

การสำรวจไวรัสโคโรนาในนกในประเทศไทย

A Survey of Coronaviruses in Birds in Thailand

เจริญชัย โตไธสง¹ ภัคพล ศิลปานนท์^{1*} กิรณา นรเดชานนท์¹ อนัญพร สุภัทรกุล²
และณัฐกานต์ ทิพม่อม²

Charoenchai Tothaisong¹, Pakaphol Sinlapanon^{1*}, Kirana Noradechanon¹

Ananporn Supataragul² and Nattakarn Thippamom²

¹สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพฯ 10900

²ศูนย์โรคอุบัติใหม่ด้านคลินิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ 10330

¹Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok, Thailand 10900

²Thai Red Cross Emerging Infectious Diseases Clinical Center, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author: sinlapanon1979@gmail.com

Received: September 11, 2023

Revised: September 05, 2024

Accepted: September 30, 2024

Abstract

Coronaviruses (CoVs) are a global threat to public health, animal health, and wildlife health. They cause emerging infectious diseases and infect multiple hosts. While there have been numerous studies on mammalian coronaviruses, research on CoVs in birds is limited. To bridge this gap, the Department of National Parks, Wildlife, and Plant Conservation conducted a survey in Thailand to investigate CoVs in various bird species. Between October 2020 and September 2022, oral and cloacal swabs were collected from these birds and analyzed in the laboratory using RT-PCR and sequencing to detect and identify CoVs. A total of 530 samples were collected from 24 bird species, including shorebirds, waterfowl, wading birds, passerines and doves. Among these, 265 birds were identified, with 41.51% (110/265) being shorebirds, 21.13% (56/265) waterfowl, 20.38% (54/265) passerines, 10.19% (27/265) doves, and 6.79% (18/265) wading birds. The positive rate of CoVs was found to be 6.03% (16/265). These positive samples were classified as gammacoronaviruses, with 6.52% (3/46) detected in Lesser Whistling-Duck (*Dendrocygna javanica*) and 2.63% (1/38) in Whiskered Tern (*Chlidonias hybrida*). Deltacoronaviruses were identified in 100% (6/6) of Eastern Cattle Egret (*Bubulcus coromandus*), 33.33% (2/6) of Indian Cormorant (*Phalacrocorax fuscicollis*), 28.57% (2/7) of Little Egret (*Egretta garzetta*), 9.09% (1/11) Rock Pigeon (*Columba livia*), and 6.66% (2/30) of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). It is worth noting that all positive birds appeared to be healthy. The genetic characteristics of these CoVs were similar to those found in similar bird species in other regions. Although there were no reports of abnormal sickness or mortality events among birds in the study areas, the results suggest the circulation of these viruses in local birds and their potential role in maintaining the viral transmission cycle in the

region. To gain a better understanding of the epidemiology of CoVs in birds and to monitor the viral transmission cycle in the region, continuous surveillance of CoVs in migratory birds should be conducted.

Keywords: birds, coronaviruses, deltacoronaviruses, gammacoronaviruses, Thailand

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสโคโรนาเป็นเชื้อที่พบได้ในสัตว์หลายชนิดและก่อให้เกิดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่อันเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพคน สัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่า การเฝ้าระวังไวรัสโคโรนาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้นำไปสู่การค้นพบไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่จำนวนมาก แต่ยังคงมีการศึกษาเชื้อไวรัสโคโรนาในนกธรรมชาติน้อยมาก กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช จึงสำรวจเชื้อไวรัสโคโรนาในกลุ่มนกชายเลน นกเป็ดน้ำ นกขี้เหล็ก นกเกาะคอน และนกเขานกพิราบในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างสวอปปากและช่องทวารร่วม ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 ถึงกันยายน พ.ศ. 2565 เพื่อตรวจหาไวรัสโคโรนาทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและการเปรียบเทียบลำดับรหัสพันธุกรรม ผลการศึกษาสามารถเก็บตัวอย่างนกทั้งสิ้น 530 ตัวอย่าง จากนก 24 ชนิด จำนวน 265 ตัว เป็นกลุ่มนกชายเลน กลุ่มเป็ดน้ำ กลุ่มนกเกาะคอน กลุ่มนกเขานกพิราบ และกลุ่มนกขี้เหล็ก ร้อยละ 41.51 (110/265), 21.13 (56/265), 20.38 (54/265), 10.19 (27/265) และ 6.79 (18/265) ตามลำดับ ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการแสดงอัตราการพบเชื้อไวรัสโคโรนา ร้อยละ 6.03 (16/265) เป็นกลุ่มแกมมาโคโรนาไวรัส จากเป็ดแดง (*Dendrocygna javanica*) ร้อยละ 6.52 (3/46) และนกนางนวลแกลบเคราขาว (*Chlidonias hybrida*) ร้อยละ 2.63 (1/38) และกลุ่มเดลตาโคโรนาไวรัสจากนกยางควาย (*Bubulcus coromandus*) ร้อยละ 100 (6/6) นกกาน้ำปากยาว (*Phalacrocorax fuscicollis*) ร้อยละ 33.33 (2/6) นกยางเปีย (*Egretta garzetta*) ร้อยละ 28.57 (2/7) นกพิราบ (*Columba livia*) ร้อยละ 9.09 (1/11) และ

นกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) ร้อยละ 6.66 (2/30) โดยนกที่ตรวจพบเชื้อไม่มีอาการป่วยผิดปกติ เชื้อไวรัสทั้ง 2 กลุ่ม เป็นเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อที่พบในนกกลุ่มเดียวกันในภูมิภาคอื่น จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบเหตุการณ์การป่วยหรือตายผิดปกติของนกในพื้นที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงถึงการหมุนเวียนของเชื้อและบทบาทของนกต่อการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในพื้นที่ประเทศไทย ดังนั้นควรดำเนินการเฝ้าระวังไวรัสโคโรนาในนกอย่างต่อเนื่อง เพื่อเข้าใจระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสในนกเหล่านี้และเพื่อติดตามวงจรการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในภูมิภาคนี้

คำสำคัญ: นก ไวรัสโคโรนา เดลตาโคโรนาไวรัส แกมมาโคโรนาไวรัส ประเทศไทย

คำนำ

ไวรัสโคโรนา (CoV) เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญหลายโรคทั้งในคนและสัตว์ โรคที่สำคัญในคน เช่น โรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (Severe Acute Respiratory Syndrome: SARS) และโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (Middle East Respiratory Syndrome: MERS) (Chamings *et al.*, 2018) ขณะที่ในสัตว์ไวรัสโคโรนาก็เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค และสร้างความเสียหายทั้งในสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โรคลำไส้อักเสบในสุนัข (Canine Corona Virus; CCov) หรือโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (Infectious Bronchitis Virus: IBV) เป็นต้น ไวรัสโคโรนามีทั้งสิ้น 4 สกุล โดยมีการตรวจพบสกุลอัลฟาและ

เบตาโคโรนาไวรัสในคนและสัตว์เลี้ยง สกุกแลมมาและ เดลตาโคโรนาไวรัสในสัตว์กลุ่มนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mitek and Blicharz-Domanska, 2018) แม้ในปัจจุบัน จะมีการเฝ้าระวังไวรัสโคโรนาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จนนำไปสู่การค้นพบไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่จำนวนมาก แต่ในการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโคโรนาในนกกยังมีน้อยมาก แม้ศักยภาพการอพยพย้ายถิ่นตามฤดูกาลของนกกบางกลุ่ม มีระยะทางที่ไกลมาก ซึ่งสนับสนุนในการแพร่ของเชื้อโรค ไปยังภูมิภาคต่าง ๆ และสัตว์กลุ่มนกกยังเป็นแหล่งรังโรค ที่หลากหลาย จากการศึกษาพบไวรัสโคโรนาอย่างน้อย 15 ชนิดในนกกป่าทั่วโลก (Wille and Holmes, 2020) ซึ่งจากการสำรวจเพื่อค้นหาเชื้อไวรัสโคโรนาจากกลุ่มนกกในพื้นที่ ซึ่งอยู่ในเส้นทางการอพยพของนกกเส้นทางการบินเอเชีย ตะวันออก-ออสเตรเลีย ผลการศึกษาสอดคล้องกันโดยเฉพาะ กลุ่มนกอพยพที่พบมีเชื้อไวรัสโคโรนา โดยจากการสำรวจ ของ Kim and Oem (2014) เก็บตัวอย่างนกกธรรมชาติ ในเกาหลีใต้ ระหว่างปี ค.ศ. 2010–2012 จำนวน 1,473 ตัวอย่าง ในนกก 32 ชนิด พบไวรัสโคโรนา จำนวน 14 ตัวอย่าง จาก เป็ดหางแหลม 1 ตัวอย่างใน 96 ตัวอย่าง และเป็ดเทา พันธุ์อินเดีย 13 ตัวอย่างใน 361 ตัวอย่าง ซึ่งทั้งหมดเป็น กลุ่มแกมมาโคโรนาไวรัส สอดคล้องกับการเก็บตัวอย่าง นกธรรมชาติในประเทศออสเตรเลียของ Chamings *et al.* (2018) จำนวน 918 ตัวอย่าง ตรวจพบไวรัสโคโรนา จำนวนถึง 141 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.36) โดยพบเชื้อ แกมมาโคโรนาไวรัสในกลุ่มเป็ดและนกกชายเลนเช่นกัน และเชื้อเดลตาโคโรนาไวรัสในกลุ่มนกกกระสา ประกอบกับการศึกษาของ Chu *et al.* (2011) ในประเทศฮ่องกงและ กัมพูชา พบความชุกของไวรัสโคโรนาสูงในกลุ่มนกกน้ำ โดยพบแกมมาโคโรนาไวรัสมากในกลุ่มเป็ด ในขณะที่พบกลุ่ม เดลตาโคโรนาไวรัสในกลุ่มนกกกระสา นกกกระทุง และ นกเป็ดน้ำ และยังพบว่าแกมมาโคโรนาไวรัสมีการ ถ่ายทอดระหว่างกันโดยเฉพาะในกลุ่มนกกเป็ดน้ำ ในขณะที่เดลตาโคโรนาไวรัสมีความจำเพาะต่อโฮสต์ มากกว่า

การเฝ้าระวังโรคในนกกธรรมชาติของกรมอุทยาน แห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่ผ่านมามุ่งเน้นไปที่โรค ใช้หวัดนก ยังไม่มีการตรวจหาเชื้อหรือโครงการวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับไวรัสโคโรนาในนกกธรรมชาติแต่อย่างใด จึงได้ ดำเนินโครงการสำรวจไวรัสโคโรนาในนกกธรรมชาตินี้ขึ้น เพื่อทราบข้อมูลพื้นฐานสำหรับคาดการณ์ปัญหาและ สามารถจัดการกับภาวะวิกฤตได้อย่างทันที่ เพื่อจะ สามารถลดความเสียหายหากเกิดสถานการณ์การระบาด รวมถึงเพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมในบริหารจัดการ ประเทศและสังคมหลังภาวะวิกฤตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การจับนกและเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจฐานข้อมูลงานวิจัยนกอพยพของ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เพื่อคัดเลือก พื้นที่และชนิดนกที่มีลักษณะสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการ แพร่เชื้อไวรัส เช่น นกที่มีจำนวนประชากรมากอยู่ใกล้ แหล่งชุมชน นกที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ หรือนกอพยพที่ระยะทางไกล จากนั้นทำการดักจับนกโดยใช้วิธี ที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อนกแต่ละกลุ่ม เช่น การใช้วิธี ท่อส่งตาข่าย (Cannon net) สำหรับกลุ่มนกกชายเลนอพยพ ใช้ ตาข่ายพรางตา (Mist net) ในกลุ่มเป็ดน้ำ นกขี้เหล็ก นกเกาะคอน นกเขานกพิราบ นกทั้งหมดที่จับได้จะพักไว้ในถุงผ้าดิบ เพื่อลดการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดการ ความเครียด (BungBoraphet Wildlife Research Station, 2019) จากนั้นรีบทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ก้าน สำลีพันปลายไม้ชนิดที่ไม่มีสารฟอกขาวป้ายสิ่งคัดหลั่ง ในช่องปาก (Oral swab) และช่องทวารร่วม (Cloacal swab) รวม 2 ตัวอย่างจากนกแต่ละตัวแล้วปล่อยนกคืนสู่ ธรรมชาติ และเก็บสำลีตัวอย่างลงในหลอดน้ำยาเก็บรักษา ไวรัส (Lysis buffer; Contains 50% guanidine thiocyanate<2% Triton X-100, <1% EDTA) เขย่าก้าน

สำลีในหลอดน้ำยา (The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animals, 2018) และนำส่งห้องปฏิบัติการต่อไป

การตรวจหาเชื้อไวรัส

สกัดสารพันธุกรรมของไวรัส ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ EasyMag จากตัวอย่าง Rectal swab Oral swab ปริมาตร 400 μ L จากนั้นเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้วยวิธี Nested-PCR โดยใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสกลุ่ม Coronaviruses (pan-CoV_outF 5'- CCAARTTYTAYGGHGGITGG - 3', pan-CoV_R 5'- TGTTGIGARCARAAYTCATGIGG -3', pan-CoV_inF 5'- GGTGGGAYTAYCCHAARTGTGA-3') (Xiu, *et al.*, 2020) เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) และ Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) และใส่ส่วนผสมต่าง ดังนี้ RNA 4 μ L, 2X Reaction Mix 12.5 μ L, Primer 0.4 μ M (pan-CoV_outF และ pan-CoV_R), SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix 0.4 μ L และเติม Nuclease-free water ให้ครบปริมาตร 25 μ L จากนั้นนำสารละลายไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition ที่ 55 OC เป็นเวลา 30 นาที สำหรับ 94 OC 2 นาที Inactivate reverse transcription และ Amplification 30 cycles ประกอบด้วย 94 OC 15 วินาที 53.4 OC 30 วินาที 68 OC 1 นาที และ 68 OC 5 นาที Holding ที่ 4 OC จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จากรอบแรกมาทำเป็น Template ของ PCR รอบที่ 2 ปริมาตร 1 μ L และใส่สารดังนี้ 10X Buffer 2.5 μ L, 50 mM Magnesium chloride 0.75 μ L, dNTP mix 0.5 μ L, Primer (pan-CoV_inF และ pan-CoV_R) และ Platinum™ Taq DNA Polymerase เติม Nuclease-free water ให้ ปริมาตรครบ 25 μ L

จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition ที่ 94 OC เป็นเวลา 5 นาที และ 94 OC 15 วินาที 54.5 OC 30 วินาที 72 OC 1 นาที จำนวน 35 Cycles และ 72 OC 10 นาที Holding ที่ 4 OC โดย จากนั้นตรวจวิเคราะห์ขนาดสารพันธุกรรม DNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 Volt นาน 35 นาที และใช้ 2% Agarose gel เพื่อแยกขนาดสารพันธุกรรม (PCR product) ซึ่งมีขนาด อยู่ที่ 599-602 bp เปรียบเทียบกับขนาดสารพันธุกรรมต้นแบบ (Marker) 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) เลือกตัดแถบ Specific PCR Product ออกมา จากนั้นละลาย Agarose gel ด้วยชุด Purification สำเร็จรูป NucleoSpin Gel and PCR Cleanup kit® (MACHEREY-NAGEL, Germany) และจากนั้นเตรียมตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 ng/ μ L ปริมาตร 20 μ L พร้อมกับส่ง Primers ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 μ M อย่างละ 10 μ L ส่งไปหาลำดับเบสของยีน RdRp ด้วยวิธี Direct Sequencing (Dideoxy Chain Termination)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวน ความถี่ และสัดส่วนของตัวอย่างที่พบผลบวกต่อเชื้อไวรัสโคโรนาเพื่ออธิบายการกระจายตามกลุ่มของนกพื้นถิ่น และชนิดของเชื้อที่พบ โดยใช้โปรแกรม MS Excel นำเสนอในรูปแบบตาราง แผนภูมิ แผนที่ วิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้มาทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RdRp และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood method โดยใช้โปรแกรม MAGA 11

ผลการศึกษา

จากการสำรวจไวรัสโคโรนาในนกธรรมชาติ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 – เดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ดำเนินการดักจับนกชายเลนในจังหวัดสมุทรสาคร เพชรบุรี ตรัง และสตูล ซึ่งเป็นพื้นที่นาเกลือและชายทะเล นกเป็ดน้ำและนกคุยน้ำ ในพื้นที่จังหวัด ฉะเชิงเทรา นราธิวาส สุราษฎร์ธานี บุรีรัมย์ อุตรธานี นครสวรรค์ และเชียงราย ในพื้นที่แหล่งน้ำขนาดใหญ่ที่มี ประชากรนกวมอยู่อย่างหนาแน่น และกลุ่มนกเกาะคอน

และกลุ่มนกเขานกพิราบ ในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว ฉะเชิงเทรา นราธิวาส เลย และน่าน (Figure 1) จำนวน 265 ตัว จากนก 24 ชนิด ชนิดนกที่จับได้เป็นกลุ่มนก ชายเลน ร้อยละ 41.51 (110/265) กลุ่มเป็ดน้ำ ร้อยละ 21.13 (56/265) กลุ่มนกเกาะคอน ร้อยละ 20.38 (54/265) กลุ่มนกเขานกพิราบ ร้อยละ 10.19 (27/265) และกลุ่ม นกคุยน้ำ ร้อยละ 6.79 (18/265) (Table 1) และ ดำเนินการเก็บตัวอย่างนกทั้งหมดจำนวน 530 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่าง Oral swab และ Cloacal swab ประเภทละ 265 ตัวอย่าง

Table 1 Study areas, capture methods and target bird populations

Habitat type	Target group of birds	Province	Method	Number of birds
Wetland: Saltpan, Mudflat	Shorebird	Samut Sakhon, Satun, Trang, Phetchaburi	Cannon net	110
Wetland: Swamp	Waterfowls	Chachoengsao, Narathiwat, Buri Ram, Chiang Rai, Nakhon Sawan	Mist net	56
	Wading Birds	Chachoengsao, Surat Thani, Udon Thani		18
Community area: Roosting site	Passerines	Sa Kaeo, Chachoengsao, Loei, Narathiwat, Nan	Mist net	54
	Doves	Sa Kaeo, Chachoengsao, Loei, Narathiwat		27
Total				265

ผลการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา (Table 2) พบตัวอย่างให้ผลบวกจากนก 7 ชนิด จำนวน 17 ตัวอย่าง จากนก 16 ตัว คิดเป็นร้อยละ 6.03 (16/265) โดยนกยางควาย (*Bubulcus coromandus*) เป็นชนิดนกที่พบผลบวกมากที่สุดจำนวน 6 ตัว คิดเป็น ร้อยละ 100 (6/6) รองลงมาเป็นนกกาน้ำปากยาว

(*Phalacrocorax fuscicollis*) นกยางเป็ย (*Egretta garzetta*) นกพิราบ (*Columba livia*) นกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) เป็ดแดง (*Dendrocygna javanica*) และนกนางนวลเกลบเคราขาว (*Chlidonias hybrid*) คิดเป็นร้อยละ 33.33 (2/6), 28.57 (2/7), 9.09 (1/11), 6.67 (2/36), 4.34 (2/46) และ 2.63 (1/38) ตามลำดับ

เมื่อจำแนกผลบวกตามประเภทของตัวอย่างพบว่า ตัวอย่าง Cloacal swab ให้ผลบวกร้อยละ 4.53 (12/265) และตัวอย่าง Oral swab ให้ผลบวกร้อยละ 1.87 (5/265)

เมื่อจำแนกตามสถานภาพการอพยพพบผลบวกในกลุ่มนกประจำถิ่นร้อยละ 15.71 (11/70) นกอพยพร้อยละ 0.84 (1/119) และนกที่มีทั้งสองสถานภาพร้อยละ 5.26 (4/76) และเมื่อจำแนกตามลักษณะพื้นที่หากินพบว่านกที่หากินตามแหล่งน้ำมีผลบวกร้อยละ 7.07 (13/184) และนกที่หากินบนบกมีผลบวกร้อยละ 3.70 (3/81)

พื้นที่ที่ตรวจพบเชื้อไวรัสโคโรนามี 3 ประเภท (Figure 1) ได้แก่ พื้นที่นาเกลือ ในจังหวัดสมุทรสาคร

พบผลบวกร้อยละ 0.90 (1/110) ในนกนางนวลแกลบ เคราขาว พื้นที่แหล่งน้ำจืดพบผลบวกร้อยละ 16.83 (13/74) จากเป็ดแดง นกกา่น้ำปากยาว นกยางควาย นกยางเปีย ในจังหวัดบุรีรัมย์ ฉะเชิงเทรา และอุดรธานี พื้นที่แหล่งเกาะพักใกล้ชุมชนพบผลบวกร้อยละ 3.70 (3/81) ในนกนางแอ่นบ้าน และนกพิราบ ในจังหวัดน่านและสระแก้ว

ทั้งนี้ไม่พบรายงานเหตุการณ์การป่วยหรือตายผิดปกติของนกรธรรมชาติในช่วงการดำเนินโครงการในพื้นที่ทั้ง 3 ประเภทที่ตรวจพบเชื้อไวรัสโคโรนา และไม่พบนกที่เก็บตัวอย่างมีอาการเจ็บป่วยแต่อย่างใด

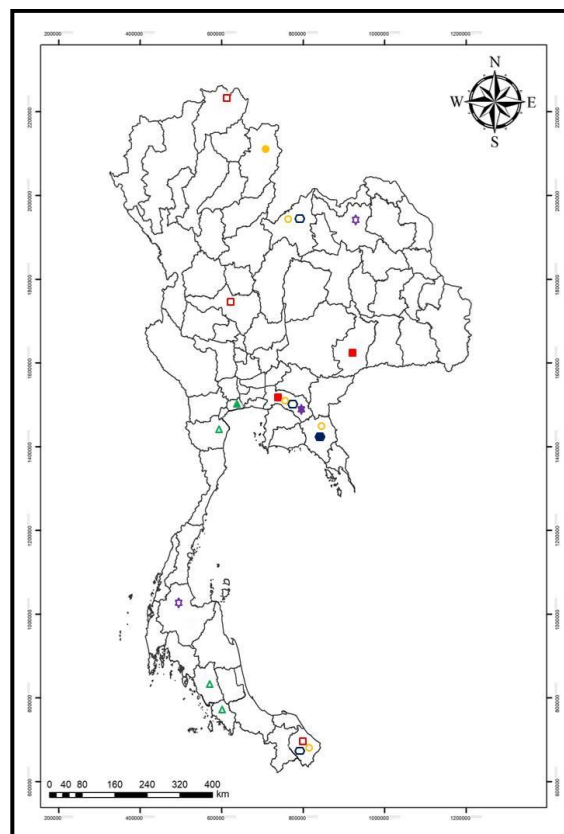


Figure 1 Geographic distribution of samples area from birds and coronavirus detection Coronavirus Thailand

△ = shorebirds, □ = waterfowls, ○ = Passerine, ◻ = Dove, ☆ = Wading Birds
(filled symbol = coronavirus detected and open symbol = coronavirus non-detected)

Table 2 Coronavirus detection in cloacal swab (CS) and oral swab (OS) from wild birds in Thailand

Taxonomic classification	Number of birds		Number of samples					
	Total	Positive (%)	Oral swab		Cloacal swabs		Overall	
			Total	Positive (%)	Total	Positive (%)	Total	Positive (%)
Anseriformes	50	2 (4.00)	50	1 (2.00)	50	2 (4.00)	100	3 (3.00)
Lesser Whistling-Duck (<i>Dendrocygna javanica</i>)	46	2 (4.34)	46	1 (2.17)	46	2 (4.34)	92	3 (3.26)
Garganey (<i>Spatula querquedula</i>)	4	0	4	0	4	0	8	0
Columbiformes	27	1 (3.70)	27	1 (3.70)	27	0	54	1 (3.70)
Rock Pigeon (<i>Columba livia</i>)	11	1 (9.09)	11	1 (9.09)	11	0	22	1 (4.54)
Eastern Spotted Dove (<i>Spilopelia chinensis</i>)	5	0	5	0	5	0	10	0
Zebra Dove (<i>Geopelia striata</i>)	11	0	11	0	11	0	22	0

Table 2 (Continued)

Taxonomic classification	Number of birds		Number of samples					
	Total	Positive (%)	Oral swab		Cloacal swabs		Overall	
			Total	Positive (%)	Total	Positive (%)	Total	Positive (%)
Charadriiformes	110	1 (0.90)	110	0	110	1 (0.90)	220	1 (0.45)
Grey Plover (<i>Pluvialis squatarola</i>)	1	0	1	0	1	0	2	0
Kentish Plover (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	1	0	1	0	1	0	2	0
Lesser Sand Plover (<i>Charadrius mongolus</i>)	26	0	26	0	26	0	52	0
Greater Sand Plover (<i>Charadrius leschenaultia</i>)	8	0	8	0	8	0	16	0
Ruddy Turnstone (<i>Arenaria interpres</i>)	5	0	5	0	5	0	10	0
Broad-billed Sandpiper (<i>Calidris falcinellus</i>)	3	0	3	0	3	0	6	0
Curlew Sandpiper (<i>Calidris ferruginea</i>)	3	0	3	0	3	0	6	0
Red-necked Stint (<i>Calidris ruficollis</i>)	10	0	10	0	10	0	20	0
Terek Sandpiper (<i>Xenus cinereus</i>)	13	0	13	0	13	0	26	0
Little Tern (<i>Sternula albifrons</i>)	1	0	1	0	1	0	2	0
Common Tern (<i>Sterna hirundo</i>)	1	0	1	0	1	0	2	0
Whiskered Tern (<i>Chlidonias hybrid</i>)	38	1 (2.63)	38	0	38	1 (2.63)	76	1 (1.32)

Table 2 (Continued)

Taxonomic classification	Number of birds		Number of samples					
	Total	Positive (%)	Oral swab		Cloacal swabs		Overall	
			Total	Positive (%)	Total	Positive (%)	Total	Positive (%)
Suliformes	6	2 (33.33)	6	0	6	2 (33.33)	12	2 (16.67)
Indian Cormorant (<i>Phalacrocorax fuscicollis</i>)	6	2 (33.33)	6	0	6	2 (33.33)	12	2
Pelicaniformes	18	8 (44.44)	18	2 (11.11)	18	6 (33.33)	36	8 (22.22)
Chinese Pond Heron (<i>Ardeola bacchus</i>)	5	0	5	0	5	0	10	0
Eastern Cattle Egret (<i>Bubulcus coromandus</i>)	6	6 (100.00)	6	0	6	6 (100.00)	12	6 (50.00)
Little Egret (<i>Egretta garzetta</i>)	7	2 (28.57)	7	2 (28.57)	7	0	14	2 (14.29)
Passeriformes	54	2 (3.70)	54	1 (1.85)	54	1 (1.85)	108	2 (1.85)
Barn Swallow (<i>Hirundo rustica</i>)	30	2 (6.67)	30	1 (3.34)	30	1 (3.34)	60	2 (3.34)
Great Myna (<i>Acridotheres grandis</i>)	6	0	6	0	6	0	12	0
Common Myna (<i>Acridotheres tristis</i>)	18	0	18	0	18	0	36	0
Total	265	16 (6.03)	265	5 (1.87)	265	12 (4.52)	530	17 (3.21)

การตรวจเพื่อจำแนกสกุลของเชื้อไวรัสโคโรนา พบว่า เชื้อที่พบในเป็ดแดงและนกนางนวลเกลบเคราขาว อยู่ในสกุลแกมมาโคโรนาไวรัส ขณะที่ไวรัสโคโรนาที่พบใน นกนางแอ่นบ้าน นกพิราบ นกยางควาย นกยางเปีย และนก กาน้ำปากยาว อยู่ในสกุลเดลตาโคโรนาไวรัส (Figure 2) เมื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในสาร พันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนาที่ตรวจพบกับเชื้อไวรัส โคโรนาในฐานข้อมูล GenBank พบว่า เชื้อไวรัสโคโรนา ที่พบในเป็ดแดงและนกนางนวลเกลบเคราขาว มีความ คล้ายคลึงกับไวรัสโคโรนาที่พบในหงส์ขาวที่ประเทศ อังกฤษ ร้อยละ 97.66 นกพลิกหินที่ประเทศออสเตรเลีย ร้อยละ 96.23 และนกนางนวลขอบปีกขาวที่ประเทศ

รัสเซีย ร้อยละ 96.04 ขณะที่ไวรัสโคโรนาที่พบในนก นางแอ่นบ้าน มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสโคโรนาที่พบใน นกนางนวลและนกกระทาตีสะโพกขาวในฮ่องกง ประเทศ จีน ร้อยละ 96.06 และ 85.09 ตามลำดับ และคล้ายกับ เชื้อไวรัสโคโรนาที่พบในสุกรในประเทศจีนร้อยละ 79.75 และเชื้อไวรัสโคโรนาที่พบในนกพิราบ มีความคล้ายคลึง กับเชื้อไวรัสโคโรนาที่พบในนกพิราบในประเทศจีน ประเทศฟินแลนด์ และประเทศโปแลนด์ ร้อยละ 98.13 98.49 และ 96.62 ตามลำดับ เชื้อไวรัสโคโรนาที่พบในนก ยางควายและนกกาน้ำปากยาว มีความคล้ายคลึงกับไวรัส โคโรนาที่พบในนกแขวกในประเทศจีน ร้อยละ 91.68

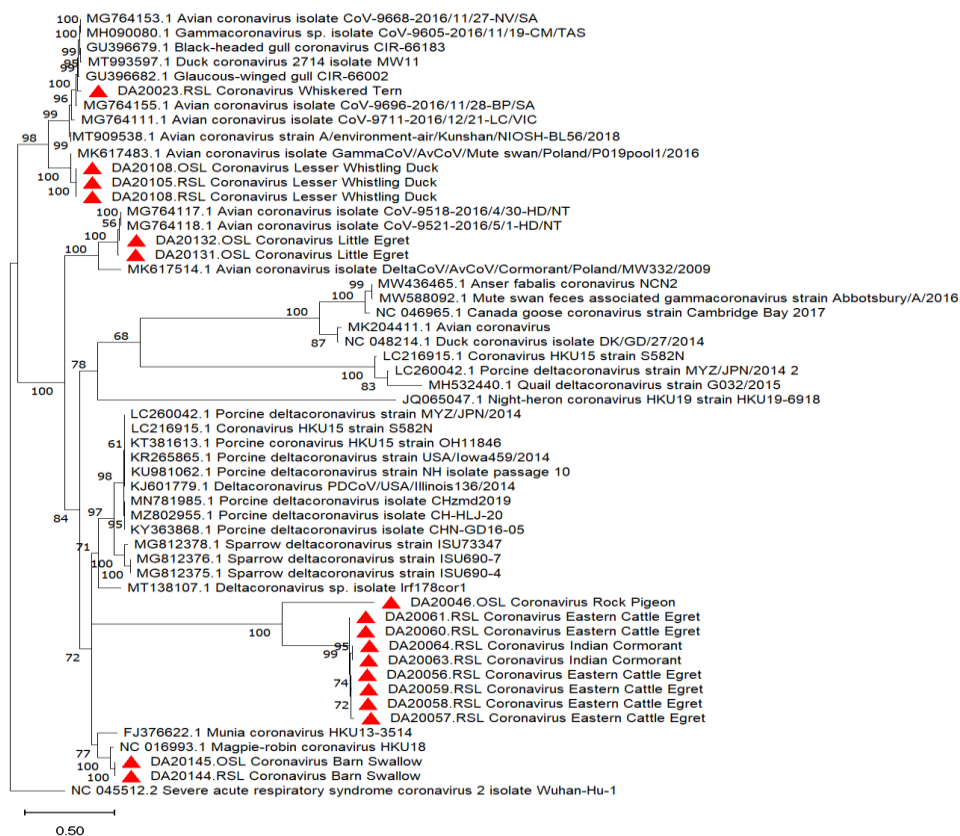


Figure 2 Phylogenetic tree of RdRp gene of Coronaviruses from migratory birds in Thailand. The tree was generated using MEGA 11 applying the Maximum Likelihood method in IQ-TREE2 with TN+f+G4 model and 1000 ultrafast bootstrap replicates

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อไวรัสโคโรนาในนกธรรมชาติร้อยละ 6.03 จากจำนวนนก 265 ตัว ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาในประเทศกัมพูชา ซึ่งมีอัตราการพบเชื้อในตัวอย่างร้อยละ 7.20 จากตัวอย่าง 236 ตัวอย่าง (Chu *et al.*, 2011) ซึ่งพบผลบวกในนกยางกรอกพันธุ์จีน (ร้อยละ 13.00) และเป็ดแดง (ร้อยละ 3.00) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการศึกษานี้มาจากนก 7 ชนิด ทั้งในกลุ่มนกน้ำและนกที่หากินบนบก ได้แก่ เป็ดแดง นกยางควายนกยางเปียบ นกกาหน้าปากยาว นกนางนวลกลบเคราขาว นกพิราบป่า และนกนางแอ่นบ้าน โดยนกในกลุ่มนกยางมีอัตราการพบเชื้อในตัวอย่างสูงที่สุด (ร้อยละ 22.22) และมีอัตราการพบเชื้อในเป็ดแดงใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 3.00) Chu *et al.* (2011) ได้สำรวจไวรัสโคโรนาในฮ่องกงพบอัตราการพบไวรัสโคโรนามากถึงร้อยละ 53.64 จากการเก็บตัวอย่าง 151 ตัวอย่าง โดยพบผลบวกในนกกาหน้าใหญ่ การศึกษาของ Kim and Oem (2014) ในประเทศเกาหลีใต้ระหว่างปี ค.ศ. 2010–2012 มีอัตราการพบเชื้อร้อยละ 0.95 จากตัวอย่าง 1,473 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อในกลุ่มนกเป็ดน้ำ ได้แก่ เป็ดเทาพันธุ์อินเดียและเป็ดหางแหลม (อัตราการพบเชื้อร้อยละ 3.60 และ 1.04 ตามลำดับ) การศึกษานี้ยังพบเชื้อในนกนางนวลกลบเคราขาวซึ่งเป็นกลุ่มนกชายเลนและนกนางนวล แม้จะพบอัตราการพบเชื้อเพียงร้อยละ 0.45 แต่ก็แสดงให้เห็นความสำคัญของนกน้ำในกลุ่มนกเป็ดน้ำ นกยาง นกกาหน้า และนกชายเลน ต่อวงจรการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโคโรนาในธรรมชาติ นกนางแอ่นบ้าน และนกพิราบป่าเป็นนกที่หากินบนบกที่พบเชื้อไวรัสโคโรนาในการศึกษานี้ โดยที่นกนางแอ่นบ้าน จัดอยู่ในอันดับนกเกาะคอน (Passeriformes) วงศ์นกนางแอ่น (Hirundinidae) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่พบรายงานการพบเชื้อไวรัสโคโรนา แต่มีการพบเชื้อในนกเกาะคอนวงศ์อื่น ๆ เช่น นกนางเขนบ้าน นกกระตีดัดสะโพกขาว และนกนางแอ่นทรายสีจาง ในขณะที่มีการ

พบไวรัสโคโรนาในนกพิราบมาก่อนในประเทศจีน ประเทศฟินแลนด์ และประเทศโปแลนด์ เป็นต้น

เชื้อไวรัสโคโรนาสามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งนก โดยพบไวรัสในสกุลแกมมาโคโรนาไวรัส และเดลตาโคโรนาไวรัส มีรายงานการพบเชื้อแกมมาโคโรนาไวรัสในนกหลายชนิด เช่น ไก่ ไก่วง นกพิราบ และนกในกลุ่มเป็ด Wille and Holmes (2020) รายงานการพบแกมมาโคโรนาไวรัส ในเป็ดป่าและเป็ดบ้านที่เลี้ยงเพื่อบริโภคเป็นอาหาร และ Zhigailov *et al.* (2022) พบการติดเชื้อแกมมาโคโรนาไวรัสในกลุ่มนกเป็ดน้ำและนกชายเลนในประเทศคาซัคสถาน (ร้อยละ 22.5) การศึกษานี้พบเชื้อดังกล่าวในเป็ดแดงและนกนางนวลกลบเคราขาว แต่มีอัตราการติดเชื้อต่ำกว่า (ร้อยละ 3.26 และ 1.42 ตามลำดับ) มีรายงานการพบเชื้อเดลตาโคโรนาไวรัสในกลุ่มนกเกาะคอนรวมถึงกลุ่มนกเป็ดน้ำและนกชายเลนด้วยเช่นกัน การศึกษานี้พบเชื้อเดลตาโคโรนาไวรัสในนกพิราบ นกยางควายนกยางเปียบ และนกกาหน้าปากยาว ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกับไวรัสที่พบในนกเกาะคอนชนิดอื่น เช่น นกนางเขนบ้านและนกกระตีดัดสะโพกขาว และยังคงคล้ายคลึงกับไวรัสที่พบจากสุกรในประเทศจีนในระดับต่ำกว่าการศึกษาของ Chamings *et al.* (2018) ในประเทศออสเตรเลียพบเชื้อไวรัสทั้ง 2 สกุล เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ ที่พบทั้งเชื้อแกมมาโคโรนาและเดลตาไวรัสในกลุ่มนกชายเลน ขณะที่ในกลุ่มนกเป็ดน้ำพบเฉพาะเชื้อแกมมาโคโรนาไวรัสและนกยางพบเชื้อเดลตาโคโรนาไวรัสเท่านั้น แม้ว่าเชื้อเดลตาโคโรนาไวรัสจะเป็นเชื้อที่พบได้ในกลุ่มนกเกาะคอนรวมถึงนกนางแอ่นบ้านที่พบในการศึกษานี้ แต่การศึกษาของ Zhigailov *et al.* (2022) ก็พบว่านกนางแอ่นสีจางสามารถพบเชื้อแกมมาโคโรนาไวรัสได้เช่นกัน

ในกลุ่มนกที่ตรวจพบเชื่อนั้นนกพิราบและนกนางแอ่นบ้านเป็นกลุ่มนกที่อาศัยอยู่ใกล้ชุมชน (Synanthropic species) ซึ่งมีพฤติกรรมที่สัมพันธ์กับกิจกรรมที่เกิดจากคนและอาจรวมถึงการสัมผัสใกล้ชิดกับ

คนและสัตว์เลี้ยงด้วย (Marchenko *et al.*, 2022) นักส่วนใหญ่ในอันดับนกเป็ดน้ำและนกชายเลนที่พบเชื้อโคโรนาไวรัสได้เป็นกลุ่มนกที่มีการอพยพในระยะไกล เช่น ในเส้นทางการอพยพเอเชียตะวันออก-ออสเตรเลีย (East Asian–Australasian Flyway) (Miyabashi and Mundkur, 1999) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า มีเพียงนกนางนวลแกลบเคราขาวเท่านั้นที่เป็นกลุ่มนกอพยพระยะทางไกล แต่นกน้ำชนิดอื่น เช่น นกในกลุ่มนกยางขาวและนกนางน้ำก็มีการเคลื่อนย้ายประชากรระหว่างแหล่งหากินในประเทศและมีโอกาสที่จะนำเชื้อไปสู่พื้นที่ต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ อัตราการพบเชื้อในกลุ่มนกที่หากินในประเทศตลอดทั้งปีสูงกว่าในกลุ่มนกอพยพระยะไกล แสดงถึงความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสภายในประชากรนกกลุ่มนี้ที่มีบทบาทสำคัญต่อการกระจายเชื้อในพื้นที่

นกหลายชนิดที่ถิ่นการกระจายกว้างและมีจำนวนประชากรหนาแน่นมักอาศัยหากิน และพักผ่อนรวมกันเป็นฝูงขนาดใหญ่ อีกทั้งยังมีพฤติกรรมในการขับถ่ายและหากินในแหล่งเดียวกัน เช่น นกยางควาย และนกนางน้ำปากยาว การที่พบเชื้อไวรัสโคโรนาจากสวอบของทวารร่วมในกลุ่มนกน้ำที่เกาะพักผ่อนเป็นโคลนนี้ อาจทำให้มีการแพร่กระจายเชื้อในแนวตั้งผ่านมูลของนกตัวที่อยู่สูงกว่า รวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมบริเวณที่พักผ่อนได้ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าพื้นที่ที่พบไวรัสโคโรนาเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำขนาดใหญ่ในจังหวัดบุรีรัมย์ อุทยานแห่งชาติเขาทะลุในจังหวัดสมุทรสาคร และแหล่งชุมชนในจังหวัดน่าน ฉะเชิงเทรา และสระแก้ว เป็นพื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์โดยคนและสัตว์ชนิดอื่น การพบไวรัสโคโรนาจากนกในพื้นที่ดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงโอกาสในการถ่ายทอดเชื้อในพื้นที่ที่มีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างนกในธรรมชาติ สัตว์เลี้ยง และคน จึงควรศึกษาบทบาทของนกในการรับและถ่ายทอดเชื้อในพื้นที่ดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง

ไวรัสโคโรนาของนกที่พบในการศึกษานี้แตกต่างจากแกมมาโคโรนาไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคหลอดลม

อักเสบ (Infectious Bronchitis Virus: IBV) ที่ก่อให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกและมีรายงานว่าโรคนี้อาจแพร่สู่ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไก่ได้ (Cavanagh, 2007) ขณะที่เชื้อเดลตาโคโรนาไวรัสเป็นไวรัสที่สามารถติดเชื้อได้ในนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Vlasova *et al.*, 2021) บางชนิดสามารถก่อโรครุนแรงในสุกร ไวรัสโคโรนาที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ง่ายโดยเฉพาะเมื่อมีการเปลี่ยนโฮสต์ จึงควรติดตามความเสี่ยงของการถ่ายทอดเชื้อข้ามโฮสต์นี้ และควรศึกษาบทบาทของนกต่อโอกาสในการรับและถ่ายทอดเชื้อในวงจรการเลี้ยงสัตว์ปีก สุกร และสัตว์อื่น ๆ เพื่อเข้าใจวงจรการถ่ายทอดเชื้อและป้องกันการเกิดการระบาดต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การสำรวจไวรัสโคโรนาในนกธรรมชาติระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 – เดือนกันยายน พ.ศ. 2565 จากนก 24 ชนิด รวม 265 ตัว พบเชื้อไวรัสโคโรนา ร้อยละ 6.03 โดยพบเชื้อไวรัสทั้งกลุ่มแกมมาโคโรนาไวรัสและเดลตาโคโรนาไวรัส นกในกลุ่มนกน้ำ เช่น นกเป็ดน้ำ นกชายเลน นกนางน้ำ และนกยาง เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญที่สามารถพบเชื้อไวรัสโคโรนาได้ ขณะที่สามารถพบเชื้อได้ในนกที่อาศัยใกล้ชิดชุมชน เช่น นกพิราบป่าและนกนางแอ่นบ้าน นักส่วนใหญ่เป็นนกที่รวมฝูงอย่างหนาแน่นและอาศัยในพื้นที่ที่มีโอกาสสัมผัสกันกับคนและสัตว์เลี้ยงชนิดอื่น นกบางชนิดเป็นนกอพยพระยะไกล หรือนกที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีโอกาสสัมผัสกับนกอพยพและสามารถแพร่เชื้อถึงกันได้ การพบเชื้อในนกเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการเฝ้าติดตามการแพร่เชื้อ และปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างนกประจำถิ่นในธรรมชาติ นกอพยพ สัตว์เลี้ยง และคน เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาวงจรการถ่ายทอดเชื้อ และเฝ้าระวังการระบาดของโรคที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของงานวิจัยฉบับนี้เกิดขึ้นได้จากการสนับสนุนของหน่วยงานต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สถานีวิจัยสัตว์ป่าดอยเชียงดาว สถานีวิจัยสัตว์ป่าฝั่งบอระเพ็ด สถานีวิจัยสัตว์ป่าภูหลวง สถานีวิจัยสัตว์ป่าฉะเชิงเทรา สถานีวิจัยสัตว์ป่าคลองแสง และสถานีวิจัยสัตว์ป่าพรุ-ป่าหาลาบาลา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างนก ศูนย์โรคอุบัติใหม่ด้านคลินิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง รวมไปถึงกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และนายสัตวแพทย์ไพศัลป์ เล็กเจริญ ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขการเขียนผลการศึกษฉบับนี้

เอกสารอ้างอิง

BungBoraphet Wildlife Research Station. 2019.

Ringling and Banding Studies of Migratory Shorebirds of Thailand.

pp. 30-53. *In* Annual Report. Bangkok: Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. [in Thai]

Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research** 38: 281-297.

Chamings, A., T.M. Nelson, J. Vibin, M. Wille, M. Klaassen and S. Alexandersen. 2018.

Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. **Scientific Reports** 8(5980): 1-10.

Chu, D.K.W., C.Y.H. Leung, M. Gilbert, P.H. Joyner., E.M. Ng, T.M. Tse, Y. Guan, J.S.M. Peiris and L.L.M. Poon. 2011. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of Virology** 85(23): 12815-12820.

Kim, H.R. and J.K. Oem. 2014. Surveillance of avian coronaviruses in wild bird populations of Korea. **Journal of Wildlife Diseases** 50(4): 964-968.

Marchenko, V., A. Danilenko, N. Kolosova, M. Bragina, M. Molchanova, Y. Bulanovich, V. Gorodov, S. Leonov, A. Gudymo, G. Onkhonova, S. Svyatchenko and A. Ryzhikov. 2022. Diversity of gammacoronaviruses and deltacoronaviruses in wild birds and poultry in Russia. **Scientific Reports** 12(19412): 1-12.

Mitek, J. and K. Blicharz-Domanska. 2018. Coronaviruses in avian species – review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. **Journal of Veterinary Research** 62: 249-255.

- Miyabayashi, Y. and T. Mundkur. 1999. **Atlas of key sites for Anatidae in the East Asian flyway**. [Online]. Available <https://www.wetlands.org/wp-content/uploads/2015/11/Key-sites-of-the-Anatidae-in-the-East-Asian-Flyway.pdf> (August 20, 2024).
- The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animals. 2018. **Animal Samples Collection and Processing for Laboratory Diagnosis**. Bangkok: Faculty of Veterinary Science, Mahidol University. 40 p. [in Thai]
- Vlasova, A.N., S.P. Kenney, K. Jung, Q. Wang and L. J.Saif. 2021. Deltacoronavirus evolution and transmission: current scenario and evolutionary perspectives. **Sec. Veterinary Infectious Disease** 7(2020): 1-8.
- Wille, M. and E.C. Holmes. 2020. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. **FEMS Microbiology Reviews** 40(5): 631-644.
- Xiu, L., R.A. Binder, N.A. Alarja, K. Kocheck, K.K. Coleman, S.T. Than, E.S. Bailey, V.N. Bui, T.H. Toh, D.D. Erdman and G.C. Gray. 2020. A RT-PCR assay for the detection of coronaviruses from four genera. **Journal of Clinical Virology** 128(104391): 1-7.
- Zhigailov, A.V., E.R. Maltseva, Y.V. Perfilyeva, Y.O. Ostapchuk, D.A. Naizabayeva, Z.A. Berdygulova, S.A. Kuatbekova, A.S. Nizkorodova, A. Mashzhan, A.E. Gavrilov, A.Z. Abayev, I.A. Akhmetollayev, S.M. Mamadaliyev and Y.A. Skiba. 2022. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses, astroviruses and paramyxoviruses in wild birds in southeastern Kazakhstan. **Heliyon** 8(11): e11324. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11324.