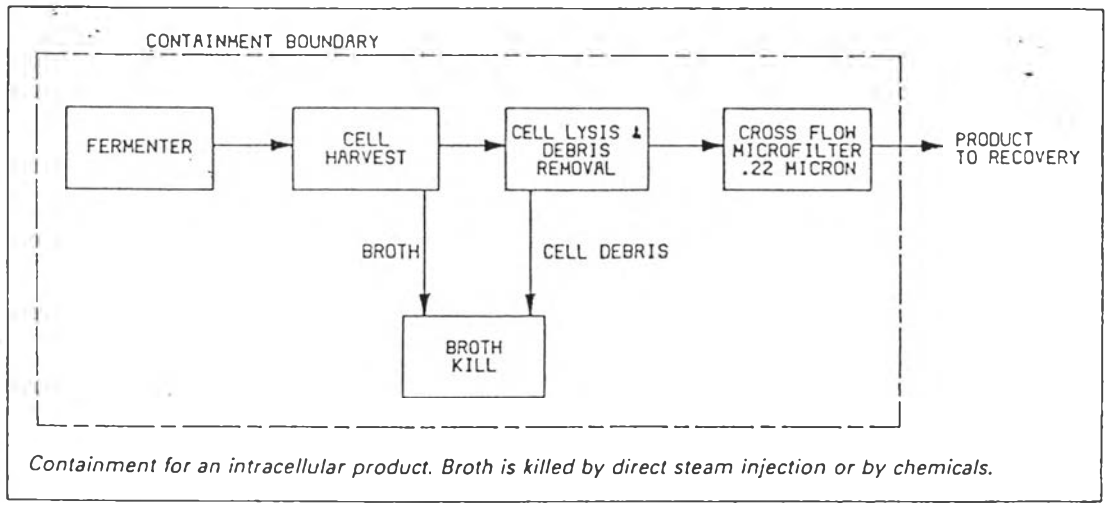
ที่มา : Robert J. Giorgio and James J. Wu "Design of large scale containment facilities for recombinant DNA fermentations,"TIBTECH (March 1986):60-66



Containment for an extracellular product. Cells are killed by direct steam, acid or chemicals.

รูปที่ 15 ระบบกักกันสำหรับผลิตภัณฑ์เป็นสารที่อยู่ภายในเซล

ที่มา : Robert J. Giorgio and James J. Wu "Design of large scale containment facilities for recombinant DNA fermentations,"TIBTECH (March 1986):60-66



Containment for an intracellular product. Broth is killed by direct steam injection or by chemicals.

7.2.3 การเก็บตัวอย่างจะต้องเก็บด้วยวิธีปิดมิดชิด และการถ่ายเทสารชีวภาพจะต้องใช้วิธีหรืออยู่ในระบบที่ปิดมิดชิด(Closed system)เพื่อที่จะป้องกันไม่ให้มีการหลุดลอดของละออง(Aerosols) หรือเกิดการปนเปื้อนต่อผิวหน้าสัมผัสของอุปกรณ์ต่าง ๆ (Exposed surface)

ในการที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ของข้อกำหนดนี้ สิ่งที่ต้องคำนึงก็คือ

7.2.3.1 ระบบการเก็บตัวอย่างที่ปิดมิดชิดซึ่งในแต่ละจุดของการเก็บตัวอย่างจะต้องมีชุดอุปกรณ์หรือวิธีการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความร้อนสูงที่รอยต่อ (Connection) ทั้งก่อนและหลังการเก็บตัวอย่าง

7.2.3.2 ภาชนะทุกชนิดที่บรรจุสารชีวภาพที่ยังมีชีวิตหรือยังมีปฏิกิริยาชีวภาพอยู่ จะต้องมีชุดอุปกรณ์การกรองที่ปลอดเชื้อ ณ ช่องเปิดต่าง ๆ (Sterile vent filter)เพื่อป้องกันการหลุดลอดของจุลชีพระหว่างการถ่ายเทสารชีวภาพนั้น

7.2.3.3 อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดละอองเช่น เครื่องปั่นแยก (Centrifuges)จะต้องดำเนินการภายในชุดหรือเครื่องปกคลุมที่ให้ความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biological safety cabinets)

7.2.4 จะต้องมีระบบฆ่าเชื้อแก๊สที่ปล่อยออกมาจากถังหมัก(Fermenter) และภาชนะทุกชนิดที่บรรจุจุลชีพที่ยังมีชีวิตอยู่

วิธีการที่ดีที่สุดก็คือ การติดตั้งระบบกรองปลอดเชื้อที่ช่องระบายแก๊ส (Sterile filter) ซึ่งจะประหยัดกว่าการติดตั้งขดลวดความร้อน สำหรับเผาแก๊สที่ออกมา ปัญหาที่อาจจะเกิดตามมาก็คือ การเกิดการอุดตันเนื่องจากโฟมหรือไอระเหยจากละอองของสารชีวภาพ ซึ่งอาจจะทำให้ต้องเพิ่มเครื่องแยกของแข็งเช่น ไซโคลน(Cyclones) และเครื่อง Coalescing filter เพื่อแยกเอาของเหลวออกจากแก๊ส ก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องกรองปลอดเชื้อ และเพื่อที่แน่ใจในการทำ

งานควรจะมีเครื่องกรองปลอดเชื้อ 2 ชุด ต่อเนื่องกัน เพื่อให้แน่ใจในการป้องกันการหลุดลอดของจุลชีพ ทั้งนี้เมื่อเครื่องกรองชุดใดชุดหนึ่งอาจเกิดการเสียหาย ก็ยังสามารถป้องกันการหลุดลอดของจุลชีพจากเครื่องที่ยังเหลืออยู่

7.2.5 จะต้องมีแผนการป้องกัน และวิธีการดำเนินการในการกักเก็บสารชีวภาพจำนวนมากที่เกิดรั่วไหล ออกจากถังหมัก ให้ยังคงอยู่ในบริเวณพื้นที่บริเวณถังหมักในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุไม่คาดหมายขึ้น เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดจะต้องทำการประเมินถึงผลเสียหายที่อาจเกิดขึ้น ในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุร้ายแรงที่สุด เพื่อที่จะสามารถวางแผนและระบบในการขจัดสารชีวภาพที่เกิดการรั่วไหลออกมาในปริมาณมาก ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นได้จากกรณีดังนี้ คือ

7.2.5.1 การเกิดรั่วไหลของสารชีวภาพจากภาชนะหรือถังหมัก เนื่องจากการเสียหายแตกชำรุดของภาชนะหรือถังหมัก การที่จะควบคุมการสูญเสียในปริมาณมากของสารชีวภาพนี้ สามารถทำได้โดยการสร้างกำแพงหรือผนังปิดล้อมรอบภาชนะหรือถังหมักนั้น โดยเนื้อที่โดยรอบกำแพงสามารถที่จะกักเก็บสารชีวภาพได้ ในปริมาณเท่ากับที่บรรจุในถังหมักได้ทั้งหมด ปัญหาที่ติดตามต่อมาก็คือการที่จะจัดการสารชีวภาพที่กักเก็บอยู่นั้น ซึ่งทำได้โดยการปั๊มผ่านเครื่องปั๊มที่เหมาะสมไปยังเครื่องฆ่าเชื้อแบบต่อเนื่องเช่นเครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนแบบก่อนที่จะส่งไปยังถังเก็บเพื่อที่จะนำไปกำจัดทิ้งต่อไป และก่อนที่จะนำไปกำจัดทิ้งก็จะต้องทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตอยู่รอดของจุลชีพเพื่อความแน่ใจในความปลอดภัยในขณะที่กำจัดทิ้ง

7.2.5.2 การรั่วไหลของสารชีวภาพในปริมาณมากจาก Relief valve ของถังหมักซึ่งเกิดขึ้นได้เนื่องจาก

7.2.5.2.1 การเสียหายชำรุดของ Relief valve

7.2.5.2.2 วาล์วระบายความดันที่ช่องระบายอากาศ (Vent) เกิดชำรุดเสียหาย ทำให้ช่องระบายถูกปิดขณะที่ดำเนินการหมักสารชีวภาพ

ความดันในถังจะเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาจนเกินความดันกำหนดของ Relief valve ซึ่งRelief valve นี้ ก็จะเปิดออก แรงดันภายในถังหมักจะเป็นผลทำให้สารชีวภาพในถังหมักพุ่งออกมาได้

7.2.5.2.3 การเกิดเพลิงไหม้ในบริเวณถังหมัก ความร้อนที่เกิดขึ้นจะเป็นผลให้ความดันในถังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนทำให้ Relief valve เปิดออก ทำให้สารชีวภาพภายในพุ่งไหลออกมาได้ การที่จะออกแบบระบบกักกันสารชีวภาพที่ Relief valve นี้เป็นสิ่งที่ยุ่งยากมากทั้งนี้เนื่องจาก ไม่สามารถที่จะติดตั้งเครื่องกรองปลอดเชื้อ (Sterile filte) ที่ท่อของ Relief valve ได้ เพราะจะไปกีดขวางทางเดินของท่อ Relief valve การที่จะออกแบบระบบกักกันที่ Relief valve นี้จะต้องทำการประเมินถึงเงื่อนไขความเสียหายต่าง ๆ ของ Relief valve

ในกรณีที่ความเสียหายเนื่องจากการเกิดเพลิงไหม้ในบริเวณนั้นความร้อนที่เกิดขึ้นในปริมาณมากก็จะสามารถฆ่าจุลชีพในสารชีวภาพภายในถังหมักนั้นได้ และถึงแม้ว่าจะเกิดความเสียหายของRelief value จนเกิดการรั่วไหลของสารชีวภาพออกมา ก็ไม่ก่อให้เกิดภัยอันตรายทางชีวภาพต่อสภาวะแวดล้อมได้ มีเพียงกรณีที่พึงระวังคือ การเสียหายชำรุดเนื่องจากการอุดตันของวาล์วระบายอากาศจนเกิดการแตกร้าวของถัง ในกรณีนี้ข้อแนะนำที่ดีก็คือการติดตั้งRupture disc เพิ่มเติมหน้า Relief valve ในสภาวะปกติ Ruptrue disc diaphragm จะทำให้ Rupture disc เป็นช่องทางระบายออกของRelief value และในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุขึ้น Rupture disc จะเป็นสัญญาณเตือนถึงการเพิ่มของความดันในถังหมัก ก่อนที่จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อ Relief value

7.2.6 จะต้องไม่มีการรั่วไหลของจุลชีพที่ยังมีชีวิต จากรอยต่อของอุปกรณ์เครื่องจักรต่าง ๆเช่น รอยต่อของแกนหมุน (Rotating seals) รอยต่อของปะเก็นข้อต่อ

การที่จะบรรลุถึงข้อกำหนดนี้ได้โดยการใช้ Double mechanical seal ที่จุดวิกฤตต่าง ๆ เช่น แกนของใบพัด ปั๊ม ข้อต่อของฟันเฟือง และควรจะมี steam seal ที่จุดนั้น ๆ เพิ่มเติมเพื่อเป็นการป้องกันมากขึ้น

7.2.7 จะต้องมีการฆ่าเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีการที่เหมาะสม ก่อนที่จะทำการเปิดภาชนะหรืออุปกรณ์ใด ที่บรรจุสารชีวภาพที่มีจุลชีพอันตราย หรือจุลชีพพวก Recombinant DNA ไม่ว่าจะเป็นจุดประสงค์ใด เพื่อการบำรุงรักษาหรือเพื่อการอื่นใดก็ตาม

โดยปกติวิธีการฆ่าเชื้อ จะใช้การฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ(Steam sterilized)บนภาชนะด้วยความดัน 20 P.S.I. เหนือความดันบรรยากาศ ระหว่างการฆ่าเชื้อน้ำที่เกิดจากการกลั่นตัว จะต้องทำการเก็บรวบรวมไปยังถังเก็บรวม(Central tank) และจะต้องทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบจุลชีพที่อาจจะยังคงหลงเหลือมีชีวิตอยู่ ก่อนที่จะปล่อยเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียต่อไป

7.3 <u>ระบบกักกันเบื้องต้นเพิ่มเติม</u>

7.3.1 จะต้องมีวิธีการและอุปกรณ์ที่เหมาะสม และเชื่อถือได้ในการตรวจวัด (Sensors)และตรวจติดตาม (Monitor) การรั่วไหลของสารชีวภาพ

ในระหว่างการทำงานโดยปกติ จะต้องมีเครื่องมือตรวจวัดในพื้นที่ที่อาจมีการหลุดลอดรั่วไหลของสารชีวภาพ ตัวอย่างเช่น ภายในกำแพงล้อมรอบถังหมักจะต้องมีเครื่องตรวจวัดและสัญญาณเตือนเมื่อเกิดการรั่วไหลของสารชีวภาพจากถังหมัก ไม่ว่าจะเป็นการรั่ว หก รด มายังพื้นที่โดยรอบนั้น

7.3.2 ระบบกักกันจะต้องทำการทดสอบและประเมินค่า โดยใช้จุลชีพที่เป็นเจ้าบ้าน(Host organism)โดยที่ยังไม่ผ่านเทคนิคทางด้าน Recombinant

DNA เพื่อเป็นตัวทดสอบความสามารถในการกักกัน (Containment) ก่อนที่จะนำมาใช้งานโดยจุลชีพที่ต้องการกักกันจริง

ข้อกำหนดนี้เป็นการทดสอบระบบก่อนที่จะนำมาใช้งานจริง เพื่อให้เกิดความแน่ใจในการทำงานของระบบกักกันทั้งระบบ โดยทำการ Inoculate ถังหมักด้วยจุลชีพที่เป็นเจ้าบ้าน (Host organism)ทดสอบการกรองแก๊สที่ออกมาทดสอบวิธีการหยุดยั้งปฏิกิริยาของสารชีวภาพในขั้นตอนสุดท้ายของการหมักด้วยวิธีการที่เหมาะสม และท้ายสุดทดสอบการรั่วไหลของสารชีวภาพ ในบริเวณพื้นที่โดยรอบของถังหมัก เพื่อทดสอบความสามารถในการกักกันของระบบ

7.3.3 ระบบปิดใด ๆ (Closed system) จะต้องกำหนดอย่างเด่นชัดและแน่นอนถาวรและจะต้องมีการบันทึกให้แน่นอน

กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือเส้นทางเข้า(Inlets)และออก(Outlet)และอุปกรณ์ทุกชนิดที่ประกอบกันเข้าเป็นระบบปิด สำหรับกักกันสารชีวภาพจะต้องมีป้ายหรือเครื่องหมายบอกอย่างเด่นชัด และการบันทึกใด ๆ จะต้องตรงกับป้ายหรือเครื่องหมายที่กำหนดไว้

7.3.4 ต้องมีเครื่องหมายแสดงถึงอันตรายทางชีวภาพ ติดแสดงอยู่ที่ระบบกักกันหรือเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้กับจุลชีพที่ก่อให้เกิดอันตราย

7.4 ระบบกักกันอันดับสอง

7.4.1 ความดันของบรรยากาศเหนือสารชีวภาพในระบบปิด ที่ใช้กักกันจะต้องรักษาให้ต่ำกว่าความกดดันของอากาศภายนอกให้ต่ำมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

7.4.2 เมื่อจุลชีพที่ยังมีชีวิตถูกใช้ในกระบวนการ การปฏิบัติการใด ๆ จะต้องกระทำในพื้นที่บริเวณควบคุมเสมอ

ข้อกำหนดนี้มีความประสงค์ที่จะใช้การควบคุมกักกันทางกายภาพ (Physical facility containment) เพื่อป้องกันการเกิดอุบัติเหตุรั่วไหลของจุลชีพไปยังสิ่งแวดล้อมภายนอก หากการป้องกันขั้นแรกในภาชนะอุปกรณ์เกิดชำรุดเสียหายขึ้น เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ ลักษณะโครงสร้าง จะต้องมีลักษณะพิเศษอย่างน้อย จะต้องมีมาตรฐาน เช่นเดียวกับห้องสะอาด ซึ่งมีข้อพิงพิจารณาสังเขปดังนี้

7.4.2.1 ทางเข้าสู่พื้นที่บริเวณควบคุมสภาพแวดล้อม จะต้องผ่าน air lock มีห้องเปลี่ยนชุดแต่งกาย และห้องชำระล้างร่างกาย ต้องมีทางออกฉุกเฉิน ในกรณีที่เกิดเหตุไม่คาดหมาย ซึ่งจะต้องเป็นทางที่ต้องผ่าน Air lock ด้วยเช่นกัน

7.4.2.2 พื้นผิวในบริเวณควบคุมเช่น ผนัง พื้น เพดาน จะต้องเรียบ สามารถทำความสะอาดได้ง่าย และทนทานต่อสารเคมีที่ใช้ชะล้างและสารฆ่าเชื้อต่าง ๆ

7.4.2.3 สาธารณูปโภคและบริการต่าง ๆ จะต้องออกแบบให้ป้องกันการปนเปื้อน ไม่ควรจะมีท่อหรือสายใด ๆ ที่ห้อยแขวนในที่เปิดเผย

7.4.2.4 ท่อระบายของเสียทุกชนิดจากบริเวณควบคุม จะต้องเชื่อมต่อเข้าสู่ถังเก็บโดยเฉพาะ

7.4.4.5 บริเวณควบคุมจะต้องมีความดันอากาศต่ำกว่าบริเวณโดยรอบข้างเคียง

7.4.2.6 อากาศทุกชนิดที่ระบายออกจากบริเวณควบคุมจะต้องผ่านเครื่องกรองชนิด HEPA filter ชนิดที่สามารถฆ่าเชื้อด้วยความร้อนได้

7.5 ข้อกำหนดเบื้องต้นห้องปฏิบัติการนำทางระดับ BL-1-LS

7.5.1 ห้องปฏิบัติการพื้นฐานระดับ BL-1-LS จะได้รับการออกแบบสิ่งอำนวยความสะดวก(Facility)เช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป แต่เครื่องจักรอุปกรณ์ในการดำเนินการทดลองวิจัยจะได้รับการออกแบบสำหรับการกักกันทางจุลชีพ

7.5.2 ลักษณะการทดลองวิจัย จะต้องสอดคล้องตรงกับการจัดแบ่งความร้ายแรงของจุลชีพในระดับชั้นที่ 1 (Class-1 in danger classification for etiological organism) ตามการจัดแบ่งจุลชีพใน CDC Guideline หรือจุลชีพในระดับ BL-1-LS ของจุลชีพพวก Recombinant DNA ตามที่กำหนดใน NIH guideline

7.5.3 ห้องปฏิบัติการจะได้รับการออกแบบ การควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นและความกดดันอากาศเช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการระดับห้องสะอาดโดยทั่วไปตัวอย่างห้องปฏิบัติการพื้นฐาน ระดับ BL-1-LS แสดงดังรูปที่ 16

7.6 ข้อกำหนดเบื้องต้นห้องปฏิบัติการนำทางระดับ BL-2-LS

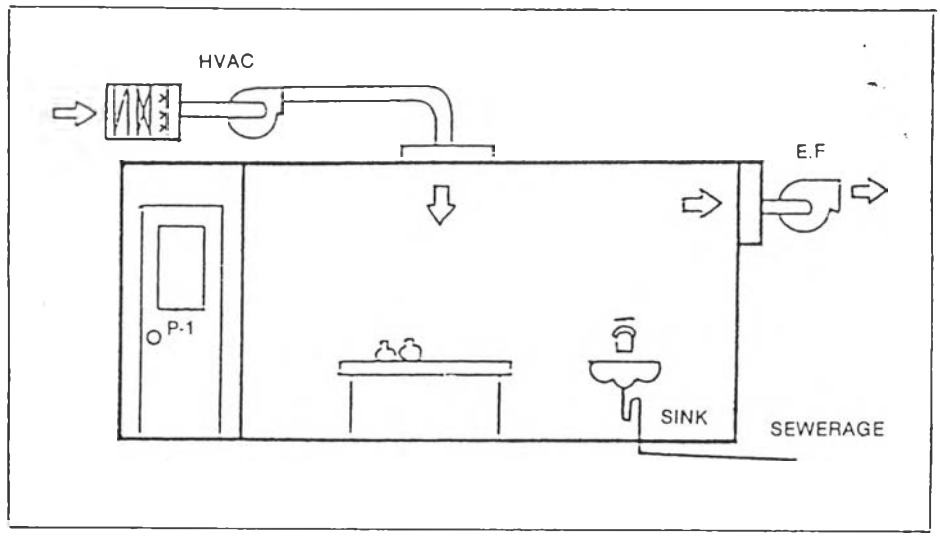
7.6.1 ห้องปฏิบัติการในระดับ BL-2-LS จะใช้สำหรับกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทดลองวิจัยเกี่ยวกับจุลชีพในระดับความร้ายแรงชั้นที่ 2 (Class -2 in danger classification for etiological organism) ตามการจัดแบ่งจุลชีพใน CDC guideline หรือในระดับ BL-2-LS สำหรับจุลชีพพวก Recombinant DNA ตามที่กำหนดใน NIH guideline

7.6.2 ห้องปฏิบัติการจะต้องมีอุปกรณ์ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความร้อนสูงหรือวิธีอื่นที่มีประสิทธิภาพ เพื่อที่จะฆ่าเชื้อปนเปื้อน สำหรับวัสดุต่าง ๆ และของเสียที่เกิดขึ้น (Waste materials) เครื่องจักรอุปกรณ์ต้องได้รับการออกแบบและจัดสร้างสำหรับการทดลอง วิจัยดำเนินการที่เกี่ยวข้องกับการใช้จุลชีพโดยเฉพาะ เช่น เป็นระบบปิดและมีระบบป้องกันการปนเปื้อนของจุลชีพ เป็นต้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 ตัวอย่างห้องปฏิบัติการพื้นฐานระดับ BL-1-LS

ที่มา : Air filtration with emphasis on clean room and energy saving, TPA(Thai-Japan),August 1986 by Tagasaco company staff



7.6.3 เมื่อการดำเนินการหรือปฏิบัติการใดที่ก่อให้เกิดละอองไอ (Aerosol)เช่น การใช้เครื่อง Blender freeze-dryer,เครื่องUltrasonic cell crusher, เครื่อง Centrifugal,เครื่อง separator ซึ่งเกิดละอองได้ง่ายที่ก่อให้เกิดอันตรายทางชีวภาพได้ การปฏิบัติการนั้นจะต้องดำเนินภายในเครื่อง Safety cabinet ระดับชั้นที่ 2 หรือเครื่องปกคลุมอื่น เช่น เต็นท์ ที่ให้สภาวะเงื่อนไขการทำงานเช่นเดียวกันกับข้อกำหนดของเครื่อง Safety cabinet ตามมาตรฐานของ BSI

7.6.4 เครื่อง Safety cabinet หรือเครื่องป้องกันอื่นใดจะต้องมีเนื้อที่มากพอที่จะครอบคลุมอุปกรณ์ที่ใช้ทดลองนั้นได้หมด และสามารถที่จะทำการฆ่าเชื้อด้วยไอสาร Formaldehyde ขนาดความเข้มข้น 10 กรัม ต่อลูกบาศก์เมตร และเครื่องกรองHEPA filters สามารถถอดเปลี่ยนได้ และวัสดุที่ใช้สร้างจะต้องทนทานต่อการสึกกร่อนจากสารฆ่าเชื้อ

7.6.5 อากาศที่ออกจาก Safety cabinet หรือเครื่องคลุมไม่จำเป็นที่จะต้องปล่อยออกสู่นอกห้องโดยตรง อย่างไรก็ตามอาจจะต้องมีท่อสำหรับระบายไอสาร Formaldehyde สำหรับไปปล่อยยังที่เหมาะสม ตัวอย่างห้องปฏิบัติการระดับ BL-2-LS แสดงดังรูปที่ 17

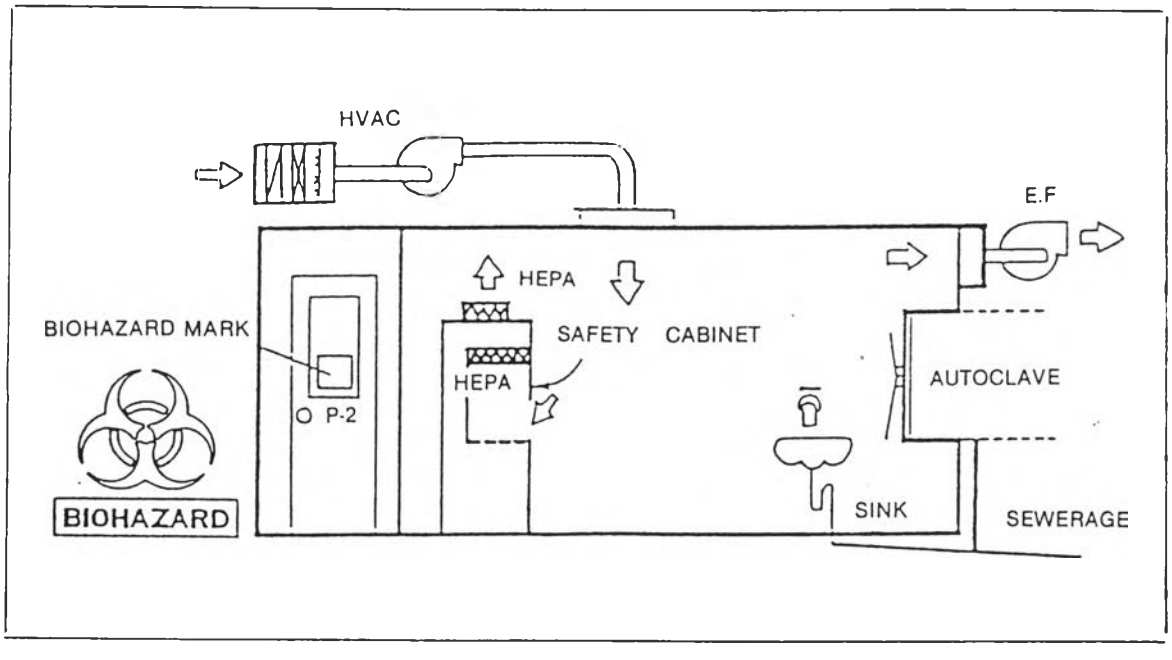
7.7 ข้อกำหนดเบื้องต้นห้องปฏิบัติการนำทางระดับ BL-3-LS

7.7.1 กระบวนการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจะเกี่ยวข้องกับจุลชีพที่มีอันตรายร้ายแรงในระดับชั้นที่ 3 (Class-3 in danger classification for etiological microorganism)ตามการจัดแบ่งจุลชีพใน CDC guideline หรือในระดับ BL-3-LS สำหรับจุลชีพพวก Recombinant DAN ตามที่กำหนดในNIH guideline

7.7.2 ห้องปฏิบัติการระดับ BL-3-LS จะต้องมีห้องพัก (Ante-room) ซึ่งจะแยกห้องปฏิบัติการออกจากบริเวณภายนอกด้วยประตูล็อกอากาศ 2 ชั้น (Double air tightdoor) ห้องเปลี่ยนเสื้อผ้าจะอยู่

รูปที่ 17 ตัวอย่างห้องปฏิบัติการระดับ BL-2-LS

ที่มา : Air filtration with emphasis on clean room and energy saving, TPA(Thai-Japan),August 1986 by Tagasaco company staff



ในบริเวณห้องพัก

7.7.3 หน้าต่างจะต้องผนึกแน่น ความกดดันอากาศภายในห้องปฏิบัติการ จะต้องต่ำกว่าความดันบรรยากาศ เพื่อที่ว่าการไหลของอากาศจะไหลจากห้องพัก(Ante-room) ไปยังห้องปฏิบัติการ ความกดดันของอากาศในห้องปฏิบัติการและห้องสนับสนุนอื่น ๆ ในบริเวณควบคุม จะต้องต่ำกว่าบริเวณที่โดยรอบไม่น้อยกว่า - 2 มิลลิเมตรปรอท

7.7.4 การทดลองปฏิบัติการใดที่กระทำในห้องปฏิบัติการนี้ จะต้องดำเนินภายใต้เครื่อง Safety cabinet ระดับชั้นที่ II-A หรือ II-B หรือชุดอุปกรณ์อื่นใดที่มีสภาวะเงื่อนไขเดียวกัน เช่น ตู้สะอาด (Clean booth) หรือเต้นท์สะอาด(Clean tent) อากาศที่ระบายจากห้องปฏิบัติการจะต้องผ่านเครื่องกรอง HEPA filter เพื่อขจัดจุลชีพก่อนระบายทิ้งสู่ภายนอก

7.7.5 อากาศจาก Safety cabinet จะต้องระบายสู่ภายนอกห้องปฏิบัติการโดยผ่านเครื่องกรอง HEPA filter ก่อนห้ามปล่อยทิ้งภายในห้องปฏิบัติการโดยตรง

7.7.6 ผิวหน้าสำเร็จของพื้น ผนัง และหลังคาของห้องปฏิบัติการ วิธีการก่อสร้างและวัสดุที่ใช้ จะต้องสามารถทำความสะอาดได้ง่าย และทนทานต่อการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ ระบบท่อและสายต่าง ๆ ที่ผ่านเข้าสู่ห้องปฏิบัติการจะต้องปิดผนึกอย่างสมบูรณ์ หลอดไฟและขั้วไฟตลอดจนแผงวงจรควบคุมต่าง ๆ จะต้องก่อสร้างในลักษณะปิดผนึก (Air tight)

7.7.7 ท่อระบายของเสียของห้องปฏิบัติการ ก่อนปล่อยของเสียสู่ภายนอกบริเวณควบคุมจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารเคมี หรือวิธีการอื่นที่เหมาะสม เช่น ใช้คลอรีน ด้วยความเข้มข้นมากกว่า 500 มก/ล ทิ้งไว้นาน 12 ถึง 24 ชั่วโมง หรือโดยใช้ความร้อน 120° C เป็นเวลา 30 นาที ของเสียที่เป็นของแข็งทุกชนิดจะต้องทำการเผาก่อนนำไปทิ้งภายนอก

7.7.8 เครื่องกรอง HEPA filter จะต้องสามารถถอดนำมาฆ่าเชื้อด้วย Formalin injection by steam ejector ใบพัดลมทุกชนิดทั้งที่ดูดอากาศเข้าและระบายอากาศออก จะต้อง Duplicated for back up

function ได้

7.7.9 ระบบไฟฟ้าสำหรับควบคุมความดันอากาศภายในห้องจะต้องมีสำรองสำหรับทดแทนในกรณีเกิดเหตุฉุกเฉิน ในระบบควบคุมแต่ละชุดจะต้องมีสัญญาณเตือน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเกินกว่าจุดที่ตั้งไว้

ตัวอย่างห้องปฏิบัติการระดับ BL-3-LS แสดงดังรูปที่ 18

รูปที่ 18 ตัวอย่างห้องปฏิบัติการระดับ BL-3-LS

ที่มา : Air filtration with emphasis on clean room and energy saving, TPA(Thai-Japan),August 1986 by Tagasaco company staff