

รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ P-13-50154

โครงการ การเฝ้าระวังโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2012 เชิงรุก
ในแหล่งค้างคาวรังโรค

Active surveillance of novel human betacoronavirus in bats

โดย

ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี และคณะ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับงบประมาณสนับสนุนภายใต้แผนงานวิจัยมุ่งเป้า

เพื่อตอบสนองความต้องการในการพัฒนาประเทศด้านสุขภาพและชีวเวชศาสตร์

จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การเฝ้าระวังโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2012 เชิงรุกในแหล่งค้ำคาวรังโรค” สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความร่วมมือและความกรุณาจากหน่วยงานของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ในพื้นที่ต่างๆ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการจับและเก็บตัวอย่างค้ำคาว นอกจากนี้ยังได้รับความร่วมมือในการลงพื้นที่จับและเก็บตัวอย่างค้ำคาวจากนิสิต ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของศูนย์ความร่วมมือองค์การอนามัยโลก ด้านค้นคว้าและอบรม โรคไวรัสสัตว์สู่คน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างค้ำคาว และตรวจหาเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุธา ผู้อำนวยการ ศูนย์โรคติดต่ออุบัติใหม่ สภาภาษาไทย และศูนย์ความร่วมมือองค์การอนามัยโลก ด้านค้นคว้าและอบรม โรคไวรัสสัตว์สู่คน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาแนวทางในการดำเนินงานวิจัยและเขียนบทความวิชาการ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้พื้นที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการดำเนินงานวิจัยมาจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ในฐานะผู้ให้ทุนวิจัย และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในฐานะผู้บริหารจัดการโครงการ ที่เล็งเห็นความสำคัญในการศึกษาโรคอุบัติใหม่จากแหล่งโรคตามธรรมชาติ ก่อนที่โรคจะเกิดการระบาดในคนหรือสัตว์เศรษฐกิจ และสนับสนุนทุนวิจัยในการดำเนินงานครั้งนี้

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และคอยสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยทั้งทางตรงและทางอ้อม รวมทั้งครูบาอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา ตลอดจนบุคคลต่างๆที่มีอาจเอ่ยนามได้หมด อนึ่ง คณะผู้วิจัยหวังว่า ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ในการเตรียมความพร้อมเพื่อรับมือกับโรคอุบัติใหม่ เพื่อประโยชน์ต่อภาคประชาชนและประเทศชาติต่อไป

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2559

บทคัดย่อ

ค้างคาวเป็นแหล่งรังโรคของไวรัสโคโรนา (Coronavirus, CoV) หลายชนิด ทั้ง genus *Alphacoronaviruses* (alphaCoV) และ *Betacoronavirus* (betaCoV) ซึ่งรวมทั้งเชื้อไวรัสที่นำโรคร้ายแรงสู่คน อาทิ ซาร์ส (severe acute respiratory syndrome, SARS) และ เมอร์ส (Middle East respiratory syndrome, MERS) ประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบไวรัสสายพันธุ์ (lineage) เดียวกับ SARS-CoV ในค้างคาวหน้ายักษ์สามหลืบ (*Hipposideros larvatus*) และ สายพันธุ์ MERS-CoV จากมูลค้างคาวไม่ทราบชนิด และยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยค้างคาวอย่างน้อย 139 สปีชีส์ ทั่วประเทศ ซึ่งรวมทั้งค้างคาวไฟ ค้างคาวลูกหนูและค้างคาวปีกถุง ที่มีรายงานการพบไวรัสสายพันธุ์เดียวกับ MERS-CoV ในต่างประเทศ เพื่อสำรวจชนิดค้างคาวในประเทศไทยที่อาจเป็นแหล่งรังโรคของไวรัสสายพันธุ์ MERS-CoV คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาในค้างคาวรวม 645 ตัว ในค้างคาวรวม 33 สปีชีส์ ที่เก็บตัวอย่างระหว่างปี พ.ศ.2554-2558 ในพื้นที่ 10 จังหวัด (13 แหล่ง) โดยใช้ตัวอย่างมูลค้างคาวที่เก็บโดยวิธี rectal swab นำมาสกัดสารพันธุกรรมและตรวจด้วยวิธี PCR ในตำแหน่งยีน RNA-dependent RNA polymerase ผลการตรวจพบไวรัสโคโรนา 57 ตัวอย่าง, ร้อยละ 8.8 โดยพบไวรัส alphaCoV 19 ตัวอย่าง, betaCoV 36 ตัวอย่าง และพบไวรัส 2 genus ในค้างคาวตัวเดียวกันจำนวน 2 ตัวอย่าง ทั้งนี้พบไวรัสสายพันธุ์ MERS-CoV ซึ่งอยู่ในกลุ่ม betaCoV lineage C จำนวน 8 ตัวอย่าง จากค้างคาวไฟหัวแบน (*Tylonycteris robustula*) 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นค้างคาว genus เดียวกับที่พบเชื้อไวรัสในในประเทศจีน และค้างคาวปากย่น (*Chaerephon plicata*) 6 ตัวอย่าง ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ยังพบไวรัสสายพันธุ์ SARS-CoV จากค้างคาวมงกุฎมลายู (*Rhinolophus malayanus*) 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นค้างคาว genus เดียวกับที่พบเชื้อไวรัสในประเทศจีน การตรวจพบไวรัสสายพันธุ์ MERS-CoV และ SARS-CoV จากตัวอย่างค้างคาวในประเทศไทย เป็นสัญญาณเตือนให้มีการเฝ้าระวังการแพร่เชื้อไวรัสข้ามสายพันธุ์ไปยังสัตว์อื่นที่อาจกลายพันธุ์ติดต่อสู่คนได้ในอนาคต รวมทั้งการติดต่อสู่คนได้โดยตรง นอกเหนือไปจากความเสี่ยงจากการติดเชื้อจากผู้ป่วย MERS-CoV ซึ่งปัจจุบันพบผู้ป่วยในประเทศไทยแล้ว 2 ราย จากผู้ป่วยชาวโอมาน ซึ่งผลการถอดรหัสพันธุกรรม whole genome พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่พบการระบาดที่ประเทศเกาหลีในปี พ.ศ.2558 การตรวจวินิจฉัยสาเหตุของโรคในผู้ป่วยอย่างรวดเร็ว รวมทั้งการค้นหาเชื้อโรคใหม่ๆ ที่อาจก่อโรคในมนุษย์จากแหล่งรังโรคตามธรรมชาติ จะสามารถลดขนาดและความรุนแรงของการเกิดโรคระบาดได้ในอนาคต

ABSTRACT

Bats are natural reservoirs of Coronaviruses (CoV), which includes the genera Alphacoronavirus (alphaCoV) and Betacoronavirus (betaCoV). Bat CoVs are also closely related to human pathogens such as severe acute respiratory syndrome (SARS) and the Middle East respiratory syndrome (MERS). Thailand has previously detected viruses in the same lineage as SARS-CoV, in the *Hipposideros larvatus*, and MERS-CoV from unidentified bat guano. Thailand houses 139 different bat species, including *Tylonycteris* spp., *Pipistrellus* spp. and *Tapozous* spp. These species have been reported to carry MERS-CoV in other countries. It is thus important to conduct a study to monitor these bat species and identify the viruses they harbor. Specimens from 645 bats, 33 species, were collected between 2011 and 2015, from 10 provinces (13 locations). Rectal swabs from these bats were analyzed using PCR, specifically for the RNA-dependent RNA polymerase gene. Fifty seven (8.8%) of the samples were positive for CoV; alphaCoV (19/57) and betaCoV (36/57). Two bats were found to be co-infected with viruses of 2 different genera. Eight samples were positive for MERS-CoV lineage, which is classified under betaCoV lineage C. Two of these samples were from *Tylonycteris robustula*, the same bat species previously reported to harbor the virus in China. Six samples were found in the *Chaerephon plicata*, which has never been known to harbor CoV. Two samples from *Rhinolophus malayanus* were also positive for SARS-CoV lineage, also previously reported in China from the same bat genus. Detection of viruses in the same lineage of MERS-CoV and SARS-CoV in Thai bats indicates the need for vigilant zoonotic disease surveillance to monitor virus jump species to new hosts that may cause severe disease in humans or other animals, in addition to the measures in place to contain disease outbreak. Thailand's preparedness and prompt diagnosis of the two imported (from Oman) MERS cases, whose genetic analyses from whole genome sequencing revealed to be the same strain as the outbreak in South Korea, prevented an outbreak in Thailand. Early detection for cause of disease in patient and pre-identification of new pathogens from natural reservoirs that can potentially cause disease in humans can reduce the scale and severity of next outbreak.

Keywords: Coronavirus, Betacoronavirus, MERS-COV, Bat, Emerging infectious Disease

สารบัญเรื่อง

หัวข้อ	หน้า
บทนำ (Introduction)	1
เนื้อเรื่อง	
-วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)	5
-ผลการวิจัย (Result)	12
1. การทดสอบวิธีการที่ใช้ในการตรวจไวรัสโคโรนาในค้างคาว	12
2. ชุดตรวจที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสกลุ่ม MERS-CoV (betaCoV-D)	14
3. ผลการตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR และ ถอดรหัสพันธุกรรม ตัวอย่างค้างคาว มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ	16
4. ผลการตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR และ ถอดรหัสพันธุกรรม ค้างคาวที่จับและ เก็บตัวอย่างระหว่าง เดือน กุมภาพันธ์ 2557-กรกฎาคม 2558	17
5. พื้นที่การพบเชื้อไวรัสโคโรนาจากค้างคาว	18
6. การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมไวรัสโคโรนาจากค้างคาว	22
7) การตรวจตัวอย่างเชื้อไวรัสโคโรนา จากผู้ป่วย MERS รายแรกและรายที่ สอง ของประเทศไทย	23
ข้อวิจารณ์ (Discussion)	32
สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	41

สารบัญตาราง

ตารางที่	หัวข้อ	หน้า
1	รายละเอียด Primers ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	10
2	PCR protocol ที่ใช้ในการตรวจทั้ง 3 วิธี	11
3	ผลการตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR 3 วิธี จากตัวอย่างที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ	15
4	ผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR (Watanabe, Quan และ Annan) ค้างคาวที่เก็บตัวอย่างระหว่าง ธันวาคม 2554-พฤศจิกายน 2555	19
5	ผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR (Watanabe และ Annan) ค้างคาวที่เก็บตัวอย่างระหว่าง กุมภาพันธ์ 2557-กรกฎาคม 2558	20
ภาคผนวก		
A1	รายชื่อ species ค้างคาวที่มีการรายงานพบไวรัสในกลุ่มเดียวกับ MERS CoVที่มีการรายงานตั้งแต่ปี 2006 ถึง ตุลาคม 2014	41
A2	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยวิธี Real-time RT-PCR 3 แบบ (Watanabe et al., 2010, Quan et al., 2010 และ Anan et al., 2013) จำนวน 270 ตัว ที่เก็บจาก 5 แหล่ง ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555	46
A3	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยวิธี Real-time RT-PCR 2 แบบ (Watanabe และ Anan) ค้างคาวจำนวน 375 ตัว ที่เก็บจาก 8 แหล่ง ระหว่าง พ.ศ. 2556-2558	55
A4	รายชื่อค้างคาวในการศึกษารั้งนี้ เรียงตามลำดับอักษรของ Scientific name	68

สารบัญภาพ

รูปที่	หัวข้อ	หน้า
1	แผนที่ประเทศไทย แสดงจุดที่ไปเก็บตัวอย่างค้างคาว	8
2	แสดงขั้นตอนการทำงานในการเก็บตัวอย่างมูลค้างคาว	9
3	ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ Nested PCR product ด้วยวิธีการตรวจแบบ Watanabe	12
4	ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ Nested PCR product ด้วยวิธีการตรวจแบบ Quan	13
5	ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ Nested PCR product ด้วยวิธีการตรวจแบบ Annan	13
6A	Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนาโดยการตรวจด้วยวิธี Watanabe PCR	25
6B	Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนา โดยการตรวจด้วยวิธี Quan PCR	26
6C	Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนาโดยการตรวจด้วยวิธี Annan PCR	27
7	Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนา Betacoronaviruses โดยการตรวจด้วยวิธี Annan PCR	28
8	Phylogenetic tree ของ Whole genome Human MERS CoV จากผู้ป่วยชาวโอมาน 2 รายที่ตรวจพบในประเทศไทย	29
9	Phylogenetic tree ของ Whole genome MERS-CoV จากค้างคาว และผู้ป่วยชาวโอมาน 2 รายที่ตรวจพบในประเทศไทย	30
10	แผนภาพ timeline แสดงระยะเวลาในการทำงานเพื่อตรวจวินิจฉัยไวรัสโคโรนาเมอร์ส จากผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย	31

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัยฯ

CoV: Coronavirus

betaCoV: *Betacoronavirus*

alphaCoV: *Alphacoronavirus*

betaCoV-A: Betacoronavirus lineage A

betaCoV-B: Betacoronavirus lineage B

betaCoV-C: Betacoronavirus lineage C

betaCoV-D: Betacoronavirus lineage D

MERS: Severe Acute respiratory Syndrome

SARS: Severe acute Respiratory Syndrome

PCR: Polymerase Chain Reaction

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

โครงการ การเฝ้าระวังโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2012 เชิงรุกในแหล่งค้างคาวรังโรค

บทนำ (Introduction)

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า ค้างคาวเป็นพาหะนำโรคพิษสุนัขบ้า และเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อไวรัสที่พบในคนและสัตว์ อาทิ ไวรัสน้ำโรค หัด คางทูม หัดสุนัข parainfluenza และ ไวรัสตับอักเสบซี (Drexler et al., 2012; Quan et al., 2013) แต่ไม่นานมานี้ ค้างคาวได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้นจากการที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อโรคติดต่ออุบัติใหม่หลายชนิด ได้แก่ ไวรัส Nipah, Hendra, Ebola, Marburg และรวมทั้ง ไวรัสโคโรนา (Coronavirus, CoV) ซาร์ส (severe acute respiratory syndrome, SARS) และ เมอร์ส (Middle East respiratory syndrome, MERS) ทั้งนี้พบว่าค้างคาวเป็นตัวกลางสำคัญของการแพร่เชื้อข้าม สปีชีส์ ดังกรณีของไวรัสซาร์สที่พบว่ามีต้นกำเนิดจากค้างคาวมงกุฎชนิด *Rhinolophus sinicus* หรือ Chinese horseshoe bats (Lau et al., 2005; Ge et al., 2013) ที่อาจจะแพร่เชื้อสู่มนุษย์โดยตรง หรือมีตัวกลางคือ อีเห็น-palm civet นำโรคสู่คน (Guan et al., 2003) ในส่วนของไวรัส MERS-CoV มีรายงานการพบไวรัสกลุ่มเดียวกันในอูฐและค้างคาว แต่ยังไม่ทราบกลไกการแพร่เชื้อสู่คนที่ชัดเจน (Chan et al., 2015)

ไวรัสโคโรนาเป็นไวรัสชนิด RNA สายบวก มี genome ขนาดใหญ่ ระหว่าง 29-32 kb (Lai et al., 2007) จัดอยู่ใน family Coronaviridae, subfamily Coronavirinae, order Nidovirales (Woo et al., 2006) ประกอบด้วยไวรัส 4 genus ได้แก่ *Alphacoronavirus* (alphaCoV), *Betacoronavirus* (betaCoV), *Gammacoronavirus* และ *Deltacoronavirus* (de Groot et al., 2011) ค้างคาวเป็นแหล่งรังโรคสำคัญของไวรัสโคโรนา alphaCoV และ betaCoV ไวรัสโคโรนาที่มีรายงานว่าก่อโรคในมนุษย์ (HCoV) ประกอบด้วย ไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1, SARS-CoV และ MERS-CoV ทั้งนี้ไวรัส HCoV-229E และ HCoV-NL63 จัดอยู่ใน genus alphaCoV ในขณะที่ไวรัส HCoVs อื่นๆ จัดอยู่ใน genus betaCoV ส่วนไวรัสในกลุ่ม gamma- และ delta-coronavirus มักพบก่อโรคในสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะนก

ไวรัสในกลุ่ม betaCoV พบได้ในค้างคาวหลายชนิดและก่อโรคในคน โดยประกอบด้วยไวรัสอีก 4 สายพันธุ์ (lineage) ได้แก่ lineage A (betaCoV-A) ที่พบในไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจในคน ได้แก่ HCoV-OC43 และ HKU1 และพบในสัตว์อื่น อาทิ สุนัข หนู และค้างคาว, lineage B (betaCoV-B) ประกอบด้วยไวรัสก่อโรคปอดบวมอย่างรุนแรง ได้แก่ ไวรัส SARS-CoV และพบในอีเห็นและค้างคาว, lineage C (betaCoV-C) ประกอบด้วยไวรัส MERS-CoV และพบในค้างคาวที่ประเทศจีน (Woo et al., 2006; Lau et al., 2005) ส่วน lineage D (betaCoV-D) ประกอบด้วยไวรัสที่พบในค้างคาวที่ประเทศจีน และในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย (Wacharapluesadee et al., 2015) แต่ยังไม่มีการรายงานพบในมนุษย์

การค้นพบไวรัส MERS-CoV ครั้งแรกจากผู้ป่วยชาวซาอุดีอาระเบีย เมื่อปี ค.ศ. 2012 ซึ่งขณะนั้นเรียกชื่อว่า human betacoronavirus 2c EMC/2012, HCoV-EMC พบว่าจัดกลุ่มอยู่ในไวรัสโคโรนา genus *Betacoronavirus* lineage C โดย MERS-CoV มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดสายบวก (Positive RNA) ที่มี envelop ขนาดประมาณ 30 kb การเรียงตัวของจีโนม พบว่ามีความคล้ายกับไวรัสในกลุ่ม betaCoV-C ที่พบในค้างคาวมากกว่าไวรัสในกลุ่มอื่นๆ โดยมีการเรียงลำดับจากปลาย 5' ไป 3' ดังนี้ ตำแหน่ง Orf1ab ที่ประกอบด้วยยีน polymerase ที่มีความคงตัวสูง และยีน helicase ตามด้วยยีนที่มีความแปรผันสูง ได้แก่ Spike gene ตามด้วย ยีนของ 5 accessory protein และยีนที่มีความคงตัวสูง ได้แก่ Envelope, Membrane และ Nucleoprotein ตามลำดับ (Chan et al., 2012) เมื่อเปรียบเทียบในระดับ amino acid พบว่ายีนตำแหน่ง RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัส MERS-CoV มีความเหมือนกับไวรัส Bat CoV-HKU4 หรือ HKU5 ร้อยละ 90-92 ในขณะที่ยีนตำแหน่ง Spike มีความเหมือนเพียงร้อยละ 64-67 เท่านั้น

Human MERS-CoV จัดอยู่ใน lineage เดียวกับไวรัสที่พบในค้างคาวที่ประเทศจีนตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 ได้แก่ BCoV-HKU4 จากค้างคาวไผ่หัวแบนเล็ก หรือ Tesser bamboo bats (*Tylonycteris pachypus*) และ BCoV-HKU5 จากค้างคาวลูกหนู หรือ Japanese Pipistrelle bat (*Pipistrellus abramus*) (Woo et al., 2006; Zaki et al., 2012) จึงเป็นข้อสมมุติฐานว่าไวรัสเมอร์สน่าจะเป็นไวรัสสัตว์สู่คน (zoonotic virus) และอาจจะมียีนต้นตอมาจากค้างคาว และมีการศึกษาวิจัยต่อมาว่าพบเชื้อไวรัสโคโรนา lineage เดียวกันนี้จาก ค้างคาวปีกถุง *Taphozous perforatus* ในประเทศซาอุดีอาระเบียที่มีรหัสพันธุกรรม (ขนาด 182 เบส) เหมือนกับ Human MERS-CoV 100% (Memish et al., 2013) และค้างคาวสปีชีส์อื่นๆในทวีปต่างๆ อาทิ แอฟริกา (Ithete et al., 2013), ยุโรป (Annan et al., 2013) และ เอเชีย (Yang et al., 2014) รวมทั้งประเทศไทย (Wacharapluesadee et al., 2013) (รายละเอียดสปีชีส์ค้างคาวที่มีรายงานการพบเชื้อไวรัสกลุ่ม MERS-CoV แสดงในตาราง A1, ภาคผนวก)

การตรวจหาไวรัสโคโรนาจากตัวอย่างค้างคาวนิยมตรวจหาจากมูลหรือ rectal swab (Tong et al., 2009; Gouilh et al., 2011; Woo et al., 2006) ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ที่ตำแหน่งยีน RdRp ซึ่ง Woo และคณะได้ทำการตรวจตัวอย่าง nasopharyngeal swab จากค้างคาว 618 ตัว และ rectal swab จำนวน 309 ตัว พบผลบวกจาก rectal swab จำนวน 37 ตัวอย่าง เท่านั้น ไม่พบใน nasopharyngeal swab ในขณะที่ Gouilh และคณะ ทำการตรวจตัวอย่าง oral swab จำนวน 190 ตัวอย่าง เยี่ยวค้างคาวจำนวน 97 ตัวอย่าง และ มูลค้างคาวจำนวน 265 ตัวอย่าง พบผลบวกเฉพาะตัวอย่างมูลค้างคาวจำนวน 24 ตัวอย่าง ดังนั้นมูลค้างคาวสด หรือ การเก็บด้วยวิธี rectal swab จึงเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาจากค้างคาว

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวอย่างน้อย 139 ชนิด (ที่มีการรายงานอย่างเป็นทางการ) การสำรวจไวรัสโคโรนาจากค้างคาวครั้งแรกในประเทศไทยมีการรายงานเมื่อปี ค.ศ. 2011 ทำการสำรวจในค้างคาว 25 สปีชีส์ พบเชื้อไวรัสในค้างคาว 2 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวหน้ายักษ์สามลิบ พบเชื้อไวรัส betaCoV-B (ไวรัสกลุ่ม SARS) และ ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรรณ พบเชื้อไวรัส alphaCoV (Gouilh et al., 2011) ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 คณะผู้วิจัย (Wacharapluesadee et al., 2013) ได้รายงานการพบเชื้อไวรัส betaCoV-C ในมูลค้างคาวแห่งที่ใช้ทำปุ๋ยชีวภาพ จากจังหวัดราชบุรี แต่ไม่สามารถบ่งบอกสปีชีส์ของค้างคาวได้ และต่อมาได้รายงานความหลากหลายของไวรัสโคโรนาจากค้างคาวในภาคตะวันออกของประเทศไทย (Wacharapluesadee et al., 2015) จากการศึกษาค้างคาว 19 สปีชีส์ จำนวน 626 ตัว พบผลบวกในค้างคาว 13 สปีชีส์ รวม 47 ตัวอย่าง ประกอบด้วย alphaCoV จำนวน 37 ตัวอย่าง betaCoV-B จำนวน 1 ตัวอย่าง betaCoV-D จำนวน 9 ตัวอย่าง แต่ไม่พบไวรัสในกลุ่ม MERS-CoV

จากรายงานการพบเชื้อไวรัสโคโรนาในค้างคาวในประเทศไทย โดยเฉพาะเชื้อไวรัส betaCoV-C ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม MERS-CoV ในตัวอย่างมูลค้างคาวในประเทศไทยแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดค้างคาวได้นั้น (Wacharapluesadee et al., 2013) รวมทั้งความหลากหลายของสปีชีส์ค้างคาวในประเทศไทย ที่บางสปีชีส์มีการรายงานพบเชื้อกลุ่ม MERS-CoV ในต่างประเทศ อาทิ ค้างคาวใน genus *Tylonycteris* (ค้างคาวไฟ) และ *Pipistrellus* (ค้างคาวลูกหนู) ในประเทศจีน รวมทั้งค้างคาว *Taphozous* (ค้างคาวปีกถุง) ในประเทศซาอุดีอาระเบีย ซึ่งเป็นค้างคาวที่พบได้หลายสปีชีส์ในประเทศไทย กล่าวคือ ค้างคาวไฟ 2 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวหัวไฟแบนเล็ก (*Tylonycteris pachypus*) และ ค้างคาวหัวไฟแบนใหญ่ (*T. robustula*) ที่พบแพร่กระจายทั่วประเทศ และค้างคาวลูกหนู จำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวลูกหนูบ้าน (*Pipistrellus javanicus*) และค้างคาวลูกหนูจิ๋ว (*P. tenuis*) พบกระจายได้ทั่วประเทศ ค้างคาวลูกหนูอินเดีย (*P. coromandra*) พบกระจายเกือบทั่วประเทศ ยกเว้นภาคใต้ และค้างคาวลูกหนูปีกแคบ (*P. stenopterus*) พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาลา-บาลา จ.นราธิวาส และค้างคาวปีกถุงรวม 3 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวปีกถุงเคราดำ (*Taphozous melanopogon*) ค้างคาวปีกถุงต่อมคาง (*T. longimanus*) ค้างคาวปีกถุงใหญ่ (*T. theobaldi*) การตรวจหาเชื้อไวรัสเพื่อศึกษาแหล่งรังโรคของไวรัส MERS-CoV ในค้างคาวสปีชีส์ที่มีการรายงานการพบเชื้อมาก่อนในต่างประเทศและสปีชีส์ใหม่ๆ เพื่อให้ทราบชนิดค้างคาวที่มีความสามารถในการนำเชื้อไวรัสกลุ่ม MERS-CoV รวมทั้งความชุก (อัตราการติดเชื้อ) และพื้นที่พบเชื้อ จะสามารถนำมาใช้เป็นระบบเตือนภัย และนำไปสู่การศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกของไวรัส และฤดูกาลที่จะมีการติดเชื้อและแพร่สู่สัตว์อื่นหรือมนุษย์ต่อไป

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักคือ เพื่อค้นหาไวรัสกลุ่ม MERS-CoV ในค้างคาวที่ถือเป็นแหล่งรังโรคสำคัญ พร้อมกับการศึกษาความหลากหลายของเชื้อไวรัสโคโรนาในค้างคาวที่พบในประเทศไทย ที่อาจเป็นเชื้อใหม่และมีแนวโน้มว่าอาจก่อโรคในอนาคต รวมทั้งนิเวศวิทยาของเชื้อไวรัสโคโรนาในค้างคาว

เพื่อคาดการณ์แนวโน้มการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสจากค้างคาวสู่คนและสัตว์อื่น ทั้งนี้การตรวจหาเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการเป็นการฝึกซ้อมและสั่งสมประสบการณ์ในการตรวจหาไวรัส MERS-CoV ได้อีกทางหนึ่ง เพื่อให้เกิดความพร้อมหากพบผู้ป่วยติดเชื้อในประเทศไทยทั้งจากการนำเข้าโดยนักเดินทางหรือการติดเชื้อจากการแพร่ระบาดในประเทศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะทำการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาจากตัวอย่าง rectal swab ของค้างคาวที่พบในประเทศไทยในภูมิภาคต่างๆ โดยเน้นจับและเก็บตัวอย่างจากค้างคาวที่มีรายงานการพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม MERS-CoV มาก่อนทั้งในและต่างประเทศ ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ Pan-coronavirus primer ที่สามารถตรวจจับไวรัสได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน และวิเคราะห์จำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธีการทำ sequencing เพื่อให้สามารถตรวจจับได้ทั้งไวรัสที่เคยมีการรายงานมาก่อนและไวรัสใหม่ ทั้งนี้จะทำการพัฒนาวิธีการตรวจที่เหมาะสมโดยใช้ตัวอย่างที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจ 3 วิธี ในการคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาเชื้อไวรัสกลุ่ม MERS-CoV เพื่อตรวจในตัวอย่างใหม่ที่จะทำการเก็บข้อมูลและตัวอย่างในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างมูลจากค่างคาวจำนวน 645 ตัว (เป้าหมายที่เสนอ 600 ตัว) ประกอบด้วย

1) ตัวอย่างสารสกัดพันธุกรรมมูลค่างคาวที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการศูนย์ความร่วมมือองค์การอนามัยโลก-ไวรัสสัตว์สู่คน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน 270 ตัวอย่าง จากทุนสนับสนุนการวิจัยของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร เมื่อ ปี พ.ศ.2554

2) ค่างคาวที่จับและเก็บตัวอย่าง จากโครงการวิจัยนี้

จำนวน 375 ตัว เริ่มเก็บตัวอย่างระหว่าง มิถุนายน พ.ศ.2557 – กรกฎาคม พ.ศ.2558

2. พื้นที่ศึกษา

2.1 พื้นที่จากการศึกษาเดิม ตัวอย่างค่างคาวของโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สกว. จำนวน 5 แห่ง ค่างคาวจำนวน 270 ตัว

2.1.1 บ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี (A) จำนวน 18 ตัว

2.1.2 วัดถ้ำสาริกา จังหวัดจันทบุรี (B) จำนวน 29 ตัว

2.1.3 วัดเขาถ้ำแรด จังหวัดฉะเชิงเทรา (C) จำนวน 64 ตัว

2.1.4 วัดถ้ำเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว (D) จำนวน 139 ตัว

2.1.5 อำเภอนันทนิคม จังหวัดชลบุรี (E) จำนวน 20 ตัว

2.2 พื้นที่ใหม่จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 8 แห่ง ค่างคาวจำนวน 375 ตัว

2.2.1 ถ้ำค่างคาวเขาช่องพราน จังหวัดตราด (F) จำนวน 100 ตัว

2.2.2 ศูนย์ศึกษาธรรมชาติ เจ็ดคด โป่งก้อนเส้า (G) จังหวัดสระบุรี จำนวน 64 ตัว

2.2.3 สถานีวิจัยลุ่มน้ำแม่กลอง จังหวัดกาญจนบุรี (H) จำนวน 45

2.2.4 อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ (I) จำนวน 43 ตัว

2.2.5 สถานีฝึกลิขิตวนศาสตร์ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (J) จำนวน 33 ตัว

2.2.6 อุทยานแห่งชาติเอราวัณ จังหวัดกาญจนบุรี (K) จำนวน 43 ตัว

2.2.7 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี (L) จำนวน 8 ตัว

2.2.8 สถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ จังหวัดอุทัยธานี (M) จำนวน 39 ตัว

แผนที่แสดงจุดจับและเก็บตัวอย่างค้างคาวจากการศึกษาครั้งนี้ (แสดงโดยสัญลักษณ์อักษร A-M) แสดงดังรูปที่ 1

3. การเก็บตัวอย่างค้างคาว

การขออนุญาต

- โครงการนี้ได้รับอนุมัติดำเนินงานวิจัย จากคณะกรรมการด้านจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU-IACUC) เมื่อวันที่ 6 มีนาคม พ.ศ. 2557 และ ต่ออายุถึงวันที่ 4 มีนาคม 2560
- โครงการนี้ได้รับหนังสืออนุญาตจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ให้เข้าไปทำการศึกษา หรือวิจัยทางวิชาการในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ ลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ.2557 ที่ ทส. 0909.204/25095 อนุมัติให้ดำเนินโครงการศึกษาวิจัย ณ อุทยานแห่งชาติไทรโยค เขตศึกษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว เขตห้ามล่าสัตว์ป่าถ้ำประทุน เขตห้ามล่าสัตว์ป่าถ้ำค้างคาว-เขาค้อพราน ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและท่องเที่ยวเชิงนิเวศเจ็ดคด-โป่งก้อนเส้า และโคโลนีค้างคาวแม่ไก่ภาคกลางในจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระบุรี พระนครศรีอยุธยา อ่างทอง สิงห์บุรี สุพรรณบุรี และสมุทรสาคร ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน พ.ศ.2556-30 กันยายน พ.ศ.2561

วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. ลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างจากค้างคาวโดยการดักจับด้วยตาข่าย mist net หรือ harp trap ซึ่งเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานสากล และเป็นวิธีการที่ไม่เป็นอันตรายต่อค้างคาว (non-invasive)

2. การจำแนกสปีชีส์ค้างคาวโดยผู้เชี่ยวชาญ ค้างคาวทุกตัวจะได้รับการตรวจและจำแนกสปีชีส์ โดยผู้เชี่ยวชาญจากคณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยการวัดขนาดปีก ความยาวลำตัว และเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพกับ index key

3. เก็บตัวอย่างมูลค้างคาวด้วยวิธีการทำ rectal swab หลังจากนั้นนำ swab ใส่ในหลอดน้ำยา Lysis Buffer ที่จะทำหน้าที่ฆ่าเชื้อไวรัสและปกป้องสารพันธุกรรม (RNA) ของไวรัส ไม่ให้ถูกทำลายก่อนการตรวจ นำตัวอย่างแช่เย็นในกระติกน้ำแข็ง และส่งมายังห้องปฏิบัติการภายใน 48 ชั่วโมง

4. เก็บตัวอย่าง rectal swab ในน้ำยา Lysis Buffer ที่ตู้แช่แข็ง -80°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ตรวจเชื้อไวรัสโคโรนา

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR

1. สกัดสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่ โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมรวม (total nucleic acid) แบบสำเร็จรูป (EasyMag, bioMerieux, Netherland)

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยวิธี Nested RT-PCR (ตารางที่ 1-2) ด้วยวิธีการ 3 แบบ โดยทั้ง 3 วิธี เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) แต่อยู่คนละตำแหน่ง และมีขนาดที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.1 ตรวจ ไวรัสโคโรนา กลุ่มทั่วไป ด้วย primers ที่มีคุณสมบัติในการตรวจจับไวรัสโคโรนาแบบ universal โดยใช้ primer ของยีน RdRp ที่ดัดแปลงจาก Watanabe และคณะ (Watanabe et al., 2010) ซึ่งจะทำให้การเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่ง 14,370-14,750 เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีนของ HCoV-229E (accession no. AF304460) โดยมี ขนาด amplicon ของ second round PCR = 434 เบส (ตารางที่ 1)

2.2 ตรวจ ไวรัสโคโรนา กลุ่ม SARS-CoV โดยใช้ primer เพิ่มปริมาณยีน RdRp ด้วย primer ที่รายงานโดย Quan และคณะ (Quan et al., 2010) ซึ่งจะทำให้การเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่ง 17,480-17,820 เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีนของ HCoV-229E (accession no. AF304460) โดยมี ขนาด amplicon ของ second round PCR = 328 เบส (ตารางที่ 1)

2.3 ตรวจ ไวรัสโคโรนา กลุ่ม betaCoV ด้วย primers ที่มีความจำเพาะต่อ betaCoV โดยใช้ primer เพิ่มปริมาณยีน RdRp (Annan et al., 2013) ซึ่งจะทำให้การเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่ง 15,049-15,290 เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีนของ HCoV-229E (accession no. AF304460) โดยมี ขนาด amplicon ของ second round PCR = 228 เบส (ตารางที่ 1)

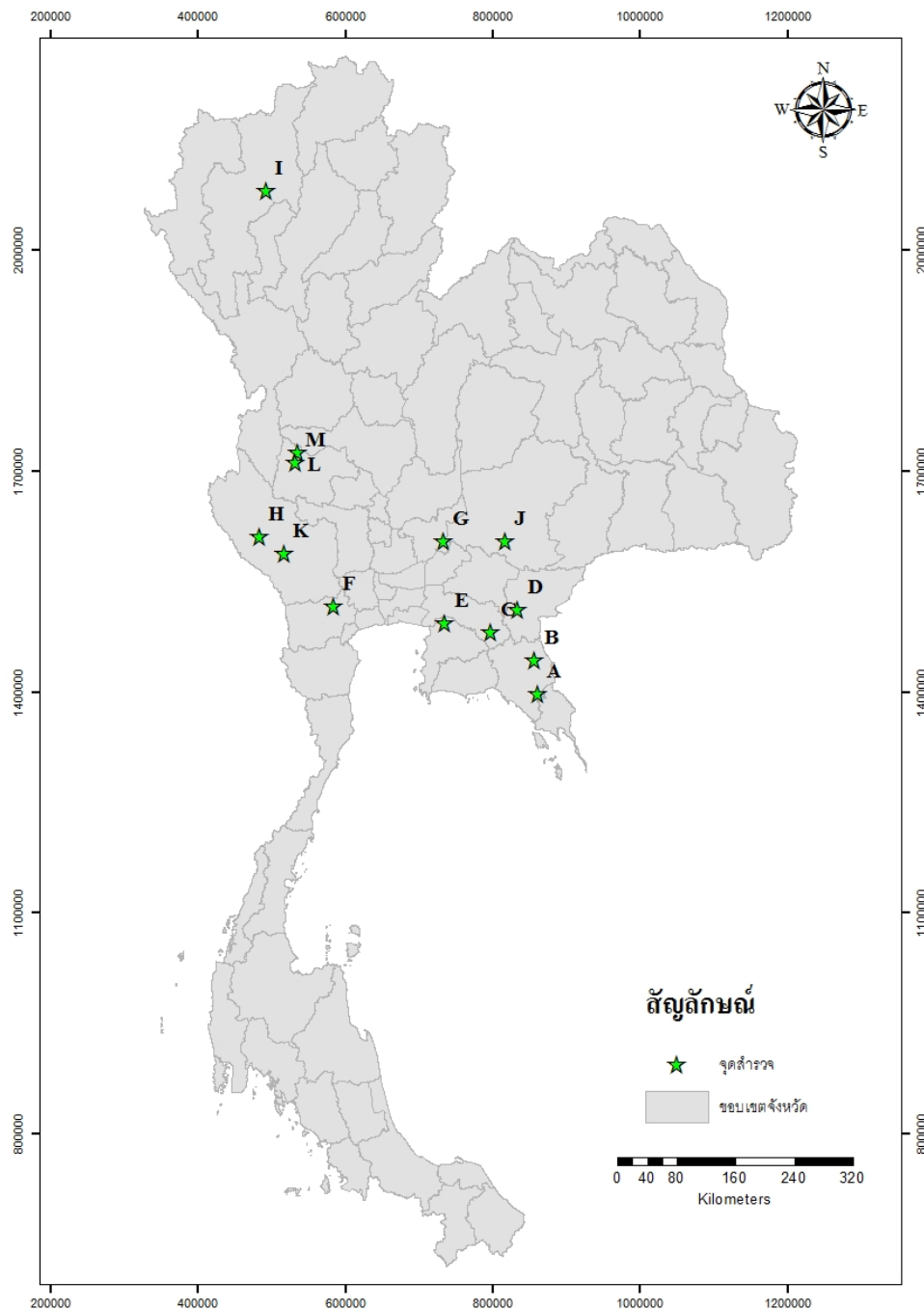
3. กรณีที่พบผลบวก PCR ทำการตรวจยืนยันด้วยวิธีการถอดรหัสพันธุกรรม และตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสด้วยการ Blast เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงใน GenBank โดย nested PCR ในแต่ละวิธี จะได้ความยาวของรหัสพันธุกรรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่แตกต่างกัน ดังนี้

-การถอดรหัสพันธุกรรมจาก วิธี Watanabe จะได้รหัสพันธุกรรมขนาด 357 bp

-การถอดรหัสพันธุกรรมจาก วิธี Quan จะได้รหัสพันธุกรรมขนาด 270 bp

-การถอดรหัสพันธุกรรมจาก วิธี Annan จะได้รหัสพันธุกรรมขนาด 152 bp

4. วิเคราะห์ห้วงควานวิวัฒนาการของไวรัสด้วยการสร้าง Phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างและจำแนกกลุ่มไวรัสโคโรนาที่พบ ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ GTR+G model of evolution และทำ 1000 bootstrap ด้วยเทคนิค RAXML(Randomized Axelerated Maximum Likelihood) และแสดงภาพด้วย FigTree v1.4.2



รูปที่ 1 แผนที่ประเทศไทย แสดงจุดที่ไปเก็บตัวอย่างค้างคาว เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา A. บ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี, B. วัดถ้ำสาริกา จังหวัดจันทบุรี, C. วัดเขาถ้ำแรด จังหวัดฉะเชิงเทรา, D. วัดถ้ำเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว, E. อำเภอนันทนิคม จังหวัดชลบุรี, F. ถ้ำค้างคาวเขาช่องพราน จังหวัดราชบุรี, G. ศูนย์ศึกษาธรรมชาติ เจ็ดคต โป่งก้อนเส้า จังหวัดสระบุรี, H. สถานีวิจัยลุ่มน้ำแม่กลอง จังหวัดกาญจนบุรี, I. อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่, J. สถานีฝักินสิตวนศาสตร์ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา, K. อุทยานแห่งชาติเอราวัณ จ.กาญจนบุรี, L. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี, M. สถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ จ.อุทัยธานี



Mist net

Harp Trap



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการทำงานในการเก็บตัวอย่างมูลค้างคาว (rectal swab) เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา ค้างคาวจะถูกจับในเวลาเย็นตอนออกหากินด้วยตาข่าย หรือเครื่องดักจับ Harp Trap (บน) จากนั้นนำใส่ในถุงผ้าดิบ ระหว่างรอ เพื่อทำการวัดขนาดปีก ลำตัวและศึกษาลักษณะทางกายภาพ เพื่อระบุ species และทำการเก็บตัวอย่าง rectal swab เลือด น้ำลาย และเยี่ยว (ถ้ามี) ทั้งนี้ในการศึกษาเชื้อไวรัสโคโรนาจะตรวจเฉพาะใน rectal swab หรือ มูลเท่านั้น

ตารางที่ 1 รายละเอียด Primers ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

Protocol	Primer
Watanabe	<u>First round PCR</u> Forward: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' (primer 1) Reverse: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCATA-3' (primer 2) <u>Second round</u> Forward: 5'-GACTATCCTAAGTGTGAAGAGC-3' (primer 1) Reverse: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCATA-3' (primer 2) Target: RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) AMPLICON:: 1st round 440 bp / 2nd round 434 bp
Quan	<u>First round PCR</u> Forward: 5'-CGTTGGIACWAAYBTVCWYTICARBTRGG-3' Reverse: 5'-GGTCATKATAGCRTCAVMASWWGCNACNACATG-3' <u>Second round</u> Forward: 5'-GGCWCCWCCHGGNGARCAATT-3; Reverse: 5'-GGWAWCCCCAYTGYTGWAYRTC-3' Target: RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) AMPLICON: 1st round 520 bp / 2nd round 328 bp
Annan	<u>First round PCR</u> Forward: 5'-TGC TAT WAG TGC TAA GAA TAG RGC-3' Reverse: 5'- GCA TWG CNC WGT CAC ACT TAG G 3' <u>Second round</u> Forward: 5'-TGC TAT WAG TGC TAA GAA TAG RGC-3' Reverse: CAC TTA GGR TAR TCC CAW CCC A Target: RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) AMPLICON: 1st round 242bp / 2nd round 228 bp

ตารางที่ 2 PCR protocol ที่ใช้ในการตรวจทั้ง 3 วิธี (PCR protocol เดียวกัน)

A. First Round PCR

MasterMix	25µl, single rxn, µl	Cycler:
H2O (RNase free)	4.1	50°C 20'
MgSO4(50mM)	0.4	94°C 3'
2x Reaction mix*	12.5	45 cyclers of
Fwd primer (10 µM)	1	94°C 15''
Rev primer (10 µM)	1	56°C 15''
SSIII/Taq EnzymeMix*	1	72°C 30''
Total	20	Then
+ Template RNA	5	72°C 2'

' = minutes; '' = seconds

*Invitrogen: SuperScriptIII OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase

B. Second round

MasterMix	50 µl, single rxn, µl	Cycler:
H2O (RNase free)	36.8	94°C 3'
10xRx Buffer*	5	
MgCl2(50mM)*	2	45 cyclers of
dNTPs(10mM each)	1	94°C 15''
Fwd-Primer(10 µM)	2	56°C 15''
Rev-Primer (10 µM)	2	72°C 30''
Taq Enzyme	0.2	Then
Total	49	72°C 2'
Template DNA received from the first round (µl)	5	

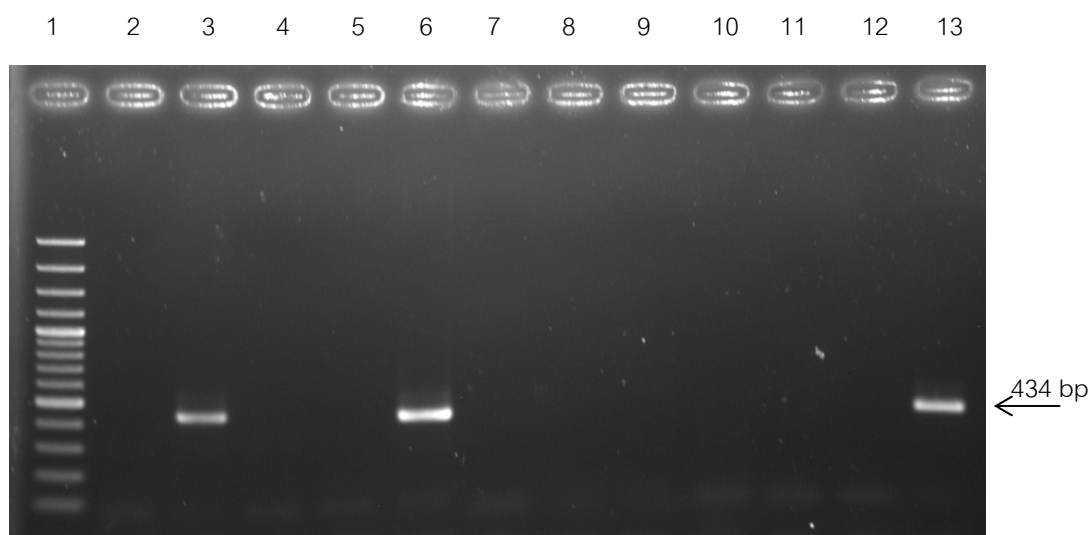
' = minutes; '' = seconds

ผลการวิจัย (Result)

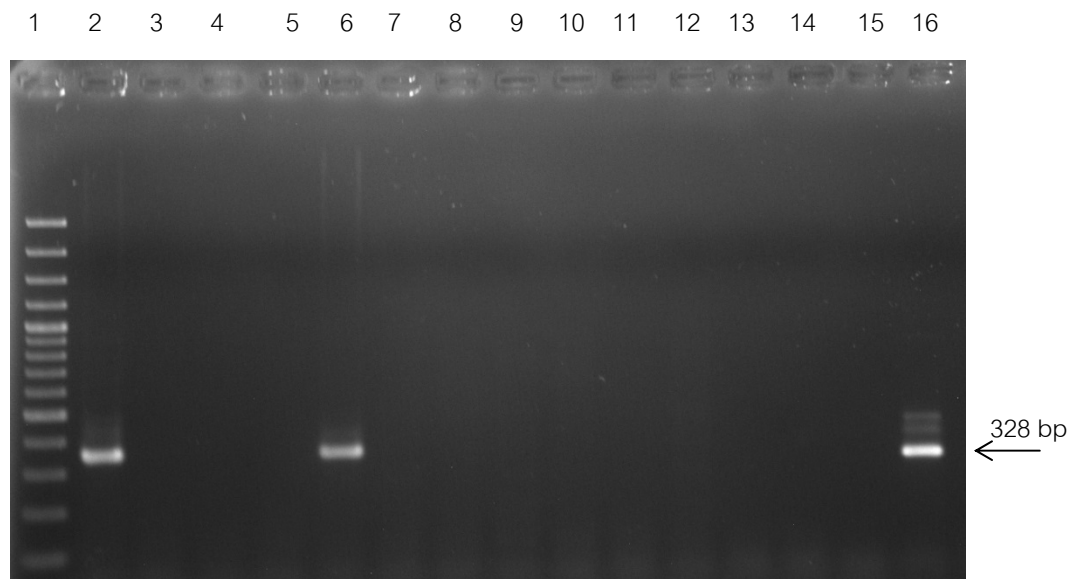
1. การทดสอบวิธีการที่ใช้ในการตรวจไวรัสโคโรนาในค้างคาว

การทบทวนวรรณกรรม เรื่องวิธีการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR จากผลงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าวิธีการที่เหมาะสมต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย 3 วิธี ได้แก่ วิธีของ Watanabe et al., 2010 ที่มีความเหมาะสมในการตรวจจับไวรัสโคโรนาจากค้างคาวทั่วไป, วิธีของ Quan et al., 2010 ที่มีความสามารถในการตรวจจับไวรัสโคโรนากลุ่ม SARS และ วิธีของ Annan et al., 2013 ที่มีความสามารถในการตรวจจับไวรัสโคโรนากลุ่ม betaCoV และรวมทั้ง MERS CoV

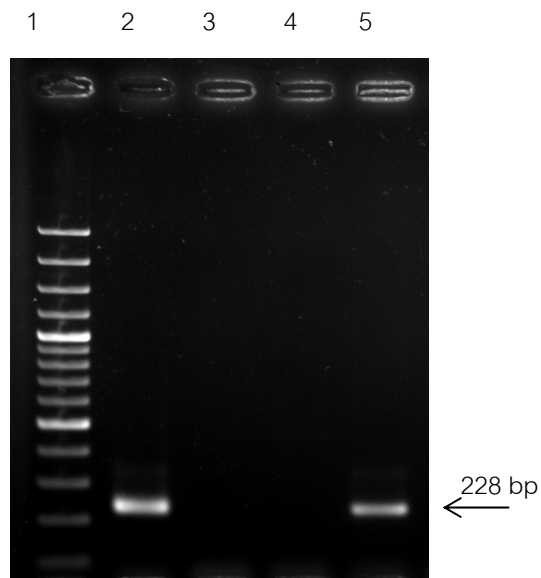
วิธี PCR ทั้ง 3 แบบ เมื่อนำทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดพันธุกรรมจากมูลค้างคาวของการศึกษาครั้งนี้ พบว่าได้ผล PCR ตรงกับขนาดสารพันธุกรรมในเอกสารอ้างอิง และไม่พบ nonspecific band ในตัวอย่างที่ให้ผลลบ ดังแสดงในรูปที่ 3-5



รูปที่ 3 ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ Nested PCR product ด้วยวิธีการตรวจแบบ Watanabe มี amplicon ขนาด 434 bp, Lane No. 1 = 100 bp markers; No.3, 6 = ตัวอย่างให้ผลลบ; No. 2, 4-5, 7-11 = ตัวอย่างให้ผลลบ; No. 12 = negative control; No. 13 = positive control



รูปที่ 4 ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ Nested PCR product ด้วยวิธีการตรวจแบบ Quan มี amplicon ขนาด 328 bp, Lane No. 1 = 100 bp markers; No. 2, 6 = ตัวอย่างให้ผลบวก; No. 3-5, 7-14 = ตัวอย่างให้ผลลบ; No. 15 = negative control; No.16 = positive control



รูปที่ 5 ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ Nested PCR product ด้วยวิธีการตรวจแบบ Annan มี amplicon ขนาด 228 bp, Lane No. 1 = 100 bp markers; No.2 = ตัวอย่างให้ผลบวก; No.3 = ตัวอย่างให้ผลลบ; No. 4 = negative control; No.5 = positive control

2. ชุดตรวจที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสกลุ่ม MERS-CoV (betaCoV-D)

เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือการศึกษาวirusกลุ่ม MERS-CoV (betaCoV-C) ในค้างคาว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเลือกวิธีการตรวจหาไวรัสที่เหมาะสมในด้านความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัย

ตัวอย่างสารพันธุกรรมจากมูลค้างคาวจากโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร เมื่อ ปี พ.ศ.2554 จำนวน 270 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธีตรวจแบบ Watanabe ไปแล้วนั้น (พบผลบวก 11 ตัวอย่าง, ตารางที่ 3) โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างชุดดังกล่าวมาทำการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี PCR อีก 2 วิธี ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสโคโรนา กลุ่ม SARS (Quan protocol) และ กลุ่ม betaCoV (Annan protocol) เพื่อหาวิธีการตรวจที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อไวรัส MERS CoV ในค้างคาวต่อไป

ผลการทดสอบพบว่า วิธี Quan PCR ให้ผลบวกรวม 17 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) โดยเป็นตัวอย่างเพิ่มเติม (ไม่ซ้ำ) จากวิธี Watanabe จำนวน 11 ตัวอย่าง โดยที่ทั้ง 11 ตัวอย่างเมื่อถอดรหัสพันธุกรรมแล้วพบว่าเป็นไวรัสโคโรนาในกลุ่ม alphaCoV ทั้งหมด ส่วนวิธี Annan PCR พบผลบวก betaCoV รวม 6 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างเพิ่มเติมจากวิธี Watanabe ที่เดิมให้ผลลบ จำนวน 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3 และ ตาราง A1 ในภาคผนวก)

การเลือกวิธีการตรวจที่เหมาะสมในการตรวจหาไวรัสกลุ่ม MERS-CoV ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม betaCoV จากผลการเปรียบเทียบวิธีการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาทั้ง 3 วิธี ในตารางที่ 3 แม้วิธี Quan PCR ให้ผลการตรวจพบผลบวกมากกว่าวิธี Watanabe และ Annan แต่ผลบวกที่พบ 17 ตัวอย่าง นั้น เป็น alphaCoV จำนวน 14 ตัวอย่าง และ betaCoV จำนวน 3 ตัวอย่าง (ซึ่งทั้งสามตัวอย่างมีผลการตรวจตรงกับวิธี Watanabe) ในขณะที่วิธี Watanabe ให้ผลบวก betaCoV จำนวน 5 ตัวอย่าง และ วิธี Annan ให้ผลบวก betaCoV จำนวน 6 และเมื่อรวมทั้ง 2 วิธี (Watanabe และ Annan) จะทำให้พบตัวอย่างกลุ่ม betaCoV จำนวน 9 ตัวอย่าง (ตาราง A1 ภาคผนวก) ดังนั้นการทดสอบตัวอย่างค้างคาวที่จับใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ จะใช้วิธี Watanabe PCR และ Annan PCR ร่วมกัน ในการตรวจหาเชื้อไวรัส MERS-CoV เพื่อให้มีความไวสูงสุดในการตรวจจับ betaCoV รวมทั้ง MERS-CoV

ตารางที่ 3 ผลการตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR 3 วิธี จากตัวอย่างที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ

ชนิดค้างคาว#	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนผลบวก PCR จากการตรวจวิธีต่างๆ (CoV cluster)		
		Watanabe	Quan	Annan
<i>Cynopterus brachyotis</i>	9	1 (HKU10)*	0	1(betaCoV-D)
<i>Cynopterus sphinx</i>	11	3 (3=betaCoV- D)	2(2=betaCoV- D)	2(2=betaCoV- D)
<i>Eonycteris spelaea</i>	11	0	0	0
<i>Hipposideros armiger</i>	54	2 (1=CoV1AB*, 1=HKU10*)	0	0
<i>Hipposideros larvatus</i>	9	0	0	1 (betaCoV)
<i>Hipposideros lekaguli</i>	83	0	0	0
<i>Macroglossus sobrinus</i>	2	0	0	0
<i>Miniopterus magnater</i>	17	0	5 (1=CoV1AB*, 3=CoV1AB*, 1=HKU8*)	0
<i>Miniopterus schreibersii</i>	12	0	6 (1 =HKU2*, 5= CoV1AB*)	0
<i>Myotis horsfieldi</i>	3	0	0	0
<i>Rhinolophus shameli</i>	15	0	0	0
<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	3	0	0	2 (2=betaCoV-D)
<i>Taphozous longimanus</i>	11	0	0	0
<i>Taphozous melanopogon</i>	19	1 (HKU10)*	0	0
<i>Scotophilus kuhlii</i>	3	1 (betaCoV-D)	1 (CoV 512)*	0
<i>Scotophilus heathi</i>	8	3 (2=CoV512*, 1= betaCoV-D)	3 (2=CoV512*, 1= betaCoV-D)	0
TOTAL	270	11	17	6

หมายเหตุ: รายละเอียดผลการตรวจรายตัวอย่าง แสดงในตาราง A2 ภาคผนวก

* Cluster ของ alphaCoV ที่ตรวจพบประกอบด้วย HKU10, CoV512, CoV1A, CoV1B, HKU8, HKU2

common name (ภาษาไทย-อังกฤษ) และ scientific name ของค้างคาวจากการศึกษานี้ แสดงใน ตาราง A4 ในภาคผนวก

3. ผลการตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR และ ถอดรหัสพันธุกรรม ตัวอย่างค้างคาวมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างค้างคาวที่จับจาก 5 แหล่ง ใน 4 จังหวัดภาคตะวันออก (ตำแหน่ง A-F, รูปที่ 1) ระหว่าง เดือน ธันวาคม 2554-พฤศจิกายน 2555 จำนวนรวม 270 ตัวอย่าง ประกอบด้วยค้างคาว 15 สปีชีส์ แบ่งเป็นกลุ่มค้างคาวกินผลไม้จำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวขอบหูขาวเล็ก ค้างคาวขอบหูขาวกลาง ค้างคาวเล็บกุด ค้างคาวบัวฟันกลม ค้างคาวหน้ายาวใหญ่ และค้างคาวกินแมลง จำนวน 10 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวปีกถุงเคราดำ ค้างคาวปีกถุงต่อมคาง ค้างคาวมงกุฎปลอมใหญ่ ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรรม ค้างคาวหน้ายักษ์สามลิ้น ค้างคาวหน้ายักษ์หมอบุญส่ง ค้างคาวปีกพับดำใหญ่ ค้างคาวปีกพับใหญ่ ค้างคาวหูหนูตีนโตเล็ก ค้างคาวเพดานเล็ก ค้างคาวเพดานใหญ่ (ตารางที่ 4) จากการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาด้วย PCR ทั้ง 3 วิธี พบผลบวกรวม 27 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 10 จากค้างคาวรวม 9 สปีชีส์

ตัวอย่างที่พบผลบวกด้วยวิธี Watanabe จำนวน 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม alphaCoV จำนวน 6 ตัวอย่างจากค้างคาวรวม 4 สปีชีส์ ประกอบด้วย ค้างคาวขอบหูขาวเล็ก ค้างคาวปีกถุงเคราดำ ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรรม ชนิดละ 1 ตัวอย่าง และ ค้างคาวเพดานใหญ่ 2 ตัวอย่าง และพบไวรัสกลุ่ม betaCoV-D จำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างจากค้างคาวขอบหูขาวกลาง 3 ตัวอย่าง รวมทั้งค้างคาวเพดานเล็ก และ ค้างคาวเพดานใหญ่ ชนิดละ 1 ตัวอย่าง โดยไม่พบไวรัสในกลุ่ม MERS-CoV หรือ SARS (ตาราง A2 ภาคผนวก)

ตัวอย่างที่พบผลบวกด้วยวิธี Quan จำนวน 17 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม alphaCoV จำนวน 14 ตัวอย่าง จากค้างคาว 4 สปีชีส์ (ค้างคาวปีกพับดำใหญ่ ค้างคาวปีกพับใหญ่ ค้างคาวเพดานใหญ่ ค้างคาวเพดานเล็ก) และ betaCoV-D จำนวน 3 ตัวอย่าง จากค้างคาวขอบหูขาวกลาง 2 ตัวอย่าง และ ค้างคาวเพดานใหญ่ (ตัวอย่างเดียวกับที่พบผลบวกด้วยวิธี Watanabe) โดยไม่พบไวรัสในกลุ่ม MERS-CoV หรือ SARS (ตาราง A2 ภาคผนวก)

ตัวอย่างที่พบผลบวกด้วยวิธี Annan จำนวน 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV-D จำนวน 5 ตัวอย่าง จากค้างคาวบัวฟันกลม 2 ตัวอย่าง ค้างคาวขอบหูขาวกลาง 2 ตัวอย่าง และ ค้างคาวขอบหูขาวเล็ก 1 ตัวอย่าง และกลุ่ม betaCoV -B (SARS-CoV) จากค้างคาวหน้ายักษ์สามลิ้น โดยไม่พบไวรัสในกลุ่ม MERS-CoV (ตาราง A2 ภาคผนวก)

ค้างคาวปีกถุง ซึ่งมีการรายงานพบไวรัส MERS-CoV ที่ประเทศซาอุดีอาระเบีย (Memish et al., 2013) จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างชุดนี้ ค้างคาวปีกถุงจำนวน 30 ตัวอย่างที่ทำการตรวจทั้ง 3 วิธี พบผลบวกไวรัสโคโรนา 1 ตัวอย่าง โดยเป็นไวรัสในกลุ่ม alphaCoV-HKU10

อย่างไรก็ตามตัวอย่างในชุดดังกล่าวไม่มีตัวอย่างจากค้างคาวไฟ และค้างคาวลูกหนู ซึ่งเป็นค้างคาวที่มีรายงานการพบเชื้อในกลุ่ม betaCoV-C ที่เป็นกลุ่มเดียวกับไวรัส MERS-CoV ในประเทศจีน เพื่อเป็นการค้นหาแหล่งค้างคาวที่อาจเป็นรังโรคของไวรัส MERS-CoV จึงต้องเก็บตัวอย่างจากแหล่งอื่นๆเพิ่มเติม โดยเน้นจับค้างคาวที่มีประวัติการพบเชื้อกลุ่ม MERS-CoV ในประเทศอื่นมาก่อน (ตาราง A1 ภาคผนวก)

4. ผลการตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR และ ถอดรหัสพันธุกรรม ค้างคาวที่จับและเก็บตัวอย่างระหว่าง เดือน กุมภาพันธ์ 2557-กรกฎาคม 2558

ตัวอย่างค้างคาวที่จับจาก 8 แหล่ง ใน 6 จังหวัดภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตำแหน่ง F-M, รูปที่ 1) ระหว่าง กุมภาพันธ์ 2557-กรกฎาคม 2558 จำนวนรวม 375 ตัวอย่าง ประกอบด้วยค้างคาว 26 สปีชีส์ แบ่งเป็นกลุ่มค้างคาวกินผลไม้จำนวน 6 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวขอบหูขาวกลาง ค้างคาวขอบหูดำเหนือ ค้างคาวบัวฟันกลม ค้างคาวบัวฟันรี ค้างคาวหน้ายาวเล็ก ค้างคาวหน้ายาวใหญ่ และค้างคาวกินแมลง จำนวน 20 สปีชีส์ ได้แก่ ค้างคาวคุณกิตติ ค้างคาวปากย่น ค้างคาวปีกถุงเคราดำ ค้างคาวไฟหัวแบนใหญ่ ค้างคาวเพดานเล็ก ค้างคาวมงกุฎเทาแดง ค้างคาวมงกุฎปลอมเล็ก ค้างคาวมงกุฎปลอมใหญ่ ค้างคาวมงกุฎมลายู ค้างคาวมงกุฎเล็ก ค้างคาวมงกุฎใหญ่ ค้างคาวแวมไพร์แปลงเล็ก ค้างคาวหน้ายักษ์กระบังหน้า ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรรม ค้างคาวหน้ายักษ์เล็ก ค้างคาวหน้ายักษ์สองลิบ ค้างคาวหน้ายักษ์สามลิบ ค้างคาวหน้ายักษ์หมอนโค้ง ค้างคาวหูหนู ค้างคาวหูหนูตีนเล็กเขี้ยวขาว (ตารางที่ 5) โดยในค้างคาวชุดนี้ประกอบด้วยค้างคาวที่เคยมีการรายงานในประเทศอื่นว่าพบไวรัสโคโรนาในกลุ่ม MERS-CoV (betaCoV-C) ได้แก่ ค้างคาวไฟ ค้างคาวปีกถุง และค้างคาวมงกุฎ

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาด้วย PCR 2 วิธี (Watanabe และ Annan) พบผลบวกรวม 30 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 8.1 จากค้างคาวรวม 8 สปีชีส์ รายละเอียดดังนี้

ตัวอย่างที่พบผลบวกด้วยวิธี **Watanabe** จำนวน 12 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม alphaCoV จำนวน 2 ตัวอย่าง จากค้างคาวปากย่น และค้างคาวหน้ายักษ์สามลิบ
2. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV-C (กลุ่ม MERS-CoV) จำนวน 6 ตัวอย่าง จากค้างคาวปากย่น 4 ตัวอย่าง และค้างคาวไฟหัวแบน 2 ตัวอย่าง
3. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV-D จำนวน 4 ตัวอย่าง จากค้างคาวขอบหูขาวกลาง 2 ตัวอย่าง รวมทั้ง ค้างคาวบัวฟันกลม และ ค้างคาวบัวฟันรี ชนิดละ 1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่พบผลบวกด้วยวิธี **Annan** จำนวน 24 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV-B จำนวน 2 ตัวอย่าง จากค้ำความมกมลาญ 2 ตัวอย่าง
2. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV-C จำนวน 7 ตัวอย่าง จากค้ำความปากย่น 6 ตัวอย่าง และค้ำความไฟหั่วแบน 1 ตัวอย่าง
3. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV-D จำนวน 1 ตัวอย่าง จากค้ำความหน้ายักษสามหลีบ 12 ตัวอย่าง ค้ำความบัวพันกลม 1 ตัวอย่าง และ ค้ำความปีกถุงเคราดำ 1 ตัวอย่าง
4. เชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่ม betaCoV unclassified lineage (potential new lineage) ในค้ำความหน้ายักษสามหลีบ 13 ตัวอย่าง และ ค้ำความปีกถุงเคราดำ 1 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัสกลุ่ม MERS-CoV ที่พบในตัวอย่างค้ำความที่จับและเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากการวิจัยครั้งนี้ เป็นค้ำความ genus เดียวกับที่พบรายงานมาก่อนในประเทศจีน ได้แก่ ค้ำความไฟ และนอกเหนือจากนั้นยังได้ตรวจพบไวรัส กลุ่ม MERS-CoV ในค้ำความปากย่น ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานการตรวจพบมาก่อน

5. พื้นที่การพบเชื้อไวรัสโคโรนาจากค้ำความ

การศึกษาในค้ำความรวม 645 ตัว ในค้ำความรวม 33 สปีชีส์ ที่เก็บตัวอย่างระหว่างปี พ.ศ. 2554-2558 ในพื้นที่ 10 จังหวัด จากพื้นที่ศึกษารวม 13 แหล่ง ในภาคตะวันออก ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคเหนือ โดยได้ทำการจับค้ำความเพื่อเก็บตัวอย่างจำนวนระหว่าง 8-139 ตัว/แหล่ง ศึกษา (ตารางที่ 4 และ 5) เมื่อทำการตรวจหาไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR จากมูลค้ำความ (rectal swab) ผลการตรวจพบไวรัสโคโรนา 57 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.8 ประกอบด้วย ไวรัส aphaCoV 19 ตัวอย่าง betaCoV 36 ตัวอย่าง และพบไวรัส 2 genus ในค้ำความตัวเดียวกัน 2 ตัวอย่าง ทั้งนี้พบเชื้อไวรัสโคโรนาได้จากพื้นที่ 11 ใน 13 แหล่งศึกษา โดย 2 แหล่งที่ตรวจไม่พบเชื้อคือ อุทยานแห่งชาติเอราวัณ จ.กาญจนบุรี (K) และ สถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ จ.อุทัยธานี (M) ซึ่งมีจำนวนค้ำความที่จับและเก็บตัวอย่าง 43 และ 39 ตัว ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการตรวจตัวอย่างค้ำความจาก เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี (L) จำนวน 8 ตัวอย่าง พบผลบวก 3 ตัวอย่าง

พื้นที่การตรวจพบเชื้อกลุ่ม MERS-CoV พบได้ในพื้นที่ วัดเขาช่องพราน จังหวัดราชบุรี (ค้ำความปากย่น) สถานีวิจัยลุ่มน้ำแม่กลอง กาญจนบุรี (ค้ำความไฟ) และ อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย เชียงใหม่ (ค้ำความไฟ) (ตาราง A3 ภาคผนวก) ส่วนพื้นที่การตรวจพบเชื้อกลุ่ม SARS-CoV พบได้ในพื้นที่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี (ค้ำความมกมลาญ)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR (Watanabe, Quan และ Annan) ค้างคาวที่เก็บตัวอย่างระหว่าง ธันวาคม 2554-พฤศจิกายน 2555

ชนิดค้างคาว		จำนวนค้างคาวที่ทำการตรวจ [จำนวนที่พบเชื้อ] / สถานที่ที่จับและเก็บตัวอย่างค้างคาว					
ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	A	B	C	D	E	รวม
ค้างคาวขอบหูขาวเล็ก	<i>Cynopterus brachyotis</i>	6 [1]	3	0	0	0	9 [1]
ค้างคาวขอบหูขาวกลาง	<i>Cynopterus sphinx</i>	2	2 [1]	0	0	7 [3]	11 [4]
ค้างคาวเล็บงู	<i>Eonycteris spelaea</i>	9	1	0	0	1	11 [0]
ค้างคาวบัวพันกลม	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	0	3 [2]	0	0	0	3 [2]
ค้างคาวปีกถุงเคราดำ	<i>Taphozous melanopogon</i>	0	19 [1]	0	0	0	19 [1]
ค้างคาวปีกถุงต่อมคาง	<i>Taphozous longimanus</i>	0	0	11	0	0	11 [0]
ค้างคาวมงกุฎปลอมใหญ่	<i>Rhinolophus shameli</i>	0	0	0	15	0	15 [0]
ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรณ	<i>Hipposideros armiger</i>	0	0	53 [2]	1	0	54 [2]
ค้างคาวหน้ายักษ์สามลิบ	<i>Hipposideros larvatus</i>	0	0	0	9	0	9 [1]
ค้างคาวหน้ายักษ์หมอบูญส่ง	<i>Hipposideros lekaguli</i>	0	0	0	83	0	83 [0]
ค้างคาวหน้ายาวใหญ่	<i>Macroglossus sobrinus</i>	1	1	0	0	0	2 [0]
ค้างคาวปีกพับดำใหญ่	<i>Miniopterus magnater</i>	0	0	0	17 [5]	0	17 [5]
ค้างคาวปีกพับใหญ่	<i>Miniopterus schreibersii</i>	0	0	0	12 [6]	0	12 [6]
ค้างคาวหูหนูตีนโตเล็ก	<i>Myotis horsfieldi</i>	0	0	0	2	1	3 [0]
ค้างคาวเพดานเล็ก	<i>Scotophilus kuhlii</i>	0	0	0	0	3 [1]	3 [1]
ค้างคาวเพดานใหญ่	<i>Scotophilus heathi</i>	0	0	0	0	8 [4]	8 [4]
รวม จำนวนที่ตรวจ [จำนวนที่พบเชื้อ]		18 [1]	29 [4]	64 [2]	139 [12]	20 [8]	270 [27]

พื้นที่เก็บตัวอย่างค้างคาว A. บ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี, B. วัดถ้ำสาริกา จังหวัดจันทบุรี, C. วัดเขาถ้ำแรด จังหวัดฉะเชิงเทรา, D. วัดถ้ำเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว, E. อำเภอนสนิม จังหวัดชลบุรี

ตารางที่ 5 ผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี PCR (Watanabe และ Annan) ค้างคาวที่เก็บตัวอย่างระหว่าง กุมภาพันธ์ 2557-กรกฎาคม 2558

ชนิดค้างคาว		จำนวนค้างคาวที่ทำการตรวจ [จำนวนที่พบเชื้อ] / สถานที่จับและเก็บตัวอย่างค้างคาว								
ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	F	G	H	I	J	K	L	M	รวม
ค้างคาวขอบหูขาวกลาง	<i>Cynopterus sphinx</i>	0	47	16	27 [2]	12	1	0	0	103 [2]
ค้างคาวขอบหูดำเหนือ	<i>Megaerops niphanae</i>	0	3	2	3	7	0	0	0	15 [0]
ค้างคาวบัวพันกลม	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	0	0	0	0	1 [1]	0	0	0	1 [1]
ค้างคาวบัวพันรี	<i>Rousettus leschenaulti</i>	0	5 [1]	4	0	0	0	0	0	9 [1]
ค้างคาวคูนกิตติ	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	6 [0]
ค้างคาวปากย่น	<i>Chaerephon plicata</i>	19 [7]	0	0	0	0	0	1	0	20 [7]
ค้างคาวปีกถุงเคราดำ	<i>Taphozous melanopogon</i>	19 [1]	0	0	0	0	0	0	0	19 [1]
ค้างคาวไฟหัวแบนใหญ่	<i>Tylonycteris robustula</i>	0	0	6 [1]	2 [1]	0	0	0	39 [0]	47 [2]
ค้างคาวเพดานเล็ก	<i>Scotophilus kuhlii</i>	0	0	4	0	0	4	0	0	8 [0]
ค้างคาวมงกุฎเทาแดง	<i>Rhinolophus affinis</i>	0	0	1	4	0	0	0	0	5 [0]
ค้างคาวมงกุฎปลอมเล็ก	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	0	0	0	0	3	3	0	0	6 [0]
ค้างคาวมงกุฎปลอมใหญ่	<i>Rhinolophus shameli</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1 [0]
ค้างคาวมงกุฎมลายู	<i>Rhinolophus malayanus</i>	0	6	0	0	0	2	2 [2]	0	10 [2]
ค้างคาวมงกุฎเล็ก	<i>Rhinolophus pusillus</i>	0	1	0	0	2	1	0	0	4 [0]

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชนิดค้างคาว		จำนวนค้างคาวที่ทำการตรวจ [จำนวนที่พบเชื้อ] / สถานที่ที่จับและเก็บตัวอย่างค้างคาว								
ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	F	G	H	I	J	K	L	M	รวม
ค้างคาวมงกุฎใหญ่	<i>Rhinolophus luctus</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	2 [0]
ค้างคาวแวมไพร์แปลงเล็ก	<i>Megaderma spasma</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	3 [0]
ค้างคาวหน้ายักษ์กระบังหน้า	<i>Hipposideros lylei</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	2 [0]
ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรณ	<i>Hipposideros armiger</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1 [0]
ค้างคาวหน้ายักษ์เล็ก	<i>Hipposideros pomona</i>	0	0	0	0	0	16	0	0	16 [0]
ค้างคาวหน้ายักษ์สองหลิบ	<i>Hipposideros galeritus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1 [0]
ค้างคาวหน้ายักษ์สามหลิบ	<i>Hipposideros larvatus</i>	62 [12]	0	0	0	1 [1]	10	1 [1]	0	74 [14]
ค้างคาวหน้ายักษ์หมอนโค้ง	<i>Hipposideros diadema</i>	0	1	0	0	0	2	0	0	3 [0]
ค้างคาวหน้ายาวเล็ก	<i>Macroglossus minimus</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2 [0]
ค้างคาวหน้ายาวใหญ่	<i>Macroglossus sobrinus</i>	0	0	2	4	3	0	0	0	9 [0]
ค้างคาวหูหนู	<i>Myotis sp.</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2 [0]
ค้างคาวหูหนูตีนเล็กเขี้ยวยาว	<i>Myotis muricola</i>	0	1	0	3	1	0	1	0	6 [0]
	รวม จำนวนที่ตรวจ [จำนวนที่พบเชื้อ]	100 [20]	64 [1]	45 [1]	43 [3]	33 [2]	43 [0]	8 [3]	39 [0]	375 [30]

พื้นที่เก็บตัวอย่างค้างคาว F. ถ้ำค้างคาวเขาช่องพราน จังหวัดราชบุรี, G. ศูนย์ศึกษาธรรมชาติ เจ็ดคต โป่งก้อนเส้า จังหวัดสระบุรี, H. สถานีวิจัยลุ่มน้ำแม่กลอง จังหวัดกาญจนบุรี, I. อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่, J. สถานีฝึกนิสิตวนศาสตร์ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา, K. อุทยานแห่งชาติเอราวัณ จ.กาญจนบุรี, L. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี, M. สถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ จ.อุทัยธานี

6. การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมไวรัสโคโรนาจากค้างคาว

ข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากการตรวจ PCR 3 วิธี จะมีความยาวที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับขนาดของ PCR product (amplicon) ได้แก่ ขนาดความยาว 357 เบส (Watanabe protocol), 270 เบส (Quan protocol) และ 152 เบส (Annan protocol) จากการศึกษาครั้งนี้พบ ผลบวกรวม จาก 3 PCR protocol รวม 57 ตัวอย่าง ประกอบด้วยผลบวกจากวิธี Watanabe รวม 23 ตัวอย่าง วิธี Quan รวม 17 ตัวอย่าง และ วิธี Annan รวม 30 ตัวอย่าง ทั้งนี้มีบางตัวอย่างที่ให้ผลบวกมากกว่า 1 protocol เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์วิวัฒนาการของไวรัสด้วยการสร้าง Phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ GTR+G model of evolution และทำ 1000 bootstrap ด้วยเทคนิค RAXML(Randomized Accelerated Maximum Likelihood) และแสดงภาพด้วย FigTree v1.4.2 เปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิงของ CoV ใน GenBank ได้ผลการศึกษาแยกตาม(วิธีการตรวจ) ตำแหน่งบนยีน RdRp ดังรูปที่ 6A-C

การตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี Watanabe เมื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัส พบเชื้อในกลุ่ม alphaCoV จำนวน 8 ตัวอย่าง และ betaCoV จำนวน 15 ตัวอย่าง แยกเป็น lineage C (betaCoV-C) จำนวน 6 ตัวอย่าง และ lineage D (betaCoV-D) จำนวน 9 ตัวอย่าง และพบเชื้อที่เป็นลักษณะ independent cluster ที่อาจจะเป็นเชื้อกลุ่มใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน (รูปที่ 6A)

การตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี Quan เมื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัส พบเชื้อในกลุ่ม alphaCoV จำนวน 14 ตัวอย่าง และ betaCoV lineage D จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อที่มีลักษณะ host specific (ชนิดของเชื้อไวรัสมีความจำเพาะต่อ genus/species ค้างคาว) คือเชื้อไวรัสใน cluster CoV1AB ที่พบเฉพาะค้างคาว *Miniopterus* 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Miniopterus schreibersii* และ *M. magnater* (รูปที่ 6B) ซึ่งเป็น genus เดียวกับค้างคาวที่พบเชื้อในประเทศจีน (*Miniopterus*) ที่ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงใน phylogenetic tree รูปที่ 6B (Chu et al., 2008)

การตรวจไวรัสโคโรนาด้วยวิธี Annan เมื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัส พบแต่เชื้อในกลุ่ม betaCoV แยกเป็น lineage B จำนวน 2 ตัวอย่าง, lineage C จำนวน 7 ตัวอย่าง และ lineage D จำนวน 6 ตัวอย่าง และพบเชื้อที่เป็นลักษณะ independent cluster (potential new lineage) ที่อาจจะเป็นเชื้อกลุ่มใหม่จำนวน 15 ตัวอย่าง (จากค้างคาวหน้ายักษ์ 14 ตัวอย่าง และค้างคาวปีกถุงเคราดำ 1 ตัวอย่าง) ที่มีสารพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่พบจากค้างคาวหน้ายักษ์ในประเทศ Ghana และ จีน (Pfefferle et al., 2009; Ge et al., 2016) (รูปที่ 6C และ รูปที่ 7)

จากการวิเคราะห์ผลการตรวจพบเชื้อไวรัสจากทั้ง 3 PCR protocol พบว่า ไวรัสโคโรนา betaCoV-D จำนวน 13 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่ตรวจพบในค้างคาวกินผลไม้ (11/13 ตัวอย่าง) ในกลุ่ม ค้างคาวขอบหูขาวและค้างคาวบัว ในขณะที่ ไวรัส betaCoV-B (กลุ่ม SARS-CoV) ตรวจพบ 2

ตัวอย่างในค้างคาวกินแมลง สปีชีส์ค้างคาวมงกุฎมลายู (รูปที่ 6C) ส่วนไวรัสโคโรนา betaCoV-C (กลุ่ม MERS-CoV) ตรวจพบในค้างคาวกินแมลง ได้แก่ค้างคาวไผ่หัวแบนใหญ่ 2 ตัวอย่าง และใน ค้างคาวปากย่น 6 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบค้างคาวที่ตรวจพบเชื้อไวรัสโคโรนา 2 ชนิดจากตัวอย่าง เดียวกัน ที่แตกต่างกันในระดับ genus จำนวน 2 ตัว ได้แก่ ตัวอย่างค้างคาว No. B54022 ที่พบเชื้อ กลุ่ม alphaCoV-HKU10 และ betaCoV-D จากการตรวจด้วยวิธี Watanabe และ Annan ตามลำดับ และตัวอย่างค้างคาว No. B55740 ที่พบเชื้อกลุ่ม betaCoV-D และ alphaCoV-CoV512 จากการตรวจด้วยวิธี Watanabe และ Quan ตามลำดับ (ตาราง A2 ภาคผนวก)

7) การตรวจตัวอย่างเชื้อไวรัสโคโรนา จากผู้ป่วย MERS รายแรกและรายที่สอง ของประเทศไทย

7.1 การตรวจวินิจฉัยยืนยันการพบเชื้อไวรัสเมอร์สในผู้ป่วย

การตรวจเชื้อไวรัสเมอร์สจากผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย ได้ประยุกต์การตรวจแบบ conventional PCR ที่ใช้ในการตรวจค้างคาวร่วมกับวิธี real-time PCR เพื่อให้สามารถถอดรหัส พันธุกรรมเพื่อยืนยันผลการตรวจจากการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR 2 ยีน ตามคำแนะนำของ องค์การอนามัยโลก โดยมีแนวทางการตรวจดังนี้

1. Real-time PCR ที่ยีน UpE
2. Real-time PCR ที่ยีน ORF 1a
3. Conventional PCR and sequencing ด้วย Annan PCR

ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยเมอร์ส (ทั้งสองราย) ให้ผลบวกจากการตรวจทั้ง 3 วิธีทดสอบ และเมื่อ ถอดรหัสพันธุกรรมของยีน RdRp จากข้อ 3 สามารถยืนยันได้ว่าเป็น MERS-CoV โดยมีความ เหมือนกับไวรัสที่พบในประเทศซาอุดีอาระเบีย 99.5 %

7.2 การตรวจ whole genome เชื้อ human MERS-CoV จากผู้ป่วย

การตรวจ Whole genome เชื้อ MERS-CoV จากตัวอย่างสารพันธุกรรมของผู้ป่วยติดเชื้อ เมอร์สในประเทศไทย ทั้ง 2 ราย ใช้วิธีการที่มีการรายงานโดย Corman และคณะ (Corman et. al. 2014) โดยการใช้ primer จำนวน 70 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากตัวอย่างของผู้ป่วย โดยตรง โดยไม่ผ่านการเพาะเชื้อเพิ่มปริมาณ และถอดรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี direct sequencing และนำมาสร้าง Phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสในประเทศอื่นๆ ดังรูปที่ 8

ผลการวิเคราะห์พบว่าไวรัสเมอร์สที่พบในผู้ป่วยชาวโอมานทั้ง 2 ราย จัดอยู่ใน clade เดียวกันและอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่พบในผู้ป่วยจากเกาหลี จีน และซาอุดีอาระเบีย ที่ป่วยในปี ค.ศ. 2015 แต่แตกต่างจากผู้ป่วยรายแรกที่พบในปี ค.ศ. 2012

[คำอธิบายภาพ รูปที่ 6A-C ในหน้าถัดไป]

รูปที่ 6 A-C: Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนา จากมูลค้างคาว ที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้ (สีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับไวรัสโคโรนาจากข้อมูลใน Gen Bank (สีดำ) โดยการตรวจด้วยวิธี Watanabe PCR (6A), Quan PCR (6B), Annan PCR (6C)

ชื่อตัวอย่างใน Phylogenetic tree: เบอร์ตัวอย่าง_วิธีตรวจ/สปีชีส์ค้างคาว/พื้นที่เก็บตัวอย่าง/ปีที่เก็บ

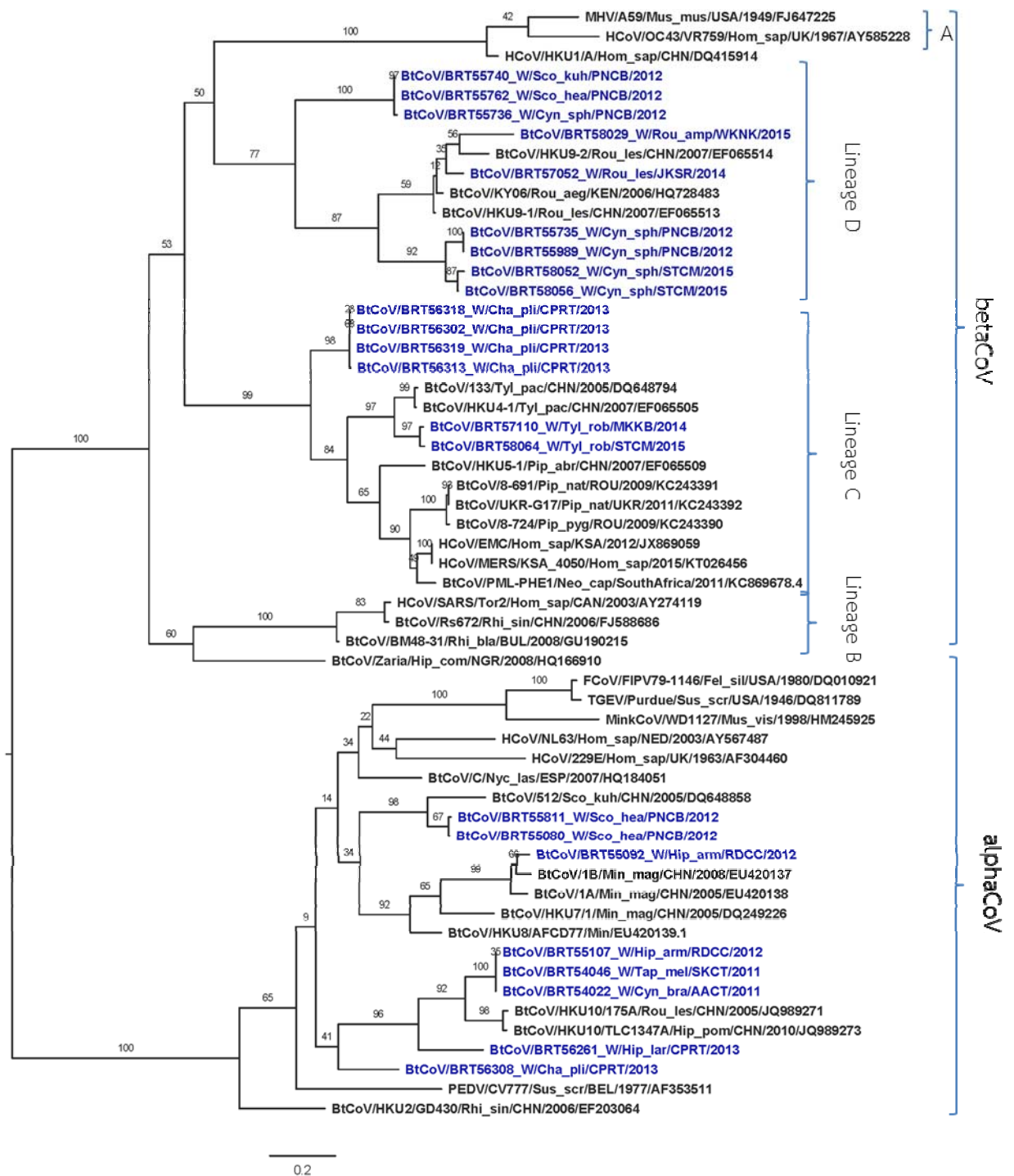
ชื่อของ reference: host taxa_Number_host species_country_year_accession number

ตัวอย่างของพื้นที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

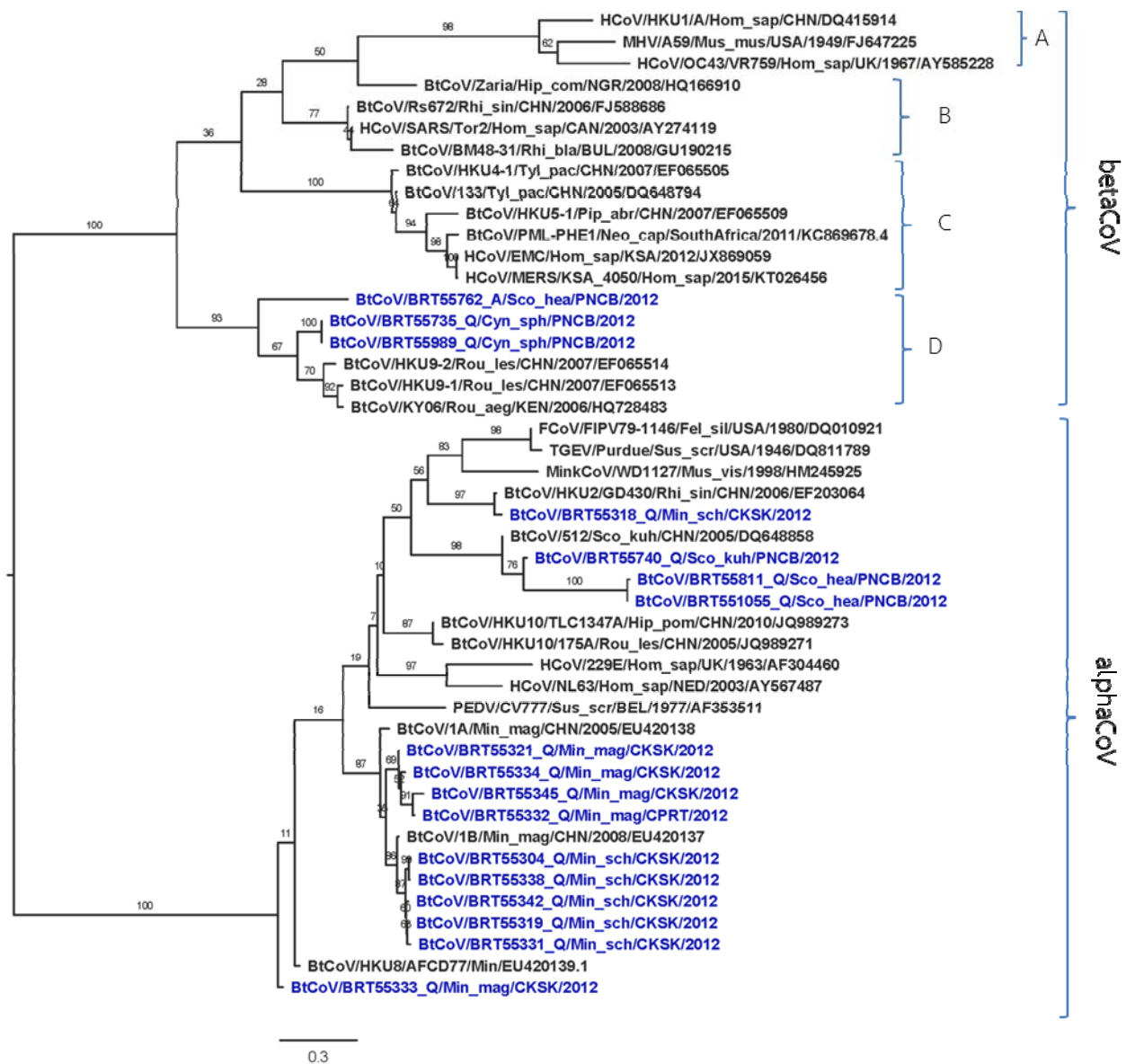
AACT, บ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี (A); SKCT, วัดถ้ำสาริกา จังหวัดจันทบุรี (B); RDCC, วัดเขาถ้ำแรด จังหวัดฉะเชิงเทรา (C); CKSK, วัดถ้ำเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว (D); PNCB, อำเภอนันทนิคม จังหวัดชลบุรี (E); CPRT, ถ้ำค้างคาวเขาช่องพราน จังหวัดราชบุรี (F); JKSR, ศูนย์ศึกษารรรมชาติ เจ็ดคต โป่งก้อนเส้า จังหวัดสระบุรี (G); MKKB, สถานีวิจัยลุ่มน้ำแม่กลอง จังหวัดกาญจนบุรี (H); STCM อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ (I); WKNK, สถานีฝึกนิสิตวนศาสตร์ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (J); KKUT, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี (L)

ตัวอย่างของสปีชีส์ค้างคาวในการศึกษาครั้งนี้

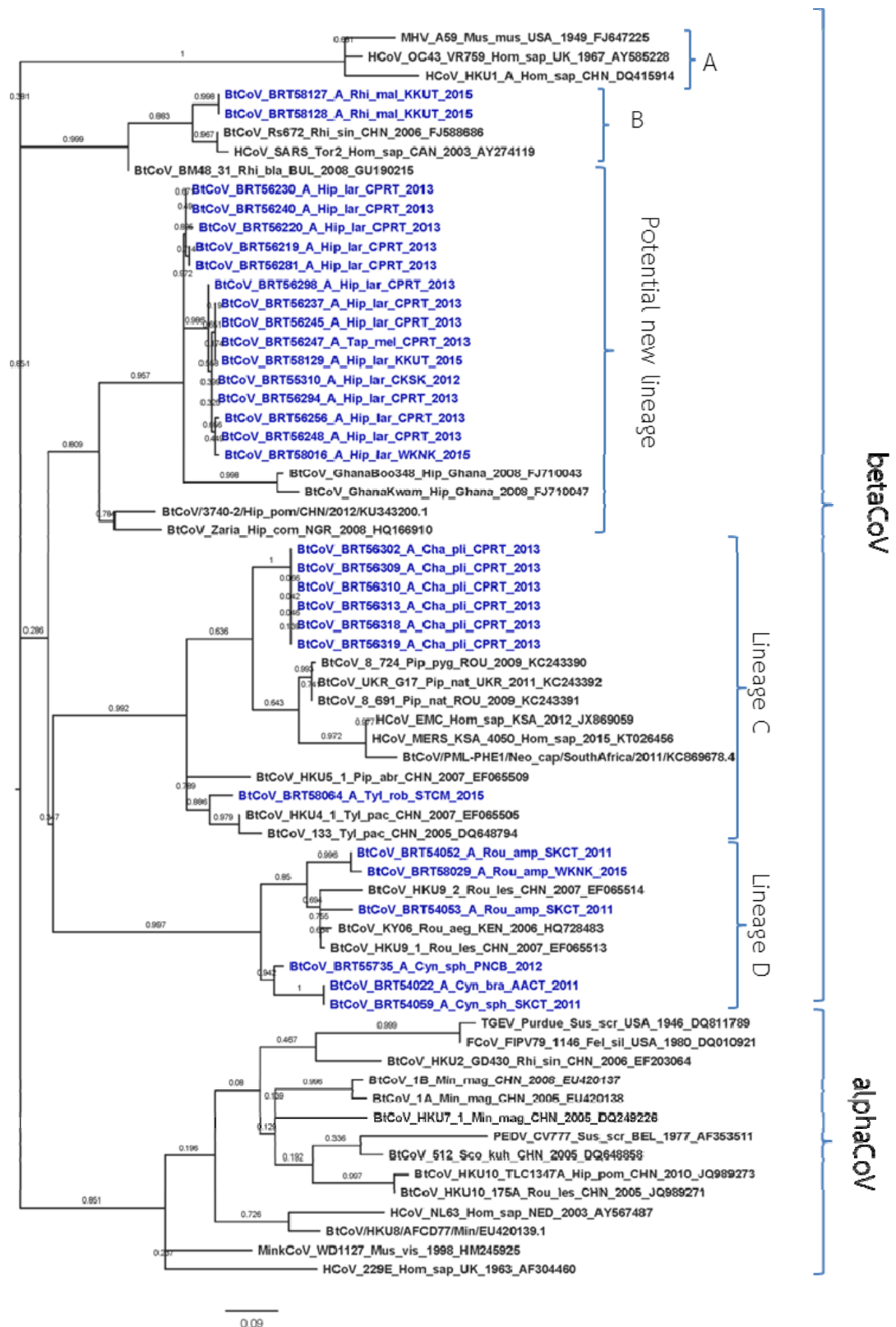
Cha_pli, *Chaerephon plicata*; Cyn_bra, *Cynopterus brachyotis*; Cyn sph, *Cynopterus sphinx*; Hip_arm, *Hipposideros armiger*; Hip_lar, *Hipposideros larvatus*; Min_mag, *Miniopterus magnate*; Min_sch, *Miniopterus schreibersii*; Rhi_mal, *Rhinolophus malayanus*; : Rou_amp, *Rousettus amplexicaudatus*; Rou_les, *Rousettus leschenaultia*; Sco_hea, *Scotophilus heathi*; Sco_kuh, *Scotophilus kuhlii*; Tap_mel, *Taphozous melanopogon*; Tyl_rob, *Tylonycteris robustula*



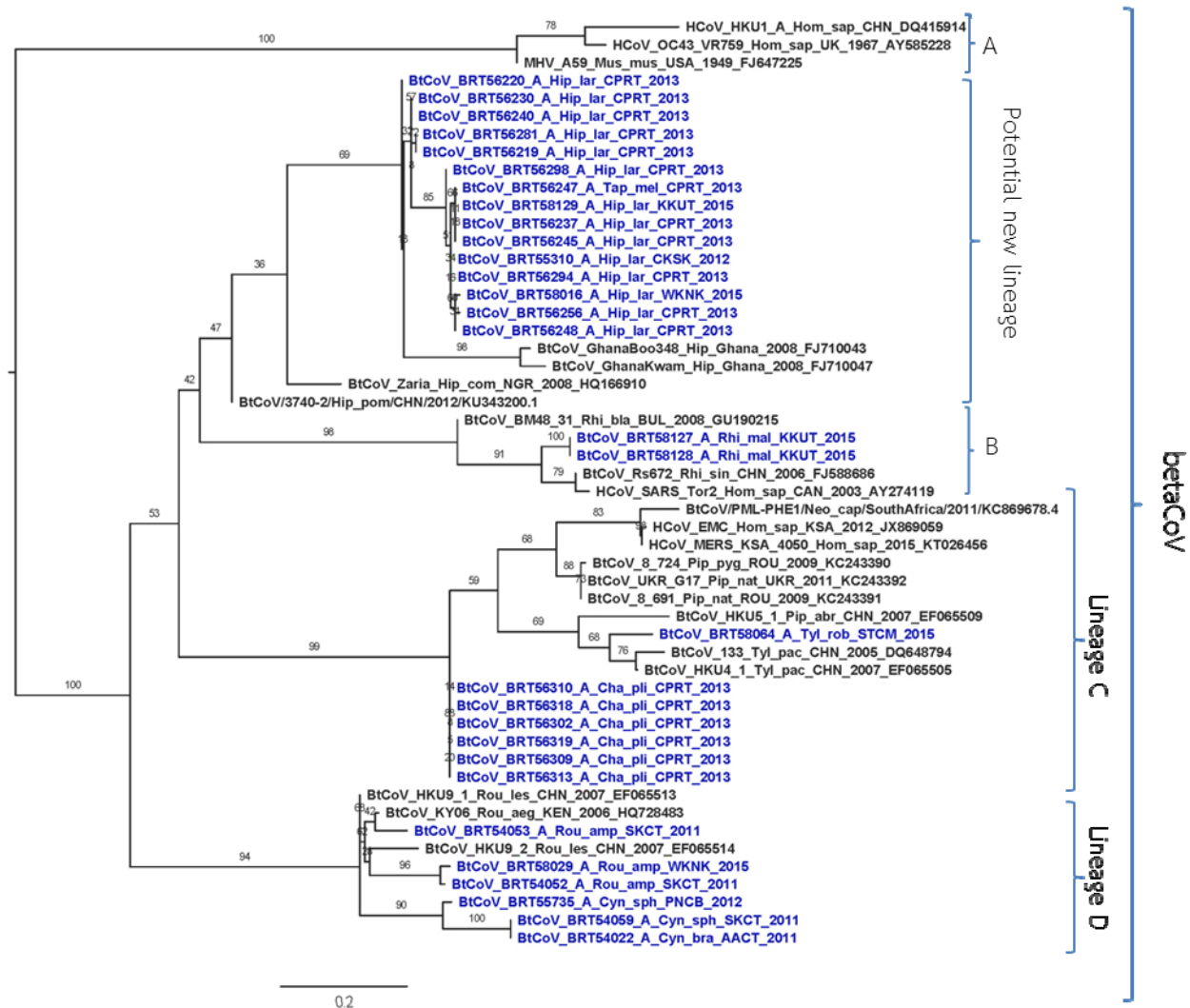
รูปที่ 6 A Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนาโดยการตรวจด้วยวิธี Watanabe PCR (W) ที่ยืน RdRp ความยาว 357 เบสจากมูลค้างคาว ที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้ (สีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับไวรัสโคโรนาจากข้อมูลใน Gen Bank (สีดำ)



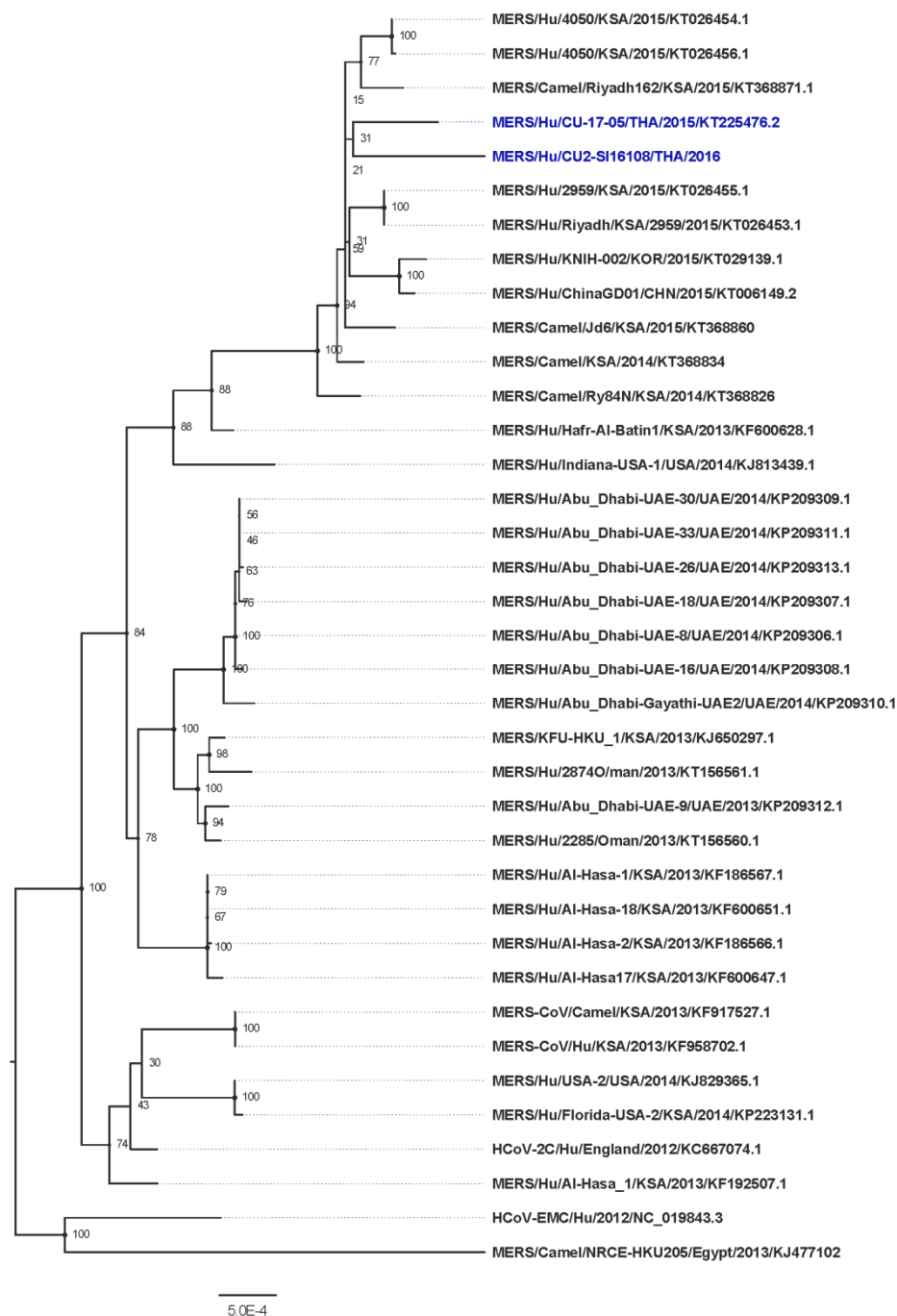
รูปที่ 6 B Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนา โดยการตรวจด้วยวิธี Quan PCR (Q) ที่ยื่น RdRp ความยาว 270 เบส จากมูลค่างคาว ที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้ (สีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับไวรัสโคโรนาจากข้อมูลใน Gen Bank (สีดำ)



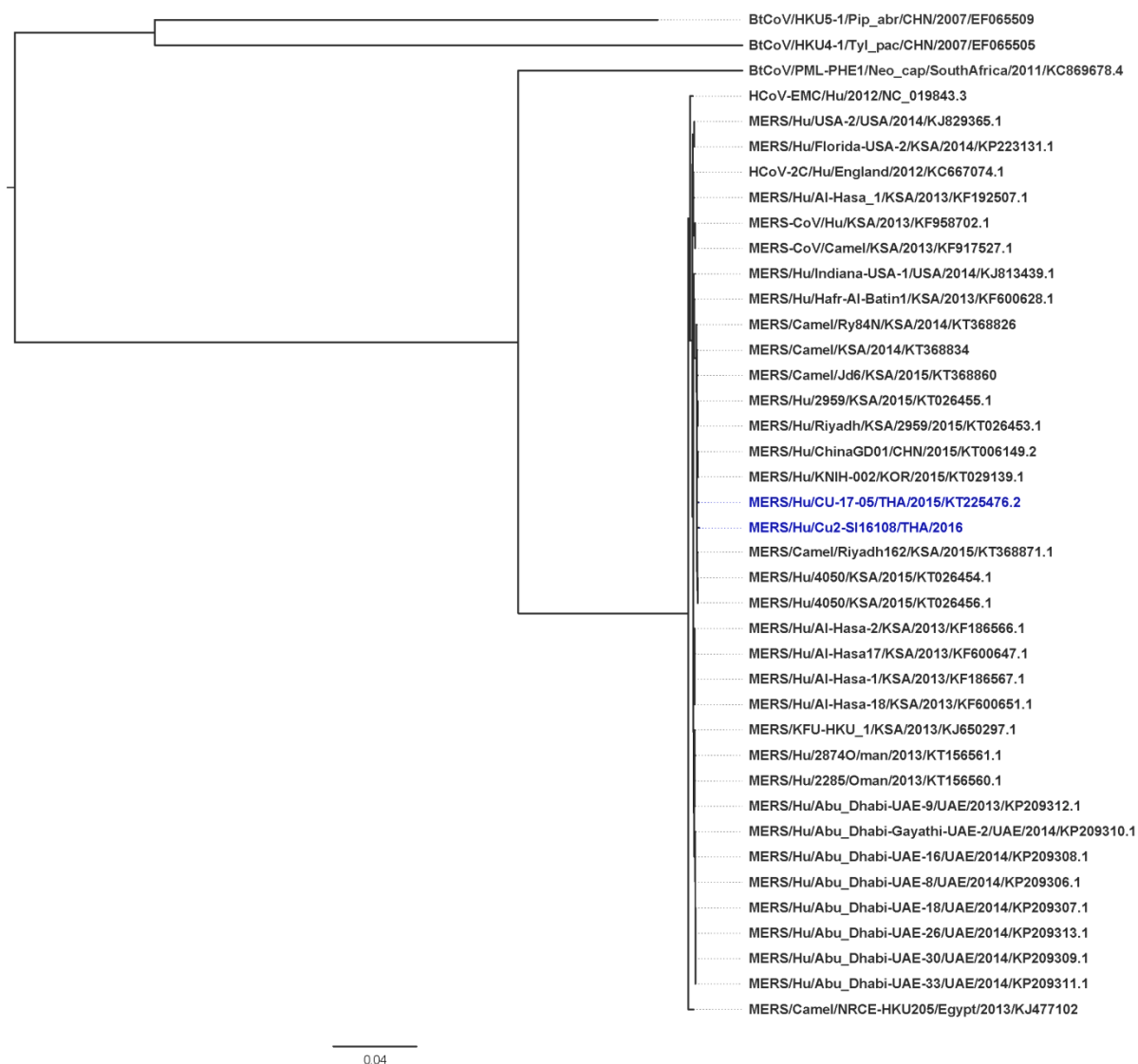
รูปที่ 6 C Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนาโดยการตรวจด้วยวิธี Annan PCR ที่ยีน RdRp (A) ความยาว 152 เบสจากผลค่างคาว ที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้ (สีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับไวรัสโคโรนาจากข้อมูลใน Gen Bank (สีดำ)



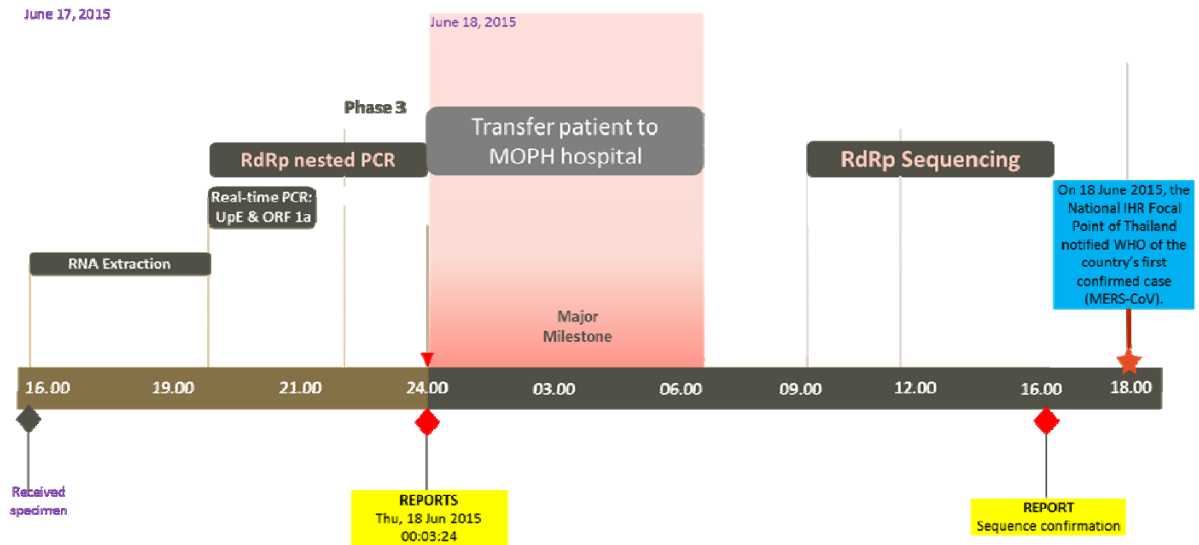
รูปที่ 7 Phylogenetic tree ไวรัสโคโรนา Betacoronaviruses โดยการตรวจด้วยวิธี Annan PCR (A) ที่ ยีน RdRp ความยาว 152 เบส จากมูลค่างคาว ที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้ (สีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับ ไวรัสโคโรนาจากข้อมูลใน Gen Bank (สีดำ) เปรียบเทียบเฉพาะไวรัสในกลุ่ม btaCoV



รูปที่ 8 Phylogenetic tree ของ Whole genome Human MERS CoV จากผู้ป่วยชาวโอมาน 2 รายที่ตรวจพบในประเทศไทย (รายชื่อ 1: CU17-05 และ รายที่ 2: CU2-SI16108, สีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับไวรัสที่พบในผู้ป่วยประเทศต่างๆ และอูฐจากประเทศซาอุดีอาระเบียและอียิปต์ Hu: human, KSA: ซาอุดีอาระเบีย, KOR: เกาหลีใต้, CHN: จีน, USA: สหรัฐอเมริกา, UAE: สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์



รูปที่ 9 Phylogenetic tree ของ Whole genome MERS-CoV จากค้างคาว และผู้ป่วยชาวโอมาน 2 รายที่ตรวจพบในประเทศไทย (รายชื่อ 1: CU17-05 และ รายที่ 2: CU2-SI16108, สิ้นน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับไวรัสที่พบในผู้ป่วยประเทศต่างๆ, อูฐจากประเทศซาอุดีอาระเบียและอียิปต์ และ ค้างคาวกลุ่ม beatCoV-C จากประเทศจีน (HKU 4 และ HKU5) และแอฟริกาใต้ (PML-PHE1) Hu: human, KSA: ซาอุดีอาระเบีย, KOR: เกาหลีใต้, CHN: จีน, USA: สหรัฐอเมริกา, UAE: สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์



รูปที่ 10 แผนภาพ timeline แสดงระยะเวลาในการทำงานเพื่อตรวจวินิจฉัยไวรัสโคโรนาเมอร์ส จากผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย โดยห้องปฏิบัติของศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ศูนย์ความร่วมมือองค์การอนามัยโลกฯ ไวรัสสัตว์สู่คน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

วันที่ 17 มิ.ย. 2558 เวลา 16.00 น.	รับตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วย
วันที่ 17 มิ.ย. 2558 เวลา 1600 - 24.00 น.	ตรวจตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก รวม 3 วิธี พร้อมๆกัน
วันที่ 18 มิ.ย. 2558 เวลา 00.03 น.	ห้องปฏิบัติการส่งผลการตรวจยืนยัน 3 วิธี ให้กับกรม ควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ทาง Email
วันที่ 18 มิ.ย. 2558 เวลา 05.00 น.	ผู้ป่วยย้ายเข้ารับการรักษากักกันตัวในห้องแยก ที่ สถาบันบำราศนราดูร
วันที่ 18 มิ.ย. 2558 เวลา 0900-16.00 น.	ตรวจรหัสพันธุกรรมของไวรัส เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ ไวรัสที่พบ ร่วมกับห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา
วันที่ 18 มิ.ย. 2558 เวลา 18.00 น.	รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขแถลงข่าวการพบ ผู้ป่วยไวรัสเมอร์สสายแรกในประเทศไทย

ข้อวิจารณ์ (Discussion)

1. Pirmer ที่ใช้ใน PCR protocol วิธีต่างๆ ให้ผลการตรวจพบไวรัสโคโรนาในกลุ่มที่แตกต่างกัน หากต้องการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาจากค้างคาวให้ครอบคลุมทั้งกลุ่ม alphaCoV และ betaCoV อาจจะต้องใช้วิธีการตรวจอย่างน้อย 3 แบบ ที่ได้ทำการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยไวรัสโคโรนาลำเชื้อ MERS-CoV ในประเทศซาอุดีอาระเบีย (Memish et al., 2013) ที่ต้องใช้ primer รวม 8 คู่ ในการตรวจหาไวรัส และ primer แต่ละคู่ให้ผลบวกต่อกลุ่มเชื้อไวรัสที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ เนื่องจาก primer แต่ละคู่จะมีความจำเพาะต่อกลุ่มเชื้อที่แตกต่างกันถึงแม้ primer ที่ใช้ในการค้นหาความหลากหลายของไวรัสโคโรนาครั้งนี้จะเป็น primer ที่มีความสามารถในการจับเชื้อได้หลายชนิดก็ตาม

2. ไวรัสโคโรนากลุ่ม MERS-CoV ที่พบในค้างคาวจากการศึกษาครั้งนี้ พบได้ในค้างคาว genus เดียวกับที่มีการรายงานพบในประเทศจีนมาก่อน ในกลุ่มค้างคาวไฟ และพบในสปีชีส์ค้างคาวที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนคือ ค้างคาวปากย่น ทั้งนี้พบว่า PCR protocol ของ Annan ตรวจจับเชื้อได้ดีกว่า Watanabe ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวิธี Annan มีความไวในการตรวจสูงกว่า เนื่องจากมีความยาวของขนาด amplicon ที่สั้นกว่าของ Watanabe (228 เบส และ 434 เบส ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังสามารถพบไวรัสได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี และ ราชบุรี

3. การศึกษาความหลากหลายของไวรัสโคโรนาครั้งนี้ ยังสามารถตรวจพบไวรัสในกลุ่ม SARS-CoV จากค้างคาวมงกุฎมลายู (*Rhinolophus malayanus*) ซึ่งอยู่ใน *Rhinolophus* ที่เป็น genus เดียวกับ ค้างคาวที่พบว่าเป็นแหล่งกำเนิดของโรค SARS-CoV ในประเทศจีน ได้แก่ ค้างคาวมงกุฎ *Rhinolophus sinicus* หรือ Chinese horseshoe bats (Lau et al., 2005; Li et al., 2005) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็น ความจำเพาะของไวรัสต่อกลุ่ม Host ชนิดเดียวกัน (host specific) แม้จะพบเชื้อในคนละประเทศที่ห่างไกลกัน ซึ่งพบลักษณะเดียวกันนี้ในค้างคาว *Rhinolophus* ที่ประเทศบัลกาเรีย (Drexler et al., 2010) และ อิตาลี (Lelli et al., 2013) เป็นต้น

4. ความจำเพาะของไวรัสต่อกลุ่ม Host ชนิดเดียวกัน ยังพบได้ในไวรัสกลุ่ม alphaCoV cluster CoV1AB ในกลุ่มค้างคาวปีกพับ (*Miniopterus* spp.) ที่เป็นค้างคาวที่สามารถพบได้ในประเทศจีน (Chu et al., 2008) และ บัลกาเรีย (Drexler et al., 2010)

5. การศึกษาความสัมพันธ์วิวัฒนาการของไวรัสโคโรนาจากค้างคาวที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีกลุ่มไวรัสที่มีการจัดกลุ่มในลักษณะ independent cluster ที่แยกตัวออกจากเชื้อไวรัส Reference ที่เคยพบมาก่อนหน้านี้อย่างชัดเจน อาทิ ในรูปที่ 6A ที่เป็นตัวอย่างยีน RdRp จาก Watanabe protocol พบ unclassified betaCoV-D ใน 3 ตัวอย่างได้แก่ B55740, B55762, B55736 และในรูปที่ 6C เป็นตัวอย่างยีน RdRp จาก Annan protocol พบ unclassified betaCoV ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสโคโรนาจากค้างคาวประเทศกานา (FJ710043 และ FJ710047) (Pfefferle et al., 2009) และจากประเทศจีน

(ตัวอย่าง BtCoV/3740, accession no. KU343200.1) ดังรูปที่ 6C และ 7 ซึ่งผลการวิจัยโดย Xing-Yi Ge และคณะ (Ge et al., 2016) ได้เสนอให้จัดไวรัส BtCoV/3740 จากประเทศจีนนี้ และไวรัสในกลุ่มเดียวกันให้ เป็น lineage ใหม่ “Bat CoV Lineage E” ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าไวรัสในกลุ่มนี้เป็นไวรัสที่พบในค้างคาวกลุ่ม *Hipposideros* spp. ทั้งตัวอย่างที่พบในประเทศ จีน กาน่า ไนจีเรีย (Tong et al., 2009) รวมทั้งตัวอย่างของประเทศไทยจากการศึกษาครั้งนี้

6. การศึกษาครั้งนี้พบ Co-infection จากเชื้อไวรัสโคโรนา 2 ชนิด ในค้างคาวตัวอย่างเดียวกัน ที่ตรวจพบด้วย PCR ต่างวิธี จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ค้างคาวขอบหูขาวเล็ก, no. B54022 พบการติดเชื้อกลุ่ม alphaCoV- HKU10 และ betaCoV-D ส่วน ค้างคาวเพดานเล็ก, no. B55740 พบการติดเชื้อ alphaCoV-CoV512 และ betaCoV-D ซึ่งรายงานการพบ co-infection ของการศึกษาไวรัสโคโรนาในประเทศไทยที่ผ่านมา เป็นการพบการติดเชื้อร่วมจากไวรัสใน genus เดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ ได้แก่ alphaCoV-1AB ร่วมกับ alphaCoV-HKU7 ในตัวอย่างเดียวกัน (Wacharapluesadee et al., 2015) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในประเทศจีนที่พบ alphaCoV- 1AB และ alphaCoV-HKU8 ในค้างคาวตัวเดียวกัน (Chu et al., 2008) ส่วนการพบการติดเชื้อไวรัส 2 genus ในค้างคาวตัวเดียวกันมีการรายงานจากการศึกษาในประเทศจีน ที่พบเชื้อไวรัส BtCoV HKU10 (alphaCoV) และ เชื้อ unclassified betaCoV ในค้างคาว *Hipposideros pomona* (Ge et al., 2016)

7. ในการศึกษาครั้งนี้พบไวรัสโคโรนา 2 genus (alphaCoV และ betaCoV) จากค้างคาวสปีชีส์เดียวกัน (จากคนละตัว) ที่อาศัยในถ้ำเดียวกัน ได้แก่ ค้างคาวปากย่น จากจังหวัดราชบุรี พบเชื้อไวรัส betaCoV-C และ alphaCoV-HKU8 ค้างคาวหน้ายักษ์สามหลืบ จากจังหวัดราชบุรี พบเชื้อไวรัส betaCoV-D และ alphaCoV-HKU10 ส่วนค้างคาวเพดานใหญ่ และ ค้างคาวเพดานเล็ก จากจังหวัดชลบุรี พบเชื้อไวรัส betaCoV-D และ alphaCoV-CoV512 (รูปที่ 6A-C, ตาราง A2 และ A3 ภาคผนวก) ซึ่งความหลากหลายของไวรัสในค้างคาวสปีชีส์เดียวกัน อาจเกิดจากการย้ายที่อยู่ หรือหากินในบริเวณเดียวกันกับค้างคาวสปีชีส์อื่นๆที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนา ต่างชนิดกัน ทั้งนี้การเกิด cross-species transmission ในลักษณะนี้ได้มีรายงานพบในค้างคาวที่ประเทศเม็กซิโก (Anthony et al., 2013) และ ประเทศจีน (Yuan et al., 2010, Lau et al., 2010)

8. พื้นที่ศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อไวรัสโคโรนา 11 ใน 13 แหล่งศึกษา ซึ่งแต่ละถ้ำจะมีค้างคาวอาศัยอยู่มากกว่า 1 สปีชีส์ ทั้งนี้ พบว่าถ้ำค้างคาว 5 แห่ง (4 จังหวัด) พบเชื้อไวรัสทั้ง alphaCoV และ betaCoV ในสถานที่เดียวกัน ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ราชบุรี ส่วนในจังหวัดเชียงใหม่พบเชื้อไวรัส betaCoV ทั้ง lineage C และ lineage D ในถ้ำเดียวกัน (จากค้างคาวต่างสปีชีส์)

9. ไวรัสโคโรนา alphaCoV-HKU10 ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ (รูปที่ 6A) จำนวน 5 ตัวอย่างพบในค้างคาว 5 สปีชีส์ ประกอบด้วยค้างคาวกินแมลง 4 สปีชีส์ และค้างคาวกินผลไม้ 1 สปีชีส์ (ค้างคาวขอบหู

ขาวเล็ก) จัดเป็นเชื้อไวรัสที่มีความหลากหลายของ host สูง และการติดเชื้อไวรัสชนิดเดียวกันใน host หลายชนิด (interspecies transmission) อาจเกิดจากการที่ค้างคาวมีการใช้พื้นที่อยู่อาศัยและที่หาอาหารแหล่งเดียวกัน ซึ่งไวรัส HKU10 นี้มีรายงานจากประเทศจีนว่าเกิด interspecies transmission ระหว่างค้างคาว 2 ชนิด คือ *Rousettus leschenaultia* และ *Hiposideros pomona* (Lau et al, 2012)

10. การวินิจฉัยไวรัส MERS-CoV ในผู้ป่วย ตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก ที่ต้องตรวจยืนยัน 2 ยืนยัน ด้วยวิธี Real-time PCR และการถอดรหัสพันธุกรรม เพื่อยืนยันการติดเชื้อ โดยทางปฏิบัติหากทำตามขั้นตอนอาจต้องใช้เวลา 2-3 วันในการยืนยันผล ในกรณีการตรวจพบผู้ป่วยเมอร์สสายแรกของประเทศไทยนั้น ห้องปฏิบัติการของศูนย์ความร่วมมือองค์การอนามัยโลก ด้านค้นคว้าและอบรมโรคไวรัสส์ที่ศูนย์คน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการตรวจ 2 ยืนยัน ด้วยวิธี Real-time PCR ไปพร้อมกับ การตรวจด้วยวิธี Nested RT-PCR (Annan protocol) และถอดรหัสพันธุกรรม จึงทำให้สามารถรายงานผลเบื้องต้นได้ภายใน 8 ชั่วโมง และยืนยันผลการถอดรหัสพันธุกรรมภายใน 8 ชั่วโมงต่อมา ซึ่งกระทรวงสาธารณสุข ได้ตัดสินใจย้ายผู้ป่วยมายัง ห้อง Negative pressure ของสถาบันบำราศนราดูร หลังจากที่ได้รับผลการตรวจเบื้องต้น และแถลงข่าวการพบผู้ป่วยติดเชื้อเมอร์สหลังได้รับการยืนยันผลการถอดรหัสพันธุกรรม ใช้เวลารวมไม่เกิน 24 ชั่วโมงหลังการรับตัวอย่าง

11. ผลการถอดรหัสพันธุกรรม whole genome ของไวรัส MERS-CoV จากผู้ป่วยชาวโอมานที่พบในประเทศไทยทั้ง 2 ราย เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อไวรัสจากอูฐ (camel, รูปที่ 8) พบว่าจัดอยู่ใน clade เดียวกับเชื้อไวรัสจากอูฐในประเทศซาอุดีอาระเบียในปี ค.ศ.2015 โดยอยู่คนละ clade กับเชื้อไวรัสจากอูฐในประเทศอียิปต์ในปีค.ศ.2013 และผู้ป่วยเมอร์สสายแรกชาวซาอุดีอาระเบียในปี ค.ศ.2012 แต่เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับไวรัส betaCoV-C จากค้างคาวในประเทศจีน (HKU4 และ HKU5, accession nos. EF065505 และ EF065509 ตามลำดับ) และจากแอฟริกาใต้ (PML-PHE1) ดังรูปที่ 9 พบว่าเชื้อไวรัส betaCoV-C จากคนมีความเหมือนกับเชื้อไวรัสจากค้างคาว *Neoromicia capensis* (PML-PHE1, accession no.KC869678.4) จากแอฟริกาใต้ มากกว่าเชื้อไวรัสจากค้างคาวไฟและค้างคาวลูกหนูในประเทศจีน

สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)

1. ไวรัสโคโรนาในค้างคาวมีหลากหลายสายพันธุ์และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง การเลือกใช้วิธีในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อไวรัสโคโรนา จำเป็นต้องใช้ primer ในลักษณะที่จับเป็นกลุ่มของไวรัส แล้วจึงนำมาวิเคราะห์แยกสายพันธุ์ด้วยวิธีการถอดรหัสพันธุกรรม แทนการใช้ primer ที่มีลักษณะจำเพาะต่อชนิดของเชื้อ

2. หลักการศึกษความหลากหลายของเชื้อไวรัสโคโรนาในค้างคาวดังกล่าว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยเชื้อไวรัสโคโรนาในคน เพื่อค้นหาเชื้อกลายพันธุ์ รวมทั้งเชื้อชนิดใหม่ๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่ต่อไปในอนาคต

3. การพบไวรัสโคโรนาในกลุ่ม MERS-CoV ในค้างคาวปากย่น นับเป็นการค้นพบที่มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากค้างคาวปากย่นเป็นค้างคาวที่มีจำนวนประชากรมากที่สุดในประเทศไทย คือประมาณ 8 ล้านตัว ที่ปัจจุบันพบถ้ำในประเทศไทยที่มีค้างคาวปากย่นอาศัยอยู่แล้ว 18 ถ้ำ (ถ้ำยาณี บุญเกิด และคณะ, 2553) และหลายถ้ำเป็นที่เก็บมูลค้างคาวเพื่อนำไปทำปุ๋ยในภาคเกษตรกรรม เช่น ถ้ำค้างคาวเขาช่องพราน จังหวัดราชบุรี ถ้ำเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ถ้ำเขาหน่อ จังหวัดนครสวรรค์ เป็นต้น จึงมีความเสี่ยงสูงที่ค้างคาวอาจนำเชื้อไวรัสไปสู่คนหรือสัตว์อื่นๆ และก่อโรคได้ในอนาคต ดังนั้นการศึกษาเชิงลึกถึงไวรัสวิทยาของเชื้อดังกล่าว รวมทั้งความสามารถในการพัฒนาตัวเองจนอาจจะติดต่อโรคสู่คนและสัตว์อื่นได้ จึงเป็นเรื่องสำคัญเพื่อให้สามารถประเมินระดับความเสี่ยงของไวรัสโคโรนาในกลุ่มนี้ในการก่อโรคต่อคนและสัตว์อื่นต่อไปในอนาคต

4. ไวรัสโคโรนาที่พบจากค้างคาวในการศึกษารั้งนี้ แม้จะเป็นเชื้อไวรัสที่ยังไม่มีรายงานการก่อโรคในคนหรือสัตว์อื่น แต่การพบ co-infection ของไวรัสต่างชนิดในค้างคาวตัวเดียวกัน รวมทั้งการพบไวรัสโคโรนาต่างชนิดและ genus ในค้างคาวสปีชีส์เดียวกัน หรือในค้างคาวต่างสปีชีส์ที่อยู่อาศัยแหล่งเดียวกัน นอกจากจะเป็นตัวแปรเร่งให้ไวรัสมีการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์เกิดเป็นไวรัสใหม่แล้ว ยังเป็นการแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของไวรัสโคโรนาในค้างคาวในประเทศไทย และแสดงให้เห็นถึงความสามารถของไวรัสในการติดเชื้อข้ามสปีชีส์ของค้างคาว (cross species transmission) เหตุการณ์ดังกล่าวนี้ อาจเป็นตัวเร่งให้เกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสจากการ recombination ของไวรัสต่างชนิด และอาจกลายเป็นสายพันธุ์ก่อโรคในคนและสัตว์ได้ในอนาคต เพื่อให้มีความเข้าใจไวรัสวิทยาของไวรัสโคโรนาในค้างคาวมากยิ่งขึ้นจึงมีความสำคัญที่ควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการเกิด co-infection และ recombination ของไวรัสโคโรนาจากค้างคาวต่อไป

5. การศึกษาวิจัยไวรัส MERS-CoV ในค้างคาว ครั้งนี้ นอกจากจะได้ข้อมูลทางด้านไวรัสวิทยาและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสโคโรนาในค้างคาวในประเทศไทยแล้วนั้น ในอีกมุมหนึ่งที่ได้รับผลประโยชน์ที่

สำคัญยิ่งจากการดำเนินงานวิจัย คือการพัฒนาศักยภาพของห้องปฏิบัติการและบุคลากร ในการตรวจวินิจฉัยโรค MERS-CoV ในผู้ป่วย ที่สามารถนำประสบการณ์และวิธีการตรวจจากการศึกษาไวรัสในค้างคาว มาประยุกต์ใช้กับการตรวจวินิจฉัยในผู้ป่วยได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพสูง ทำให้มีความแม่นยำและมั่นใจในการรายงานผลการตรวจแม้จะเป็นการพบผู้ป่วยรายแรก (ครั้งแรก) ของประเทศ แต่ก็สามารถยืนยันผลการตรวจได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังการรับตัวอย่าง (รูปที่ 10) ช่วยให้กระทรวงสาธารณสุขสามารถควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายไปในวงกว้าง เฉกเช่นเดียวกับที่เคยเกิดขึ้นในประเทศเกาหลีเมื่อปี พ.ศ.2558

6. การตรวจวินิจฉัยสาเหตุของโรคติดต่อในผู้ป่วยอย่างรวดเร็วช่วยให้แพทย์สามารถรักษาโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว รวมทั้งหน่วยงานควบคุมโรคสามารถดำเนินการควบคุมการแพร่กระจายโรคสู่ชุมชนได้อย่างทันเวลาและเหมาะสม ลดผลกระทบต่อเศรษฐกิจ สังคม และสาธารณสุข นอกจากนี้การค้นหาและศึกษาคุณสมบัติเชื้อโรคใหม่ๆที่อาจก่อโรคในมนุษย์จากแหล่งรังโรคตามธรรมชาติ จะทำให้สามารถเตรียมความพร้อมรับมือต่อการระบาดที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งจะช่วยให้สามารถลดขนาดและความรุนแรงของการเกิดโรคระบาดได้ในอนาคต

บรรณานุกรม (Bibliography)

กัลยาณี บุญเกิด, ไสว วังหงสา, เจริญ พรหมมา, นราศักดิ์ บุญใหญ่, กิตติวรา ศิริภัทรนุกูล, พงศักดิ์ โคตรชมพู, วิศณ อ่วมแจ้ง. ค้างคาวถ้ำเจ้าราม. 2553. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19:456-9.

Anthony SJ, Ojeda-Flores R, Rico-Chávez O, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrel CM, Rostal MK, et al. Coronaviruses in bats from Mexico. *J Gen Virol.* 2013; 94:1028-38.

Chan JF, Li KS, To KK, Cheng VC, Chen H, Yuen KY. Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic? *J Infect.* 2012; 65:477-89.

Chan JF, Lau SK, To KK, Cheng VC, Woo PC, Yuen KY. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28:465-522.

Chu DK, Peiris JS, Chen H, Guan Y, Poon LL. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J Gen Virol.* 2008; 89:1282-7.

Corman VM, Ithete NL, Richards LR, Schoeman MC, Preiser W, Drosten C, et al. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J Virol.* 2014; 88:11297-303.

de Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, et al. Family Coronaviridae. 2011. In *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 806–28. Edited by King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Oxford Elsevier.

Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European

bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol.* 2010; 84:11336-49.

Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge JM, Vandenbogaert M, Maufrais C, et al. A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS ONE.* 2014; 9 (1), e87194.

Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013; 503:535–8.

Ge XY, Wang N, Zhang W, Hu B, Li B, Zhang YZ, et al. Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virol Sin.* 2016; 31:31-40.

Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003; 302:276–8.

Gouilh MA, Puechmaille SJ, Gonzalez JP, Teeling E, Kittayapong P, Manuguerra JC. SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory. *Infect Genet Evol.* 2011; 11:1690-702.

Ithete NL, Stoffberg S, Corman VM, Cottontail VM, Richards LR, Schoeman MC, et al. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19:1697-9.

Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:14040-5.

Lau SK, Poon RW, Wong BH, Wang M, Huang Y, Xu H, Guo R, Li KS, Gao K, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of *Rousettus* bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup. *J Virol.* 2010; 84:11385-94.

Lau SK, Li KS, Tsang AK, Shek CT, Wang M, Choi GK, Guo R, Wong BH, Poon RW, Lam CS, Wang SY, Fan RY, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. Recent transmission of a novel alphacoronavirus, bat coronavirus HKU10, from Leschenault's rousettes to pomona leaf-nosed bats: first evidence of interspecies transmission of coronavirus between bats of different suborders. *J Virol*. 2012 Nov;86(21):11906-18.

Lelli D, Papetti A, Sabelli C, Rosti E, Moreno A, Boniotti MB. Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. *Viruses*. 2013; 5:2679-89.

Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310:676-9.

Lai MMC, Perlman S, Anderson LJ. Coronaviridae. 2007. In *Fields Virology*, pp. 1305–36. Edited by Knipe PMHDM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE. Philadelphia PA Lippincott Williams, Wilkins.

Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, Fagbo SF, Kapoor V, Epstein JH, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19:1819-23.

Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, et al. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15:1377-84.

Quan PL, Firth C, Street C, Henriquez JA, Petrosov A, Tashmukhamedova A, et al. Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio*. 2010;1(4).

Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110, 8194–99.

Tong S, Conrardy C, Ruone S, Kuzmin IV, Guo X, Tao Y, et al. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15:482–5.

Wacharapluesadee S, Duengkae P, Rodpan A, Kaewpom T, Maneeorn P, Kanchanasaka B, et al. Diversity of coronavirus in bats from Eastern Thailand. *Virology*. 2015; 11;12:57

Wacharapluesadee S, Sintunawa C, Kaewpom T, Khongnomnan K, Olival KJ, Epstein JH, et al. Group C betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19:1349-51.

Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, et al. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1217-23.

Woo PC, Lau SK, Li KS, Poon RW, Wong BH, Tsoi HW, et al. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*. 2006; 351:180e7.

Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, et al. MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20:1260-2.

Yuan J, Hon CC, Li Y, Wang D, Xu G, Zhang H, et al. Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *J Gen Virol*. 2010; 91:1058-62.

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia *N Engl J Med*. 2012; 367:1814–20.

ภาคผนวก (Appendix)

ตารางที่ A1 รายชื่อ species ค้างคาวที่มีการรายงานพบไวรัสในกลุ่มเดียวกับ MERS CoVที่มีการรายงานตั้งแต่ปี 2006 ถึง ตุลาคม 2014

Bat Species	Bat Family	ประเทศที่รายงาน	Bat range	พบในไทย	Ref.
<i>Neoromicia capensis</i>	VESPERTILIONIDAE	South Africa	sub-Saharan Africa	ไม่พบทั้งระดับ species และ genus	1
<i>Vespertilio superans</i>	VESPERTILIONIDAE	China	China; Japan; Korea, Democratic People's Republic of; Korea, Republic of; Mongolia; Russian Federation; Taiwan, Province of China	ไม่พบทั้งระดับ species	2
<i>Eptesicus serotinus</i>	VESPERTILIONIDAE	Italy	Palearctic from the Atlantic to the Pacific seaboard, across the Mediterranean from Portugal eastwards to Turkey, and is marginal to North Africa	พบระดับ species	3
<i>Taphozous perforatus</i>	EMBALLONURIDAE	Saudi Arabia	widely throughout northern and sub-Saharan Africa, the Arabian Peninsula, and Asia, east to the Indian Subcontinent	ไม่พบระดับ species	4
<i>Nyctalus noctula</i>	VESPERTILIONIDAE	Italy	wide Palearctic distribution, including Europe and southern Scandinavia to the Urals and Caucasus; Turkey to Israel and Oman; western Turkmenistan, western Kazakhstan, Uzbekistan, Kyrgyzstan, and Tajikistan to south-west Siberia and the Himalayas, south to Myanmar, Viet Nam, and western Malaysia	พบระดับ species	5
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	VESPERTILIONIDAE	Italy	widespread in Africa, Europe and Asia. <i>Pipistrellus kuhlii</i> has a large range extending from Iberia through southern Europe through the Near East and the Caucasus to Kazakhstan, Pakistan, and India	ไม่พบระดับ species	5

ตารางที่ A1 (ต่อ)

Bat Species	Bat Family	ประเทศที่รายงาน	Bat range	พบในไทย	Ref.
Hypsugo savii	VESPERTILIONIDAE	Italy	wide range in the Palaearctic (and marginally in Indomalaya), extending from southern Europe and north Africa (Morocco, Algeria, Tunisia, the Canary Islands of La Palma, Tenerife, La Gomera, Gran Canaria, and El Hierro, and the Cape Verde Islands of Santiago and San Vicente) through the Middle East and the Caucasus to Kazakhstan, Turkmenistan, Uzbekistan, Kyrgyzstan, Tajikistan, Afghanistan and northern India	ไม่พบทั้งระดับ species และ genus	5
Erinaceus europaeus	ERINACEIDAE	Germany	Europe (including European Russia), with a global distribution extending from the British Isles and the Iberian peninsula, westwards through much of western to central Europe; and from southern Fennoscandia, and the northern Baltic to north-west Russia	ไม่พบทั้งระดับ species/ genus/ family	6
Tylonycteris pachypus	VESPERTILIONIDAE	China	southern and northeastern South Asia, southern China, and much of Southeast Asia	พบระดับ species	7
Pipistrellus abramus	VESPERTILIONIDAE	China	southern Ussuri region (Russia and China), the western half of China including Taiwan, Japan, the Korean Peninsula, Viet Nam, Myanmar, and India	ไม่พบระดับ species แต่พบในระดับ genus	7,13
Nyctinomops laticaudatus	MOLOSSIDAE	Mexico	Tamaulipas and Jalisco (Mexico) to Venezuela and the Guianas, northwest Peru, Bolivia, northern Argentina, Paraguay, and Brazil; Trinidad; Cuba	ไม่พบทั้งระดับ species และ genus	8

ตารางที่ A1 (ต่อ)

Bat Species	Bat Family	ประเทศที่รายงาน	Bat range	พบในไทย	Ref.
<i>Pteronotus parnellii</i>	MORMOOPIDAE	Mexico	Central, and South America, and the Caribbean. This bat ranges from Peru, Ecuador, Bolivia, Brazil, Guianas, Suriname, and Venezuela to S Sonora and S Tamaulipas (Mexico); Cuba; Jamaica; Puerto Rico; Hispaniola; St. Vincent; Trinidad and Tobago; Margarita Isl (Venezuela); La Gonave Isl	ไม่พบทั้งระดับ species/ genus/ family	8
<i>Artibeus lituratus</i>	PHYLLOSTOMIDAE	Mexico	Michoacan, Sinaloa, and Tamaulipas (Mexico) south to Southern Brazil, Northern Argentina, and Bolivia; Trinidad and Tobago; Southern Lesser Antilles; Trés Marias Isls	ไม่พบทั้งระดับ species/ genus/ family	8
<i>Artibeus phaeotis</i>	PHYLLOSTOMIDAE	Mexico	Veracruz, Sinaloa, and Michoacan (Mexico) south to Ecuador and Guyana	ไม่พบทั้งระดับ species/ genus/ family	8
<i>Neoromicia zuluensis</i>	VESPERTILIONIDAE	South Africa	Angola (Angola); Botswana; Congo, The Democratic Republic of the; Ethiopia; Kenya; Malawi; Namibia; South Africa; South Sudan; Uganda; Zambia; Zimbabwe	ไม่พบทั้งระดับ species และ genus	9
<i>Pteronotus davyi</i>	MORMOOPIDAE	Mexico	occurs throughout northwest Peru and northern Venezuela to southern Baja California, southern Sonora, and Nuevo León (Mexico), Trinidad, southern Lesser Antilles.	ไม่พบทั้งระดับ species/ genus/ family	10
<i>Pipistrellus nathusii</i>	VESPERTILIONIDAE	Ukraine, Romania	widespread across southern Europe although apparently absent from most of Iberia (although there have been some new recent records in Spain which extend the known range) and Fennoscandia.	ไม่พบระดับ species แต่พบในระดับ genus	11

ตารางที่ A1 (ต่อ)

Bat Species	Bat Family	ประเทศที่รายงาน	Bat range	พบในไทย	Ref.
Pipistrellus pygmaeus	VESPERTILIONIDAE	Romania	occurring from the British Isles through much of Europe (including the islands of Corsica and Sardinia) east to Ukraine and western Russia	ไม่พบระดับ species แต่พบในระดับ genus	11
Pipistrellus pipistrellus	VESPERTILIONIDAE	Netherlands China	British Isles through southern Scandinavia, much of Europe (including all the Mediterranean countries, but with the exception of northern Fennoscandia) to the Volga and Caucasus; and through parts of north-western Africa (mountainous areas of Morocco, Algeria and Tunisia, also in Cyrenaica in Libya) and south-west Asia to central and eastern Asia (China, India, Myanmar).	ไม่พบระดับ species แต่พบในระดับ genus	11 13
Nycteris sp	NYCTERIDAE	Ghana	East Malaysia, Indonesia, and many parts of Africa	พบในระดับ genus	12
Rhinolophus ferrumequinum	RHINOLOPHIDAE	China	wide range in the Palearctic, occurring from North Africa and southern Europe through south-west Asia, the Caucasus, Iran, Afghanistan, Pakistan and the Himalayas to south-eastern China, Korea, and Japan	ไม่พบระดับ species แต่พบในระดับ genus	13

เอกสารอ้างอิงของตาราง A1

1. Corman VM, Ithete NL, Richards LR, Schoeman MC, Preiser W, Drosten C, Drexler JF.

Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. J Virol. 2014 Oct;88(19):11297-303.

2. Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhang S, Jin Q. MERS-related betacoronavirus in Vespertilio superans bats, China. Emerg Infect Dis. 2014 Jul;20(7):1260-2.

3. De Benedictis P, Marciano S, Scaravelli D, Priori P, Zecchin B, Capua I, Monne I, Cattoli G. Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. *Virus Genes*. 2014 Apr;48(2):366-71.
4. Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, Fagbo SF, Kapoor V, Epstein JH, Alhakeem R, Durosintoun A, Al Asmari M, Islam A, Kapoor A, Briese T, Daszak P, Al Rabeeah AA, Lipkin WI. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis*. 2013 Nov;19(11):1819-23.
5. Lelli D, Papetti A, Sabelli C, Rosti E, Moreno A, Boniotti MB. Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. *Viruses*. 2013 Oct 31;5(11):2679-89.
6. Corman VM, Kallies R, Philipps H, Göpner G, Müller MA, Eckerle I, Brünink S, Drosten C, Drexler JF. Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *J Virol*. 2014 Jan;88(1):717-24.
7. Lau SK, Li KS, Tsang AK, Lam CS, Ahmed S, Chen H, Chan KH, Woo PC, Yuen KY. Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*. 2013 Aug;87(15):8638-50.
8. Anthony SJ, Ojeda-Flores R, Rico-Chávez O, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrel CM, Rostal MK, Epstein JH, Tipps T, Liang E, Sanchez-Leon M, Sotomayor-Bonilla J, Aguirre AA, Ávila-Flores R, Medellín RA, Goldstein T, Suzán G, Daszak P, Lipkin WI. Coronaviruses in bats from Mexico. *J Gen Virol*. 2013 May;94(Pt 5):1028-38.
9. Ithete NL, Stoffberg S, Corman VM, Cottontail VM, Richards LR, Schoeman MC, Drosten C, Drexler JF, Preiser W. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2013 Oct;19(10):1697-9.
10. Góes LG, Ruvalcaba SG, Campos AA, Queiroz LH, de Carvalho C, Jerez JA, Durigon EL, Dávalos LI, Dominguez SR. Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2013 Oct;19(10):1711-3.
11. Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK, Lina PH, Godlevska EV, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis*. 2013 Mar;19(3):456-9.
12. Falcón A, Vázquez-Morón S, Casas I, Aznar C, Ruiz G, Pozo F, Perez-Breña P, Juste J, Ibáñez C, Garin I, Aihartza J, Echevarría JE. Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Arch Virol*. 2011 Oct;156(10):1883-90.
13. Tang XC, Zhang JX, Zhang SY, Wang P, Fan XH, Li LF, Li G, Dong BQ, Liu W, Cheung CL, Xu KM, Song WJ, Vijaykrishna D, Poon LL, Peiris JS, Smith GJ, Chen H, Guan Y. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J Virol*. 2006 Aug;80(15):7481-90.

ตาราง A2 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยวิธี Real-time RT-PCR 3 แบบ (Watanabe et al., 2010, Quan et al., 2010 และ Anan et al., 2013) จำนวน 270 ตัว ที่เก็บจาก 5 แหล่ง ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B54001	3/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54003	3/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54004	3/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54005	3/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54006	3/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54007	3/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54009	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54010	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54011	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54013	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus sphinx</i>	-	Neg	Neg	Neg
B54014	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54015	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54016	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54017	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54018	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54021	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54022	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	F	Pos/HKU10	Neg	Pos/BetaD
B54023	4/12/54	จันทบุรี (A)	<i>Eonycteris spelaea</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54024	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54025	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54027	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54030	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54031	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54032	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54033	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54034	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54035	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54036	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B54038	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54039	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54040	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54044	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54045	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54046	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Pos/HKU10	Neg	Neg
B54047	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54048	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54049	4/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54051	5/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54052	5/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	F	Neg	Neg	Pos/BetaD
B54053	5/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	F	Neg	Neg	Pos/BetaD
B54057	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54058	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Eonycteris spelaea</i>	F	Neg	Neg	Neg
B54059	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg	Pos/BetaD
B54060	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54061	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54062	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	M	Neg	Neg	Neg
B54063	6/12/54	จันทบุรี (B)	<i>Cynopterus brachyotis</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55081	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55082	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55083	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55084	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55085	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55086	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55087	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55092	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Pos/CoV1AB	Neg	Neg
B55093	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55095	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55096	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55097	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg

Code	Date	ฉะเชิงเทรา (C)	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55098	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55101	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55102	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55103	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55104	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55105	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55106	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55107	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Pos/HKU10	Neg	Neg
B55108	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55109	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55110	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55111	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	-	Neg	Neg	Neg
B55112	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55113	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55114	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55115	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55116	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55117	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55118	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55120	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55121	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55122	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55123	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55124	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55125	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55126	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55127	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55128	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55129	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55130	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55131	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55132	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55133	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55134	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55135	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55136	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55137	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55138	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55139	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55140	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55141	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55142	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55143	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55144	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55145	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55146	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55147	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55149	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55150	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55152	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55153	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55154	27/1/55	ฉะเชิงเทรา (C)	<i>Taphozous longimanus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55161	28/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55162	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55167	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55172	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55174	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55176	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55179	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55180	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55183	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55184	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55189	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55193	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55194	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55195	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55197	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55198	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55199	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55200	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55201	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55203	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55204	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55206	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55207	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55208	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55209	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55210	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55211	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55212	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55213	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55214	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55215	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55216	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55217	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55218	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55219	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55220	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55221	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55222	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55223	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55224	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55225	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55226	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55227	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55228	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55229	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55230	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55231	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55232	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55234	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55235	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55236	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55237	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55238	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55239	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55240	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55241	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55242	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55243	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55244	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55245	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55246	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55247	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55248	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55249	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55250	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55251	27/1/56	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55252	27/1/57	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55253	27/1/58	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55254	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55256	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55258	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55259	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55260	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55261	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55262	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55263	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55264	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55265	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55266	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55267	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55268	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55269	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55270	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55271	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55272	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55273	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55274	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55275	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55276	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55277	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55278	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55279	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55280	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55281	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55283	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros lekaguli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55285	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55286	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55288	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros armiger</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55291	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55292	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55297	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55299	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Myotis horsfieldi</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55300	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55301	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55302	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55304	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	F	Neg	Pos/CoV1AB	Neg
B55305	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55307	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55310	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Pos/BetaCoV
B55311	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55314	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55315	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55316	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55317	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55318	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	F	Neg	Pos/HKU2	Neg
B55319	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Pos/CoV1AB	Neg
B55320	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55321	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Pos/CoV1AB	Neg
B55322	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55323	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55325	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55326	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55327	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55329	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55330	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55331	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Pos/CoV1AB	Neg
B55332	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	F	Neg	Pos/CoV1AB	Neg
B55333	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Pos/HKU8	Neg
B55334	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Pos/CoV 1B	Neg
B55336	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55337	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55338	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Pos/CoV 1B	Neg
B55342	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	M	Neg	Pos/CoV1A BB	Neg
B55343	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Myotis horsfieldi</i>	M	Neg	Neg	Neg

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster		
					Watanabe	Quan	Annan
B55344	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55345	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Pos/CoV1A BB	Neg
B55348	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Miniopterus magnater</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55349	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55401	27/1/55	สระแก้ว (D)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55066	7/1/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55080	8/1/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	F	Pos/CoV512	Neg	Neg
B55438	3/3/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55454	22/4/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55455	22/4/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55456	22/4/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55457	22/4/55	ชลบุรี (E)	<i>Myotis horsfieldi</i>	M	Neg	Neg	Neg
B55701	19/5/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55735	20/5/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Pos/BetaD	Pos/BetaD	Pos/BetaD
B55736	9/6/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Pos/Beta D	Neg	Neg
B55740	9/6/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophillus kuhli</i>	M	Pos/Beta D	Pos/BtCoV512	Neg
B55745	9/6/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophillus kuhli</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55762	10/6/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	F	Pos/Beta D	Pos/BetaD	Neg
B55788	21/7/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55811	22/7/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	M	Pos/CoV512	Pos/CoV512	Neg
B55988	13/9/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathi</i>	F	Neg	Neg	Neg
B55989	13/9/55	ชลบุรี (E)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Pos/BetaD	Pos/BetaD	Neg
B551055	10/11/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	F	Neg	Pos/CoV512	Neg
B551057	10/11/55	ชลบุรี (E)	<i>Scotophilus heathii</i>	M	Neg	Neg	Neg
B551060	10/11/55	ชลบุรี (E)	<i>Eonycteris spelaea</i>	F	Neg	Neg	Neg

*พื้นที่จับและเก็บตัวอย่างค้างคาว ระหว่าง พ.ศ. 2554-2555

Code A: บ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี จำนวน 18 ตัว

Code B: วัดถ้ำสาริกา จังหวัดจันทบุรี จำนวน 29 ตัว

Code C: วัดเขาถ้ำแรด จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 64 ตัว

Code D: วัดถ้ำเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว (ข)จำนวน 139 ตัว

Code E: อำเภอนันทนิคม จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 ตัว

ตารางที่ A3 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยวิธี Real-time RT-PCR 2 แบบ (Watanabeและ Anan) ค้างคว
จำนวน 375 ตัว ที่เก็บจาก 8 แหล่ง ระหว่าง พ.ศ. 2556-2558

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B56218	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56219	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	POS/BetaCoV
B56220	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	POS/BetaCoV
B56221	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56222	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56223	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56224	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56225	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56226	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56227	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56228	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56229	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56230	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	POS/BetaCoV
B56231	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56232	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56233	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56235	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56237	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	POS/BetaCoV
B56238	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56239	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56240	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B56241	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56242	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56243	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56244	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56245	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B56246	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg
B56247	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B56248	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B56249	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56250	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56251	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56252	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56253	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56254	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56255	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56256	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B56257	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56258	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56259	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56260	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56261	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	POS/HKU10	Neg
B56262	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56263	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg
B56264	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56265	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56266	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56267	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56268	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg
B56269	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56270	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56271	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56272	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg
B56273	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56274	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	F	Neg	Neg
B56275	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56276	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56277	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56278	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B56279	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56280	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56281	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	POS/BetaCoV
B56282	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56283	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56284	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56285	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56287	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56288	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56289	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56290	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56291	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56292	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56293	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56294	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B56295	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56296	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B56297	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56298	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B56299	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B56300	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56301	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56302	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	POS/BetaC	POS/BetaC
B56303	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56304	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56305	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56306	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56307	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	M	Neg	Neg
B56308	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	POS/HKU8	Neg
B56309	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	POS/BetaC

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B56310	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	POS/BetaC
B56311	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56312	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56313	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	POS/BetaC	POS/BetaC
B56314	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56316	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56317	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B56318	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	POS/BetaC	POS/BetaC
B56319	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	POS/BetaC	POS/BetaC
B56320	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B56321	22/10/56	ราชบุรี (F)	<i>Taphozous melanopogon</i>	M	Neg	Neg
B57001	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57002	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57003	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57004	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57005	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57006	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57007	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57008	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57009	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57010	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57011	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57012	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57013	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57014	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57015	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57016	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57017	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57018	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57019	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B57020	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57021	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57023	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus pusillus</i>	-	Neg	Neg
B57024	1/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57025	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57026	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57027	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57028	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57029	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57030	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57031	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57032	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57033	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57034	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57035	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57036	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57037	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57038	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57039	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57040	2/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57041	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Myotis muricola</i>	F	Neg	Neg
B57042	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57043	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	Neg	Neg
B57044	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57045	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57046	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	Neg	Neg
B57047	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Megaerops niphanae</i>	M	Neg	Neg
B57048	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	Neg	Neg
B57049	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B57050	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg

ตาราง A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B57051	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B57052	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	POS/BetaD	Neg
B57053	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57054	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	Neg	Neg
B57055	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57056	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Hipposideros diadema</i>	F	Neg	Neg
B57057	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	Neg
B57060	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	Neg
B57062	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	Neg
B57064	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	Neg
B57066	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	Neg
B57069	3/4/57	สระบุรี (G)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	Neg
B57070	4/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57071	4/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57072	4/4/57	สระบุรี (G)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57075	21/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Macroglossus minimus</i>	M	Neg	Neg
B57076	21/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B57077	21/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B57078	21/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Rhinolophus affinis</i>	F	Neg	Neg
B57079	21/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Macroglossus minimus</i>	M	Neg	Neg
B57080	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	M	Neg	Neg
B57081	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	M	Neg	Neg
B57082	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	F	Neg	Neg
B57083	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	F	Neg	Neg
B57084	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	M	Neg	Neg
B57085	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	M	Neg	Neg
B57086	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	Neg	Neg
B57087	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B57088	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B57089	22/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg

ตาราง A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B57090	23/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	M	Neg	Neg
B57091	23/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	M	Neg	Neg
B57092	23/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	M	Neg	Neg
B57093	23/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	F	Neg	Neg
B57094	23/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	M	Neg	Neg
B57095	23/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	M	Neg	Neg
B57096	24/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57097	24/7/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	F	Neg	Neg
B57098	21/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B57099	21/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B57100	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Myotis</i> sp.	M	Neg	Neg
B57101	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Myotis</i> sp.	F	Neg	Neg
B57102	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57103	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Rousettus leschenaulti</i>	F	Neg	Neg
B57104	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57105	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57106	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57107	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57108	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57109	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57110	23/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	POS/BetaC	Neg
B57111	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57112	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57113	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57114	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57115	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B57116	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57117	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B57118	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Megaerops niphanae</i>	M	Neg	Neg
B57119	24/12/57	กาญจนบุรี (H)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg

ตาราง A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B58001	16/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus shameli</i>	M	Neg	Neg
B58002	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B58003	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58004	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58005	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58006	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus luctus</i>	F	Neg	Neg
B58007	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58008	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58009	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus luctus</i>	M	Neg	Neg
B58010	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	M	Neg	Neg
B58011	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58012	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58013	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58014	17/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58015	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	M	Neg	Neg
B58016	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	POS/BetaCoV
B58017	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58018	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Myotis muricola</i>	F	Neg	Neg
B58019	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B58020	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58021	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	F	Neg	Neg
B58022	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus pusillus</i>	F	Neg	Neg
B58023	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	F	Neg	Neg
B58024	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus pusillus</i>	M	Neg	Neg
B58025	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	F	Neg	Neg
B58026	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	M	Neg	Neg
B58027	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58028	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58029	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	F	POS/BetaD	POS/BetaCoV
B58030	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B58031	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58032	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58033	18/02/58	นครราชสีมา (J)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58034	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58035	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Myotis muricola</i>	F	Neg	Neg
B58036	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58037	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B58038	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B58039	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58040	01/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58041	02/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58042	02/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58043	02/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58044	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Rhinolophus affinis</i>	F	Neg	Neg
B58045	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58046	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Rhinolophus affinis</i>	F	Neg	Neg
B58047	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Rhinolophus affinis</i>	F	Neg	Neg
B58048	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Rhinolophus affinis</i>	F	Neg	Neg
B58049	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Myotis muricola</i>	M	Neg	Neg
B58050	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Myotis muricola</i>	M	Neg	Neg
B58051	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58052	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	POS/BetaD	Neg
B58053	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58054	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58055	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58056	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	POS/BetaD	Neg
B58057	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58058	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58059	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58060	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Megaerops niphanae</i>	M	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B58061	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58062	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58063	03/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58064	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	POS/BetaC	POS/BetaC
B58065	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58066	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	M	Neg	Neg
B58067	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58068	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Megaerops niphanae</i>	F	Neg	Neg
B58069	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58070	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58071	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58072	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58073	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58074	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B58075	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg
B58076	04/02/58	เชียงใหม่ (I)	<i>Macroglossus sobrinus</i>	M	Neg	Neg
B58077	25/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros diadema</i>	F	Neg	Neg
B58078	25/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros diadema</i>	F	Neg	Neg
B58079	25/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros galeritus</i>	F	Neg	Neg
B58080	25/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	F	Neg	Neg
B58081	25/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	F	Neg	Neg
B58082	25/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	F	Neg	Neg
B58083	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros armiger</i>	M	Neg	Neg
B58084	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58085	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B58086	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	M	Neg	Neg
B58088	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros lylei</i>	F	Neg	Neg
B58090	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58091	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros lylei</i>	M	Neg	Neg
B58092	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Cynopterus sphinx</i>	F	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B58093	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B58094	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Rhinolophus pusillus</i>	F	Neg	Neg
B58095	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58096	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	F	Neg	Neg
B58097	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58098	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58099	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	F	Neg	Neg
B58100	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58101	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	F	Neg	Neg
B58102	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58103	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58104	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58105	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58106	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58107	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58108	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58109	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	F	Neg	Neg
B58110	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	M	Neg	Neg
B58111	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	F	Neg	Neg
B58112	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58113	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	F	Neg	Neg
B58114	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58116	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	Neg
B58118	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros pomona</i>	F	Neg	Neg
B58119	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	F	Neg	Neg
B58120	26/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	M	Neg	Neg
B58121	27/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	F	Neg	Neg
B58122	27/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Hipposideros larvatus</i>	F	Neg	Neg
B58123	27/05/58	กาญจนบุรี (K)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	M	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B58123/1	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Megaderma spasma</i>	M	Neg	Neg
B58124	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Megaderma spasma</i>	F	Neg	Neg
B58125	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Megaderma spasma</i>	M	Neg	Neg
B58127	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	M	Neg	POS/BetaB
B58128	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Rhinolophus malayanus</i>	F	Neg	POS/BetaB
B58129	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Hipposideros larvatus</i>	M	Neg	POS/BetaCoV
B58130	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Chaerephon plicata</i>	F	Neg	Neg
B58131	20/06/58	อุทัยธานี (L)	<i>Myotis muricola</i>	F	Neg	Neg
B58130/1	27/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58131/1	27/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58132	27/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58133	27/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58134	27/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58135	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58136	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58137	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58138	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58139	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58140	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58141	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58142	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58143	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58144	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58145	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58146	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58147	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58148	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58149	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58150	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg

ตารางที่ A3 (ต่อ)

Code	Date	Location (code)*	Species	Sex	PCR results - Protocol/ CoV-cluster	
					Watanabe	Annan
B58151	28/06/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58152	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58153	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58154	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58155	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58156	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58157	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58158	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58160	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58161	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58162	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58163	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58164	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58165	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58166	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58167	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	F	Neg	Neg
B58168	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg
B58169	01/07/58	อุทัยธานี (M)	<i>Tylonycteris robustula</i>	M	Neg	Neg

*พื้นที่จับและเก็บตัวอย่างค้างคาว ระหว่าง พ.ศ. 2556-2558

Code F: ถ้ำค้างคาวเขาสองพราน จังหวัดราชบุรี จำนวน 100 ตัว

Code G: ศูนย์ศึกษาธรรมชาติ เจ็ดคด โป่งก้อนเส้า จังหวัดสระบุรี จำนวน 64 ตัว

Code H: สถานีวิจัยลุ่มน้ำแม่กลอง จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 45

Code I: อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 43 ตัว

Code J: สถานีฝึกนิสิตวนาศาสตร์ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 33 ตัว

Code K: อุทยานแห่งชาติเอราวัณ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 43 ตัว

Code L: เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 8 ตัว

Code M: สถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 39 ตัว

ตารางที่ A4 รายชื่อค้างคาวในการศึกษาครั้งนี้ เรียงตามลำดับอักษรของ Scientific name

Scientific name	Common Name (s)	Thai name	Family
<i>Chaerephon plicata</i>	Wrinkle-lipped Free-tailed Bat	ค้างคาวปากย่น	Molossidae
<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	Kitti's hog-nosed bat	ค้างคาวคูนกิตติ	Craseonycteridae
<i>Cynopterus brachyotis</i>	lesser short-nosed fruit bat	ค้างคาวขอบหูขาวเล็ก	Pteropodidae
<i>Cynopterus sphinx</i>	greater short-nosed fruit bat	ค้างคาวขอบหูขาวกลาง	Pteropodidae
<i>Eonycteris spelaea</i>	lesser dawn bat	ค้างคาวเล็บกุด	Pteropodidae
<i>Hipposideros armiger</i>	great roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์ทศกรณ	Hipposideridae
<i>Hipposideros diadema</i>	diadem roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์หมอนโค้ง	Hipposideridae
<i>Hipposideros galeritus</i>	Cantor's roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์สองหีบ	Hipposideridae
<i>Hipposideros larvatus</i>	intermediate roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์สามหีบ	Hipposideridae
<i>Hipposideros lekaguli</i>	large Asian roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์หมอบูญส่ง	Hipposideridae
<i>Hipposideros lylei</i>	Shield-faced roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์กระบังหน้า	Hipposideridae
<i>Hipposideros pomona</i>	Pomona roundleaf bat	ค้างคาวหน้ายักษ์เล็ก	Hipposideridae
<i>Macroglossus minimus</i>	lesser long-tongued fruit bat	ค้างคาวหน้ายาวเล็ก	Pteropodidae
<i>Macroglossus sobrinus</i>	greater long-tongued fruit bat	ค้างคาวหน้ายาวใหญ่	Pteropodidae
<i>Megaderma spasma</i>	lesser false vampire bat	ค้างคาวแวมไพร์แปลงเล็ก	Megadermatidae
<i>Megaerops niphanae</i>	Ratanaworabhan's fruit bat	ค้างคาวขอบหูดำเหนือ	Pteropodidae
<i>Miniopterus magnater</i>	western bent-winged bat	ค้างคาวปีกพับดำใหญ่	Miniopteridae
<i>Miniopterus schreibersii</i>	Schreibers's long-fingered bat	ค้างคาวปีกพับใหญ่	Miniopteridae
<i>Myotis horsfieldi</i>	Horsfield's bat	ค้างคาวหูหนูตีนโตเล็ก	Vespertilionidae
<i>Myotis muricola</i>	Wall-roosting mouse-eared bat	ค้างคาวหูหนูตีนเล็กเขี้ยวยาว	Vespertilionidae
<i>Myotis</i> sp.	mouse-eared bats	ค้างคาวหูหนู	Vespertilionidae
<i>Rhinolophus affinis</i>	intermediate horseshoe bat	ค้างคาวมงกุฎเทาแดง	Rhinolophidae
<i>Rhinolophus coelophyllus</i>	croset horseshoe bat	ค้างคาวมงกุฎปลอมเล็ก	Rhinolophidae
<i>Rhinolophus luctus</i>	woolly horseshoe bat	ค้างคาวมงกุฎใหญ่	Rhinolophidae
<i>Rhinolophus malayanus</i>	Malayan horseshoe bat	ค้างคาวมงกุฎลาย	Rhinolophidae
<i>Rhinolophus pusillus</i>	least horseshoe bat	ค้างคาวมงกุฎเล็ก	Rhinolophidae
<i>Rhinolophus shameli</i>	Shamel's horseshoe bat	ค้างคาวมงกุฎปลอมใหญ่	Rhinolophidae
<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	Geoffroy's rousette	ค้างคาวบัวพันกลม	Pteropodidae
<i>Rousettus leschenaulti</i>	Leschenault's Rousette	ค้างคาวบัวพันรี	Pteropodidae
<i>Scotophilus heathi</i>	greater Asiatic yellow bat	ค้างคาวเพดานใหญ่	Vespertilionidae
<i>Scotophilus kuhlii</i>	lesser Asiatic yellow bat	ค้างคาวเพดานเล็ก	Vespertilionidae
<i>Taphozous longimanus</i>	long-winged tomb bat	ค้างคาวปีกถุงต่อมคาง	Emballonuridae
<i>Taphozous melanopogon</i>	black-bearded tomb bat	ค้างคาวปีกถุงเคราดำ	Emballonuridae
<i>Tylonycteris robustula</i>	Greater Bamboo Bat	ค้างคาวไผ่หัวแบนใหญ่	Vespertilionidae