สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

โรคไข้หวัดนก หรือโรคเอเวียนอินฟลูเอนซา (avian influenza) เป็นโรคระบาดที่ก่อให้เกิดความผิดปกติส่วนใหญ่ของระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีกหลายชนิด (Swayne and Halvorson, 2003) นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังสามารถติดต่อจากสัตว์ปีกสู่คน ทำให้คนที่ติดเชื้อแสดงอาการป่วยและตายได้ (WHO, 2006) ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาสัตว์ปีกที่ติดเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สำหรับการป้องกันโดยการใช้วัคซีนยังคงเป็นข้อถกเถียงกันถึงผลดี ผลเสีย และผลที่ตามมาภายหลังจากการใช้วัคซีน (Stephenson et al., 2004) ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดคือการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ซึ่งวิธีการหนึ่งที่สามารถกำจัดหรือลดปริมาณของเชื้อไวรัสโดยอาศัยปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เช่น การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ และการใช้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง หรือการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น

การศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้เตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาจากตัวอย่าง ปอด ลำไส้ และตับ ซึ่งเก็บมาจากแหล่งที่พบการระบาดในประเทศไทย ช่วงเดือนมกราคม 2547 จำนวน 8 ตัวอย่าง และได้นำมาเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน โดยวิธีการที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส เป็นวิธีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับให้ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสดังกล่าวกันอย่างแพร่หลาย (Swayne et al., 1998) หลังจากเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสได้ในปริมาณที่ต้องการ สุ่มเลือกตัวอย่างเชื้อไวรัสมา 3 ตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาความความสามารถในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน ซึ่งวิธีการคำนวณได้อ้างอิงมาจาก Reed และ Munch (1938) ผลการคำนวณหาความสามารถในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเชื้อไวรัสทั้งหมด 3 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นในศึกษาครั้งนี้มีความสามารถในการติดเชื้ออยู่ที่ 10^{9} $10^{8.25}$ และ $10^{8.5}$ ELD_{50}/1ml ตามลำดับ โดยความสามารถในการติดเชื้อต่ำสุดที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ10^{3}–10^{4} EID_{50}/1 มิลลิลิตร (OIE, 2000) แต่จากการศึกษาของ Swayne และ Halvorson (2003) พบว่าปริมาณของเชื้อไวรัสที่สามารถขับออกมาจากระบบทางเดินหายใจของไก่ที่ติดเชื้อคือ $10^{4.2}$-$10^{7.7}$ EID_{50} /1ml และที่ขับออกมาพร้อมกับกับอุจจาระคือ $10^{2.5}$-$10^{4.5}$ EID_{50}/1gram feces และจากการศึกษาของ Webster และคณะ (1978) พบว่าเป็ดสามารถขับเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ออกมาพร้อมกับอุจจาระได้ในปริมาณสูงถึง $10^{8.7}$ EID_{50}/gram feces ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อสูงสุดคือ 10^{9} ELD_{50}/1ml มาใช้ทำการศึกษาต่อไป

เนื่องจากที่บริเวณเปลือกของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซามีโปรตีน HA ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับเม็ดเลือดแดงทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ดังนั้นจึงได้นำเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อสูงที่สุดคือ 10^9 ELD_{50}/1ml มาทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นมานั้นเป็นเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยผลการทดสอบพบว่าเชื้อไวรัสมี HA titers เท่ากับ 256/25 µl จากนั้นได้ทำการตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่างอีกครั้งด้วยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งผลการตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR พบว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่าง เป็นเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 โดยวิธี multiplex RT-PCR เป็นวิธีทำให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน การใช้ primer มากกว่า 1 คู่วิธี multiplex RT-PCR นั้นมีข้อดีกว่าวิธี RT-PCR คือประหยัดเวลาและเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ในกรณีเพื่อการตรวจวินิจฉัย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR รวมถึงลดโอกาสการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำ PCR หลายขั้นตอน (Spackman et al, 2003) และผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อไวรัสที่องความเหมือนกันเฉลี่ยอยู่ที่ 99.695 แยกได้ทั้ง 8 ตัวอย่างนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันและวัดว่าเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกันคือมีร้อยละ ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของ Nobusawa และคณะ (1991) ที่กล่าวว่าเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา ที่มีร้อยละของความเหมือนกัน (% identity) ของยีนฮีแมกกลูตินินเท่ากับ 80-90% จัดเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และสภาวะความเป็นกรด-ด่าง โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ให้ผลดีในการศึกษาครั้งนี้คือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลูตาร์ลดีไฮด์ และจากการทดสอบความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที เป็นอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัสมีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 3 ถึง 12 ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที

เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาเป็นเชื้อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ง่าย ดังเช่น การใช้สารเคมีต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมันสามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ โดยในปี 1940 นั้น Stock และคณะได้ทำการศึกษาการทำลายเชื้อต่อเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาโดยใช้สบู่ ซึ่งเตรียมมาจากกรดอินทรีย์และกรดไขมันเช่น กรดโอลีอิค (oleic acid) กรดไลโนลิค (linolic acid) เป็นต้น โดยผลการทดลองพบว่าสบู่ที่เตรียมขึ้นสามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้ที่

ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกต่อน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อทุกชนิดเมื่อเจือจางสัดส่วนตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตทันทีและนำมาฆ่าเชื้อ สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ทวีศักดิ์ และคณะ (2546) ที่ทำการทดลองโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ 15 ชนิด พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่มกลูตารัลดีไฮด์ ฟีนอล กรดเปอร์อะซิติก กลุ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ และกลุ่มแอซิดไฮเปอร์คลอไรต์ สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาได้ นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม (ppm) โซเดียมไฮโปครอไรด์ 1,000 ppm ของเบนซัลโคเนียม คลอไรด์ 0.02% ของกลูตารัลดีไฮด์ สามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้ (Prince et al., 2001) และจากการศึกษาของ Armstrong และ Froelich (1964) พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อเบนซาโคเนียมคลอไรด์สามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0.025 mg/ml ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือจากการศึกษาของ Davison และคณะ (1999) ที่ทดสอบน้ำยาฆ่าเชื้อ 4 ชนิด คือ ฟีนอล สารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียม และ สารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียมรวมกับฟอร์มัลดีไฮด์ พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิดนั้นสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นตามคำแนะนำของบริษัท หรือจากการศึกษาของ Mbithi และคณะ (1990) พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่นิยมใช้โดยทั่วไปได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ไอโอดีน สารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียม และฟีนอล เมื่อผสมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตสามารถทำลายเชื้อไวรัสตับอักเสบ ชนิดเอได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อ กลูตารัลดีไฮด์ให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาฆ่าเชื้ออีก 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bovallius และ Anas (1977) ที่ทำการศึกษาโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ กลูตารัลดีไฮด์และฟอร์มัลดีไฮด์ในการทำลายเชื้อ *Escherichia coli* และ เชื้อ *Bacillus cereus* โดยผลการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากันกลูตารัลดีไฮด์จะให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้ดีกว่าและฟอร์มัลดีไฮด์ และเมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิดสูงกว่าการเก็บรักษาน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yilmaz และ Kaleta (2003) ที่ทำการทดลองโดยใช้กรดมด (formic acid) และน้ำยาฆ่าเชื้ออีก 3 ชนิด ได้แก่ Lysovet PA® ซึ่งมีฟอร์มัลดีไฮด์ และกลูตารัลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ น้ำยาฆ่าเชื้อ TAD CID® ซึ่งมีฟอร์มัลดีไฮด์ และกลูตารัลดีไฮด์ เป็นส่วนประกอบ และน้ำยาฆ่าเชื้อ Wofasteril E® ร่วมกับน้ำยาฆ่าเชื้อ Alcapur® ในการทำลายเชื้อ bovine enterovirus type 1 (ECBO virus) mammalian orthoreovirus type 1 และ bovine adenovirus type 1 (BAV 1) ที่อุณหภูมิ 10 และ 20 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองพบว่ากรดมดและน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการ

ทดสอบนี้ สามารถทำลายเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกชนิด โดยที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะให้ผลในการทำลายเชื้อได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส หรือจากการทดลอง Hart และ Ng (1975) พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจาก 16 องศาเซลเซียส เป็น 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ประสิทธิภาพของ 70% ไอโซโพรพิว แอลกอฮอล์ ต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพิ่มสูงขึ้น และจากการทดลองของ Charlton และ Levine (1935) ทำการทดลองโดยใช้คลอรามีนที (chloramine-T) ซึ่งเป็นสารกำจัดเชื้อรา โดยจะแตกตัวให้กรดไฮโปรครอรัส (hypochlorous acid หรือ HOCl) ในการทำลายเชื้อ *Bacillus metiens* ที่อุณหภูมิ 25 35 45 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้สูงสุด และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายเชื้อเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส คือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ โดยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และนำมาทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาพบว่าอัตราการรอดชีวิตของไข่ไก่ฟักในครั้งแรก และครั้งที่ 2 สูงที่สุด หรือหมายความว่าเชื้อไวรัสไม่มีความคงทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาฆ่าเชื้อฟีนอล ฟอร์มาลีน และควอเตอนารีแอมโมเนียม อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Thomas และ Russell (1974) พบว่าการเก็บรักษาน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาฆ่าเชื้อเปลี่ยนไป โดยที่อุณหภูมิสูงทำให้น้ำยาฆ่าเชื้อมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อ ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ลดลง ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากในการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการบันทึกค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาฆ่าเชื้อ

เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานมากกว่า 30 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 4 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Hayden and Palese, 1997) และจากการศึกษาของ Stallknecht และคณะ (1990) พบว่าเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงสามารถมีชีวิตได้นาน 126-207 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตได้นาน 30-102 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตได้นานถึง 30-35 วัน ในมูลไก่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตได้นานถึง 7 วัน ในมูลไก่ที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Swayne and Halvorson, 2003) โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิที่ต่างกันได้แก่ อุณหภูมิ 55 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเลือกใช้ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที เป็นอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถทำให้โปรตีนในซีรัมเสื่อมสภาพ (Schlesinger et al., 1990) และที่ช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization) ซึ่งโดยมากนิยมใช้ที่

อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที (Zinsser, 1992) ส่วนอุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส ตรงบริเวณจุดศูนย์กลาง (core temperature) ที่ระยะเวลา 1 วินาที เป็นช่วงอุณหภูมิที่ได้มีการแนะนำว่าสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูซาในผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกได้ (OIE, 2006) โดยผลการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 ได้คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที โดยตรวจไม่พบการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง ในขณะที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ได้ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ King (1991) พบว่าที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N2 ได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสยังสามารถจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงได้ และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N2 ได้โดยตรวจไม่พบการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง และจากการศึกษาของ Lu และคณะ (2003) พบว่าที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 40 และ 60 นาที ไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ที่ทำการศึกษาช่วงอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Lu และคณะ (2003) พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้ ในขณะที่การศึกษาของ Swayne และ Beck (2004) พบว่าที่อุณหภูมิ 55, 57, 59, 61 และ 63 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงและก่อโรคไม่รุนแรงที่อยู่ในไข่แดงได้

จากการศึกษาลักษณะความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3 ถึง 12 โดยการเลือกใช้ช่วง pH ดังกล่าวเนื่องมาจากพบว่าที่ระดับ pH 3 เป็นระดับ pH ที่ยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยมาก่อน และที่ระดับ pH 5 พบว่าเป็นระดับ pH ที่ใช้ในขบวนการรวมตัว (fusion) ของ host cell กับส่วนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส (Huang et al., 1981) ในขณะที่ระดับ pH 6 ถึง 8 เป็นช่วง pH ของน้ำสะอาดภายหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน นอกจากนี้คลอรีนยังนิยมใช้ในการทำความสะอาดสระว่ายน้ำด้วย (Zuane, 1990) และที่ระดับ pH 12 พบว่าเป็นระดับ pH ของปูนขาวภายหลังจากละลายน้ำ (Westernlime, 2006) ซึ่งปูนขาวนิยมใช้ในการฆ่าเชื้อโรคภายในฟาร์ม โดยผลจากการศึกษาลักษณะความคงทนของเชื้อไวรัสต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 มีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3 ถึง pH 12 ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Lu และ คณะ (2003) ที่ได้ทำการศึกษาถึงผลของ pH ที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ pH 2 5 7 10 และ 12 ต่อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H7N2 จากการศึกษาพบว่าที่ระดับ pH 2

ระยะเวลา 5 นาที เท่านั้นที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Scholtissek (1985) ที่ได้ทำการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง ได้แก่ H5 และ H7 และสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงได้แก่ H1 H3 และ H11 ต่อสภาพความเป็นกรดที่ระดับ pH 5.2 พบว่าที่ระดับ pH ดังกล่าวสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์รุนแรงได้ ในขณะที่เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงมีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรดที่ระดับ pH 5.2 นอกจากนี้เมื่อทำการพิจารณาผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงในการฉีดไข่ไก่ฟักครั้งแรกในกรณีที่เชื้อไวรัสสัมผัสกับสารละลาย pH ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 10 นาที พบว่าที่ระดับ pH 12 ให้ผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 2^6 ที่ pH 9 เท่ากับ 2^4 ที่ pH 7 เท่ากับ 2^4 ที่ pH 5 เท่ากับ 2^4 และที่ระดับ pH 3 พบว่าค่าการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงลดลงมาอยู่ที่ระดับ 2^0 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Henderson และคณะ (1973) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาพความเป็นกรดกับผลการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutinin titer) โดยผลการศึกษาพบว่าผลการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์ต่อสภาพความเป็นกรด กล่าวคือค่าการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงจะลดลงเมื่อระดับ pH เท่ากับ 5 หรือ ระดับ pH ต่ำกว่า 5 แต่ในการศึกษาครั้งนี้ในกรณีที่เชื้อไวรัสสัมผัสกับสารละลาย pH ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 5 นาทีพบว่าที่ระดับ pH 5 และ 7 คือ 2^3 ค่าการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง เท่ากับ 2^3 ในขณะที่ระดับ pH 3 ค่าการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงคือ 2^4 นอกจากนี้ผลการจับกลุ่มตกตะกอน เม็ดเลือดแดงจากการฉีดไข่ไก่ฟักในครั้งที่ 2 ที่ระยะเวลา 10 นาที พบว่าค่าการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ระดับ pH 5 และ pH 7 มีค่าการตกตะกอนเม็ดเลือดเท่ากับ 2^5 และที่ pH 9 และ pH 12 มีค่าเท่ากับ 2^4 ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงจากการฉีดไข่ไก่ฟักในครั้งที่ 2 ที่ระยะเวลา 5 นาที พบว่าค่าการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ระดับ pH 3 5 7 และ 9 มีค่าเท่ากัน แต่ที่ระดับ pH 12 พบว่ามีค่าการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่กล่าวมาข้างต้นนั้นยังคงให้ผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ระดับ pH 3 น้อยกว่าที่ระดับ pH 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาพความเป็นกรดมีผลต่อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา และจากการฉีดไข่ไก่ฟักครั้งที่ 2 ซึ่งทางผู้วิจัยได้นำน้ำไข่ไก่ฟักจากไข่ไก่ฟักที่เสียชีวิตในการฉีดครั้งแรกมาฉีดทดสอบในไข่ไก่ฟักอีกครั้ง พบว่าน้ำไข่ไก่ฟักที่ได้จากไข่ไก่ฟักที่เสียชีวิตในครั้งแรกทำให้ไข่ไก่ฟักในครั้งที่ 2 เสียชีวิตได้ แสดงว่าสภาพ pH ดังกล่าวไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาได้ นอกจากนี้เมื่อนำน้ำไข่ไก่ฟักจากไข่ไก่ฟักที่รอดชีวิตในครั้งแรกมาฉีดทดสอบอีกครั้ง พบว่าไข่ไก่ฟักในครั้งที่ 2 เสียชีวิตทั้งหมด แสดงว่ามีเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาอยู่ภายในน้ำไข่ไก่ฟัก แต่การที่ไข่ไก่ฟักรอดชีวิตในการฉีดครั้งแรกเนื่องมาจากเมื่อเชื้อไวรัสสัมผัสกับสารละลายกรดที่ใช้ในการทดสอบ

สารละลายจะทำให้เชื้อไวรัสอ่อนแรงลงไม่สามารถทำให้ไข่ไก่ฟักครั้งแรกตายได้ แต่เมื่อผ่านไข่ไก่ฟักครั้งที่ 2 เชื้อไวรัสอาจเพิ่มจำนวนและความรุนแรงขึ้นทำให้ไข่ไก่ฟักเสียชีวิตได้