

JOURNAL OF APPLIED ANIMAL SCIENCE



ISSN 1906-2257

VOL.15 NO.2 JULY-DECEMBER 2022



“Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

Scope of the Journal

The philosophy of the Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, is “*One Health*”, i.e., to interweave the disciplines of veterinary sciences with medical sciences for extreme advantages to human, animals and environment. The *Journal of Applied Animal Science (JAAS)*, is a peer review journal which published 2 numbers (January-June, July-December) a year by Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, accepts manuscripts presenting information for publication with this philosophy in mind. Articles published in *JAAS* include a broad range of research topics in veterinary science, animal science, animal husbandry, animal production and fundamental aspects of genetics, nutrition, physiology, and preparation and utilization of animal products. Articles typically report research with cattle, companion animals, goats, horses, pigs, and sheep; however, studies involving other farm animals, aquatic and wildlife species, and laboratory animal species that address fundamental questions related to livestock and companion animal biology will be considered for publication.

บรรณาธิการ

รศ.ดร.น.สพ.ธนศักดิ์ ช่างบรรจง

Editor-in-Chief

Assoc.Prof. Dr.Tanasak Changbunjong

กองบรรณาธิการ

ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพโรจน์ พุฒินะ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.น.สพ.สถาพร จิตตपालพงศ์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ศ.ดร.น.สพ.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ศ.ดร.น.สพ.พงศ์ราม รามสุข	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.น.สพ.ปานเทพ รัตนากร	ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์
รศ.ดร.น.สพ.วิรัช วิริยะรัตน์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.สพ.ญ.สุกฤษฎี บุญมาไสว	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.สพ.ญ.พนิดา ชนาภิวัฒน์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.น.สพ.อนุวัฒน์ วิรัชสุดากุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.ชุติเพ็ญ บุณยะสินทรัพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.น.สพ.เต็มพงศ์ วงศ์ตะวัน	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ผศ.ดร.สพ.ญ.จารุณลักษณ์ จิรภัทรเศรษฐ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ผศ.ดร.น.สพ.ชาญณรงค์ รอดคำ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ดร.สพ.ญ.วราพร สุขมาวสี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ดร.น.สพ.อดิเทพ รุ่งสิทธิชัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ผศ.สพ.ญ.สุพรรณิภา พุทธิชาติ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.จอมขวัญ มีรักย์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อ.ดร.สพ.ญ.ศุภร ทองชวน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ.ดร.สพ.ญ.วิภาวรรณ ทรัพย์สวัสดิ์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ.ดร.สพ.ญ.รมณียา ลีลาอาภรณ์	ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์

Editorial Boards

Emeritus Prof. Dr.Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
Prof. Dr.Sathaporn Jittapalpong	Kasetsart University
Prof. Dr.Thaweesak Songsem	Kasetsart University
Prof. Dr.Pongrama Ramasoota	Mahidol University
Assoc.Prof. Pamtep Ratanakorn	Chulabhorn Royal Academy
Assoc.Prof. Dr.Witthawat Wiriyarat	Mahidol University
Assoc.Prof. Dr.Sookruetai Boonmasawai	Mahidol University
Assoc.Prof. Dr.Panida Chanapiwat	Mahidol University
Assoc.Prof. Dr.Anuwat Wiratsudakul	Mahidol University
Assoc.Prof. Dr.Shutipen Buranasinsup	Mahidol University
Assoc.Prof. Dr.Tuempong Wongtawan	Walailak University
Asst.Prof. Dr.Charoonluk Jirapatharasate	Mahidol University
Asst.Prof. Dr.Channarong Rodkhum	Chulalongkorn University
Asst.Prof. Dr.Woraporn Sukhumavasi	Chulalongkorn University
Asst.Prof. Dr.Atthaporn Roongsitthichai	Maharakham University
Asst.Prof. Suphannika Pnutthachalee	Khon Kaen University
Asst.Prof. Dr.Jomkwan Meerak	Chiang Mai University
Dr.Suporn Thongyuan	Kasetsart University
Dr.Wachiraphan Supsavhad	Kasetsart University
Dr.Romaneeya Leela-arporn	Chulabhorn Royal Academy

Journal Management

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

999 ถนนพุทธมณฑล สาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

โทร. 0-2441-5242 ต่อ 1308 โทรสาร 0-2441-0937

Website <http://www.vs.mahidol.ac.th/jaas>

Editor-in-Chief: Assoc.Prof. Dr.Tanasak Changbunjong, E-mail address: editor.jaas2020@gmail.com

Journal manager: Natcha Kaewkrajang

จัดพิมพ์โดย :

ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล ปอยท์ กราฟิค

177/2 ซอยเจริญสนิทวงศ์ 11 ถนนเจริญสนิทวงศ์ แขวงวัดท่าพระ เขตบางกอกใหญ่ กรุงเทพฯ 10600

โทร. 08-1826-5455 E-mail address: pointswift@yahoo.com

“Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

สารจากคณบดี

พบกัันอีกครั้งกับ Journal of Applied Animal Science Vol. 15 No. 2 July-December 2022 กับเนื้อหาสาระเต็มรูปแบบจาก research article และ case report ภายใต้การกำกับดูแลของบรรณาธิการวารสาร รศ.ดร.น.สพ.ชนศักดิ์ ช่างบรรจง ที่ได้ปรับรูปแบบการ submit บทความผ่านทางระบบออนไลน์ฐานข้อมูลวารสารอิเล็กทรอนิกส์กลางของประเทศไทย (Thai Journals Online (ThaiJO)) ที่อยู่บนระบบเดียวกันกับระบบ Online Journal System (OJS) ซึ่งพัฒนาโดย Public Knowledge Project (PKP) ซึ่งเนื้อหาในฉบับนี้ประกอบด้วย Research article 3 เรื่อง ได้แก่

1. The Surveillance of Antimicrobial Susceptibility Pattern and *bla*_{CTX-M} Gene Encoding in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Goat Farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand
2. Species Diversity of Mosquito Vectors in Kubae Salo Village, Kaluwo Sub-District, Mueang Narathiwat District, Narathiwat Province for Surveillance and Control
3. The Effect of Duration of Weaning to Bone Markers and Bone Radiographic Diagnosis in Asian Elephant (*Elephas maximus*)

รวมทั้ง Case report อีกหนึ่งเรื่อง Clear Cell Renal Cell Carcinoma in a Dog ซึ่งครอบคลุมทุก species ของสัตว์หลากหลายชนิดตั้งแต่สุนัข สุนัขป่า สุนัขเลี้ยงเป็นเพื่อน และปศุสัตว์ในสัตว์ ถือได้ว่าครบทุกอรรถรสจริงๆ

ทั้งนี้ขอขอบคุณบรรณาธิการวารสาร รศ.ดร.น.สพ.ชนศักดิ์ ช่างบรรจง และผู้รับผิดชอบงานวารสารทุกท่าน ตลอดจนนักวิชาการเจ้าของบทความ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าจัดทำวารสาร ประสานงานและ อำนวยความสะดวกกับผู้เขียนบทความ ตั้งแต่เริ่มต้นจนแล้วเสร็จ และขอเป็นกำลังใจให้ผู้รับผิดชอบ Journal of Applied Animal Science สามารถผลิตผลงานและบรรลุผลตามวัตถุประสงค์ทุกประการ เพื่อชื่อเสียงของวารสารให้เป็นที่ยอมรับในวงกว้างจนถึงการเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติต่อไป

รองศาสตราจารย์ ดร.สัตวแพทย์หญิงวลาสินี ศักดิ์คำดวง

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

“Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

ปีที่ 15 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม-ธันวาคม 2565

Vol. 15 No. 2 July-December 2022

สารบัญ

Editor's Note

7

ชนศักดิ์ ช่างบรรจง

Research Articles

The Surveillance of Antimicrobial Susceptibility Pattern and *bla*_{CTX-M} Gene Encoding in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Goat Farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand

9

Yupaporn Lanumtiang Sineenard Jiemtaweeboon Sivapong Sungpradit
Arpron Leesombun Sookruetai Boonmasawai

Species Diversity of Mosquito Vectors in Kubae Salo Village, Kaluwo Sub-District, Mueang Narathiwat District, Narathiwat Province for Surveillance and Control

25

Sedthapong Laojun Muhammadnabil Hayitantu Juthamad Janhyok Natthaya Manklang
Jittawan Nammoontree Jittawan Nammoontree Pongmada Damapong Peerada Damapong
Wea-anisa Ama Tanawat Chaiphongpachara

The Effect of Duration of Weaning to Bone Markers and Bone Radiographic Diagnosis in Asian Elephant (*Elephas maximus*)

39

Petchroi Petchreing Taweepoke Angkawanish Somkiat Huaijantug
Walasinee Sakcamduang Nlin Arya

Case Report

Clear Cell Renal Cell Carcinoma in a Dog

51

Poonnut Darakamas Panyakamol Chandrasakha Parin Suwannaprapha
Surachart Banjathammarak Krittin Chuaychoo Thirawut Kongtasai

คำแนะนำสำหรับผู้แต่ง

“Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

วารสารสัตวศาสตร์ประยุกต์เป็นวารสารวิชาการราย 6 เดือน (2 ฉบับต่อปี เดือนมกราคม-มิถุนายน และเดือน กรกฎาคม-ธันวาคม) ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เผยแพร่ผลงานวิจัยครอบคลุมสหสาขาวิชาทั้งสัตวแพทยศาสตร์ และสัตวศาสตร์ ตั้งแต่พื้นฐานถึงระดับโมเลกุล รวมถึงรายงานทางคลินิก บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารต้องผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 3 ท่าน ในรูปแบบ double-blind peer review

ผู้สนใจส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารสัตวศาสตร์ประยุกต์กรุณาปฏิบัติตามข้อแนะนำและส่งพร้อมจดหมายนำ

1. ประเภทบทความ ที่รับพิจารณาได้แก่ รายงานการวิจัย รายงานฉบับย่อ บทความปริทัศน์และรายงานทางคลินิกเขียนด้วยภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ แต่บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

2. การส่ง ส่งต้นฉบับพร้อมสำเนา 4 ชุด และไฟล์ดิจิทัลทางไปรษณีย์ ไฟล์ดิจิทัลต้องสร้างด้วยโปรแกรม MS-Word หรือซอฟต์แวร์ที่ใช้แทนกันได้ อาจส่งต้นฉบับผ่านอีเมลโดยไม่มีสำเนาได้

3. รูปแบบ ขนาดกระดาษเอ 4 พิมพ์หน้าเดียว เว้นระยะ 1 บรรทัด ขอบกระดาษ 2.54 ซม. (1 นิ้ว) ฟอนต์ Angsana New หรือ TH SarabunPSK 16 พอยต์

4. ส่วนประกอบ รายงานการวิจัยต้องประกอบด้วย หน้าแรก (ได้แก่ ชื่อเรื่อง ชื่อผู้แต่ง สถานที่ทำงานและที่อยู่ ชื่อผู้แต่งหลักพร้อมที่อยู่ติดต่อได้และอีเมล พิมพ์ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) บทคัดย่อ (สั้นกระชับได้ใจความและสำคัญ 3-4 คำ) บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการวิจัย วิจารณ์ กิตติกรรมประกาศและเอกสารอ้างอิง

ก. รายงานฉบับย่อและรายงานทางคลินิก อาจเขียนโดยไม่แยกหัวข้อ หรืออาจรวมส่วนผลการวิจัยและวิจารณ์เป็นหัวข้อเดียว

ข. บทความปริทัศน์ ควรเริ่มด้วยบทนำ แล้วบรรยายโดยแยกตามหัวข้อที่ต้องการนำเสนอ พร้อมบทสรุป

5. ตาราง-รูปภาพ ตารางและรูปภาพให้แทรกไว้ท้ายสุดของบทความ คำบรรยายตารางพิมพ์ด้านบน คำบรรยายรูปภาพพิมพ์ใต้ภาพ และมีหมายเลขอาระบิกกำกับตามลำดับการอ้างอิง ตารางควรเข้าใจได้ง่าย ให้ส่งรูปภาพความละเอียดสูงแยกต่างหากมาพร้อมด้วย

6. การอ้างอิง ผู้แต่งต้องปฏิบัติตามรูปแบบการอ้างอิงของวารสาร การอ้างอิงในเนื้อหาใช้ระบบนาม-ปี เช่น (กัมภีร์ กอธีระกุล และคณะ 2530) หรือ กัมภีร์ กอธีระกุล และคณะ (2530) การเขียนรายการเอกสารอ้างอิงให้เขียนไว้หลังกิตติกรรมประกาศ โดยพิมพ์เอกสารภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยเอกสารภาษาอังกฤษ สำหรับการเขียนเอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษให้ดูจากส่วนแนะนำภาษาอังกฤษ

กัมภีร์ กอธีระกุล, เทิด เทศประทีป, วรา พานิชเกรียงไกร, โสมพัทธ์ วงศ์สว่าง, วราภรณ์ แซ่ลี้, สมศักดิ์ ภักดีศิริภรณ์. การสำรวจพบเชื้อ *อี.โคไล* ซีโรไทป์ K88 จากลูกสุกรวัยดูดนมและหลังหย่านม. เวชสารสัตวแพทย์. 2530; 17(1): 21-7.

7. ชื่อวิทยาศาสตร์ ให้พิมพ์เป็นภาษาอังกฤษตามประมวลนามศัพท์สากลและทำให้เด่นแตกต่างจากเนื้อหา

8. การถอดคำไทยเป็นภาษาอังกฤษ ใช้หลักเกณฑ์การถอดอักษรไทยเป็นอักษรโรมันแบบถ่ายเสียงของราชบัณฑิตยสถาน

9. อักษรย่อและสัญลักษณ์ หากเป็นที่รับรู้โดยทั่วกันอนุโลมให้ใช้ได้โดยไม่ต้องพิมพ์ตัวเต็มก่อน

สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมและแม่แบบต้นฉบับ ให้ไปที่เว็บไซต์ของวารสาร https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs

อีเมลบรรณาธิการวารสาร editor.jaas2020@gmail.com

ที่อยู่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 999 ถนนพุทธมณฑล สาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

Instructions to Authors

“Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

Journal of Applied Animal Science is a peer-review journal (2 issues/year; January-June and July-December) which publishes papers that report on original research covering broadly interdisciplinary of veterinary and animal sciences with results of more than local regard. JAAS invite and welcome submissions on existing new research from basic to molecular. Articles published under our journal are double-blind peer reviewed by at least 3 reviewers.

The author should follow the instructions below for manuscript preparation and submit with covering letter.

1. Categories: JAAS accepts varieties of article, including research articles, short communications, reviews and also clinical reports.

2. Language: English articles are preferable; however, both Thai and English manuscripts are acceptable, with Thai and English abstracts.

3. Submission: Submission via email is our most preferable way. However, submission of the manuscript is acceptable by either paper (4 copies) or digital format (email). Finally, digital format must be submitted. The submission file is in MS-Word format or compatible software.

4. Format: The manuscript should be used A4 size with margin of 2.54 cm (1 in), double spacing and indentions by using tabs. Times New Roman font 12 points is favored for English and Angsana New or TH SarabunPSK 16 points is desirous for Thai.

5. Components: The research manuscripts should have sequential components as title page, abstract and 3-4 keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. Title page, in both Thai and English, includes title, author(s) and affiliation(s) for each author. Corresponding author must provide full contact address and email.

a. Short communications or clinical reports:

These could be written as no sections, combination of results and discussion or introduction and followed by several presentation sections.

b. Reviews: The manuscript should start with introduction and followed by demonstration sections and conclusion.

6. Tables-Figures: Tables and figures must be numbered by using Arabic numbers. The caption must be written on the top of table or the bottom of figure. Tables and figures should be put at the end of article. All tables should be understandable by itself. All figures with high quality should be prepared in black and white as separate files.

7. References: Authors must be careful for the reference formats of both in-text citations and bibliography. In-text citations use author(s)-year in parentheses, the proper format is (Smith 2008; Kennedy and Smith 2009; John et al., 2010a, 2010b) or Smith (2008). Two authors use “and” in between. Using “et al.” when there are more than 2 authors. Multiple citations in a sentence must be in chronological order first, then alphabetical order. Bibliography should be in the last part of article and arranged alphabetically by authors or title. List first 6 authors and followed by “et al.” when there are more than 6 authors. The title is followed the last author. Abbreviated journals are according to the conventional ISO abbreviations used by PubMed. One-word journal title must be spelled out. Year of publication, volume, issue in parentheses, and begin and end pages. These are examples of bibliography.

- Barker K. At the Bench: A laboratory navigator. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998.
- Fairbrother JM, Gyles CL. Escherichiacoliinfections. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 9th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 639-74.
- Laohasinnarong D, Kaeoket K, Prasitphon B. Estrus synchronization in gilts with altrenogest by different given time. Proceedings of the 19th IPVS Congress. Copenhagen, Denmark: Narayana Press; 2006. p. 118.
- Meng X-J, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci. 1997;94(18):9860-5.
- WHO media centre. African trypanosomiasis (sleeping sickness) [Internet]. WHO. 2010 [cited 2011 Oct 29]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.

8. Scientific terms should use the update and follow the International Code of Nomenclature, written by emphasis.

9. Standard abbreviations and symbols are acceptable without definition.

Please visit JAAS website for more information and manuscript template, https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs

Editor-in-Chief email: editor.jaas2020@gmail.com

Address: Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, 999 Phuttamonthon Sai 4, Salaya, Phuttamonthon, Nakornphatom 73170 Thailand.

Editor Note

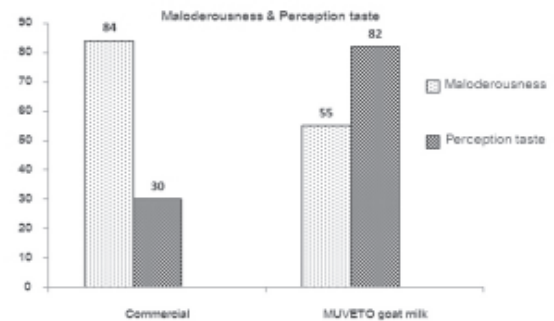
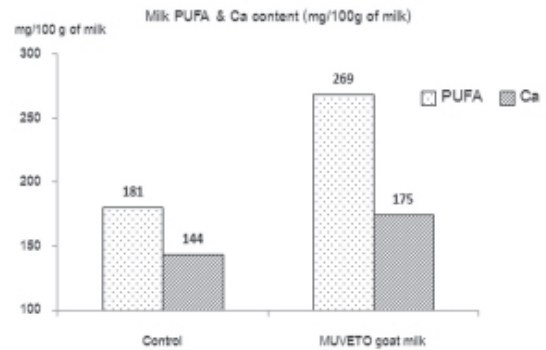
ในปี พ.ศ. 2565 ทางวารสาร Journal of Applied Animal Science (JAAS) ได้เริ่มการใช้งานผ่านทางระบบฐานข้อมูลวารสารอิเล็กทรอนิกส์กลางของประเทศไทย (Thai Journals Online: ThaiJO) อย่างเต็มรูปแบบ จึงอาจจะยังไม่เป็นที่คุ้นเคยสำหรับนักวิจัยบางท่านที่ยังไม่เคยใช้งานระบบนี้ อย่างไรก็ตาม ทางคณะผู้จัดทำวารสารพร้อมตอบข้อสงสัยหรือช่วยอธิบายขั้นตอนต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการตีพิมพ์บทความของท่าน

วารสารฉบับที่ 2 (เดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม) ของปีที่ 15 นี้ ประกอบด้วยบทความที่น่าสนใจหลายเรื่อง ได้แก่ บทความวิจัย 3 เรื่อง “การสำรวจความไวต่อยาต้านจุลชีพ และการแสดงออกของยีนส์ *bla*_{CTX-M} ในเชื้อ *Escherichia coli* ที่เพาะแยกได้จากฟาร์มแพะเนื้อสุภาพดีใน อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย” “ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคในพื้นที่บ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส เพื่อการเฝ้าระวังและควบคุม” และ “การศึกษาผลของระยะเวลาหย่านมต่อสัญญาณโรคกระดูกของช้างเอเชียควบคู่กับการใช้รังสีวินิจฉัยกระดูก” รายงานสัตว์ป่วย 1 เรื่อง “โรคมะเร็งไคชนิดเกลียวเซลล์ในสุนัข”

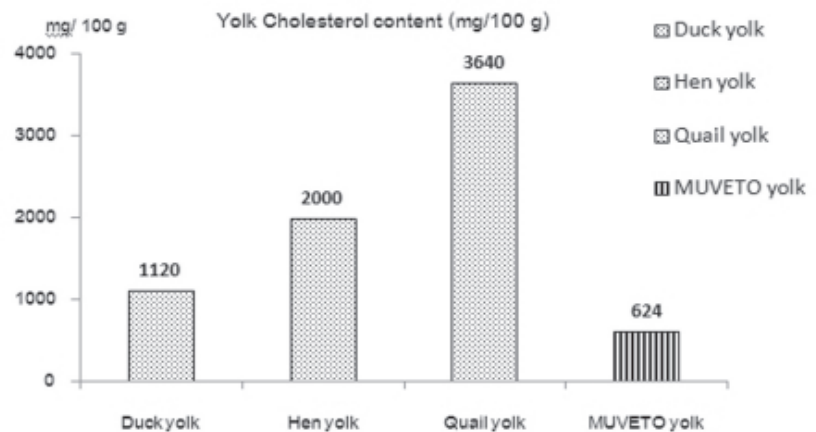
กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการวิชาการและก่อให้เกิดการต่อยอดองค์ความรู้ใหม่ต่อไป สุดท้ายนี้ ในนามหัวหน้ากองบรรณาธิการ ขอขอบพระคุณกองบรรณาธิการวารสาร ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาบทความ และผู้สนับสนุนบทความทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมทำให้วารสาร JAAS ของปีนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร.นายสัตวแพทย์ธนกศักดิ์ ช่างบรรจง

บรรณาธิการ (Editor-in-Chief)



Functional goat milk: Naturally high PUFA, Ca and malodorousness



Functional egg: Low cholesterol



Distributed by : Faculty of Veterinary Science, Mahidol University
999 Phutthamonthon Sai 4 Road, Salaya, Phutthamonthon,
Nakhonpathom, 73170, Thailand. Tel. 02-4410933.



The Surveillance of Antimicrobial Susceptibility Pattern and *bla*_{CTX-M} Gene Encoding in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Goat Farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand

Yupaporn Lanumtiang¹ Sineenard Jiemtaweewoon² Sivapong Sungpradit³
Arpron Leesombun³ Sookruetai Boonmasawai^{3*}

¹Pasupalan livestock and wildlife hospital, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University,
199 M.9 Lumsum, Sai Yok, Kanchanaburi, 71150 Thailand

²Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University
999 Phutthamonthon Sai 4 Road Salaya, Phutthamonthon Nakhon Pathom, 73170 Thailand

³Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University
999 Phutthamonthon Sai 4 Road Salaya, Phutthamonthon Nakhon Pathom, 73170 Thailand

*Corresponding author, E-mail address: sookruetai.boonmasawai@mahidol.edu

Received: 13 September 2022; Revised: 8 November 2022; Accepted: 8 November 2022

Abstract

This observation study aimed to investigate the antimicrobial susceptibility pattern and *bla*_{CTX-M} gene encoding in *Escherichia coli* isolates collected from healthy goat farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand. By collecting 92 samples from rectal swabs from goats in 7 subdistricts in Sai Yok District, the bacterial identification, antimicrobial susceptibility test, and detection of the presence of *bla*_{CTX-M} genes by conventional polymerase chain reaction (PCR) techniques were performed. Based on the results of the study, *E. coli* prevalence was found in 72.8% of the samples (n = 67). The prevalence rate of *E. coli* isolated from the samples from 6 subdistricts (85.7%) was higher than or equal to 50%. One influencing factor of the high *E. coli* detection was the person administering antimicrobial agents to goats ($p < 0.001$). The number of *E. coli* isolated from goats drinking water from natural sources was higher than that isolated from goats drinking from the tap water system ($p < 0.038$). The antimicrobial susceptibility of amoxicillin/clavulanic acid, imipenem, fluoroquinolones, piperacillin/tazobactam, and trimethoprim/sulfamethoxazole completely covered entire isolations. *E. coli* showed the highest resistance rate to cefotaxime (19.4%). The antimicrobial resistance (AMR) patterns were categorized by the number of antimicrobial agents into three patterns: one, two, and at least three AMRs (63%, 27%, and 10%, respectively). Every drug resistance pattern contained cefotaxime in all groups. The *bla*_{CTX-M} gene was not found from all *E. coli* isolates. The study suggested the slightly high prevalence with the welling trend of AMR characteristics among the *E. coli* isolates collected from healthy goat farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province. Some influencing factors may be important for farm management to prevent the occurrence and spread of antimicrobial-resistant characteristics in goat farms.

Keywords: *Escherichia coli*, goat, Antimicrobial susceptibility, *bla*_{CTX-M}, Kanchanaburi

การสำรวจความไวต่อยาต้านจุลชีพ และการแสดงออกของยีนส์ *bla*_{CTX-M} ในเชื้อ *Escherichia coli* ที่เพาะแยกได้จากฟาร์มแพะเนื้อสุภาพดี ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย

ยุภาภรณ์ ธารน้ำเที่ยง¹ สินีนาถ เจริญทวีบุญ² ศิวะพงษ์ สังข์ประดิษฐ์³ อาภรณ์ ลิ้มบุญ³ สุขฤทัย บุญมาใสว^{3*}

¹โรงพยาบาลปศุสัตว์และสัตว์ป่า ปศุपालัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
199 หมู่ 9 ตำบลลุ่มสุ่ม อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี 71150

²ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
999 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

³ภาควิชาปริคลินิกและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
999 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sookruetai.boon@mahidol.edu

Received: 13 September 2022; Revised: 8 November 2022; Accepted: 8 November 2022

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อสำรวจหาความชุก รูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพ และการแสดงออกของยีนส์ *bla*_{CTX-M} ในเชื้อ *Escherichia coli* ที่เพาะแยกได้จากฟาร์มแพะเนื้อสุภาพดีในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย โดยการเก็บตัวอย่างจากไม้ที่ป้ายจากทวารหนัก (rectal swab) ทั้งหมด 92 ตัวอย่าง จาก 7 ตำบล ในอำเภอไทรโยค นำมาจำแนกชนิดของเชื้อ *E. coli* เพื่อทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี disc diffusion method และการแสดงออกของยีนส์ *bla*_{CTX-M} ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากผลการศึกษา พบความชุกของ *E. coli* ร้อยละ 72.8 (67 ตัวอย่าง) อัตราความชุกของเชื้อ *E. coli* 6 ตำบล จากทั้งหมด 7 ตำบล (ร้อยละ 85.7) มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการพบเชื้อ *E. coli* คือ บุคคลผู้ให้ยาด้านจุลชีพเพื่อรักษาแพะ ($p < 0.001$) แพะที่ดื่มน้ำจากแหล่งธรรมชาติ พบเชื้อ *E. coli* จำนวนมากกว่าแพะที่ดื่มน้ำจากระบบท่อประปา ($p < 0.038$) ผลความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีความไวต่อยา amoxicillin/clavulanic acid imipenem fluoroquinolones piperacillin/tazobactam และ trimethoprim/sulfamethoxazole และพบ เชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยา cefotaxime มากที่สุด (ร้อยละ 19.4) รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพที่พบมี 3 รูปแบบ คือ ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 1 ชนิด 2 ชนิด และอย่างน้อย 3 ชนิด (ร้อยละ 63 ร้อยละ 27 และร้อยละ 10 ตามลำดับ) โดยรูปแบบการดื้อยาดังกล่าว พบการดื้อยา cefotaxime ในทุกกลุ่ม จากการทดสอบการแสดงออกของยีนส์ *bla*_{CTX-M} ไม่พบการแสดงออกของยีนส์ดังกล่าว ใน *E. coli* ที่เพาะแยกได้ทั้งหมดจากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า มีอัตราความชุกของ *E. coli* ค่อนข้างสูงในแพะที่เลี้ยงในเขตอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี และมีแนวโน้มความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ดี บางปัจจัยที่มีอิทธิพลในการจัดการฟาร์ม อาจมีความสำคัญในการช่วยป้องกันการพบเชื้อแบคทีเรีย และการแพร่กระจายของลักษณะดื้อยาในฟาร์มแพะได้

คำสำคัญ : เอสเชอริเชีย โคไล แพะเนื้อ ความไวต่อยาต้านจุลชีพ *bla*_{CTX-M} กาญจนบุรี

Introduction

Escherichia coli is a common aerobic bacterium of the mammalian gut microbiome, especially in the lower intestine of mammals (Blount 2015). This versatile pathogenic bacterium can cause a variety of gastrointestinal and extraintestinal infections, such as hemolytic-uremic syndrome, urinary tract infections, and septicemia (Riley 2020). Many studies revealed that livestock ruminants are the major reservoirs of this important foodborne pathogen (Gonzalez and Cerqueira 2020). Pathogenic strains of *E. coli* are commonly isolated from foodborne illness patients who consumed contaminated dairy products (Elzhraa et al., 2021).

Goats have also emerged as important subclinical carriers of *E. coli* transmission into humans through food contamination by animal feces (La Ragione et al., 2009; Carlos et al., 2010; Al-Ajmi et al., 2020). *E. coli* contamination can be found in various food products from these small domestic ruminants, such as goat milk and cheese (Ioanna et al., 2018). In Tanzania, more than 90% of goat meat samples have tested positive for *E. coli* (Mwanyika et al., 2016). The goat skin leather and fecal samples collected in the United States and Mexico revealed the presence of *E. coli* contamination at the rates of 1.7% and 19.7%, respectively (Hanlon et al., 2018), and the contamination rate of skin leather and fecal samples from Saudi Arabia was at least 2% (Bosilevac et al., 2015). The household ownership of goats is a factor associated with the detection of pathogenic *E. coli* in children, which causes negative and long-term outcomes of illnesses (Lambrecht et al., 2021). Moreover, 5.9% of goat fecal samples from Rwanda exhibited a multidrug-resistant (MDR) phenotype (Manishimwe et al., 2021). The problem of antimicrobial resistance (AMR) transmission between humans and livestock should be of concern.

Given the continuous evolution of AMR genes, *E. coli* strains and phylogenetic results of AMR genes showed random spread patterns between livestock farms in each country (Leekitcharoenphon et al., 2021), especially the extended spectrum β -lactamase (ESBL) *E. coli* which is a major phenotype contaminating pigs, poultry, and small ruminants (Miltgen et al., 2022). ESBLs have been classified into several families such as the TEM-, SHV-, IRT-, CMT- and CTX-M- type ESBLs. Several variants of CTX-M, which is the most widespread ESBL type, commonly found worldwide (Castanheira et al., 2021). The understanding of animal reservoirs and transmission patterns leading to the acquisition of ESBL-producing Enterobacterales between humans and livestock is urgently required. However, studies on the derived surveillance of ESBL *E. coli* infection in small ruminants in Thailand are limited.

Thus, this study aimed to survey the prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and the encoding of *bla*_{CTX-M} gene in *E. coli* isolated from healthy goat farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand. The data from the small ruminant farm must fill the gaps in our knowledge to solve the AMR problem via a health system.

Materials and Methods

Sample collection

The study protocol was approved by the Faculty of Veterinary Science-Animal Care and Use Committee (FVS-ACUC no. MUVS-2017-10-47) and Veterinary Science-Institutional Biosafety Committee (IBC/MUVS-B-003-2561). A total of 92 rectal swab samples were randomly collected from healthy female goats (7 months to 2 years of age) living in seven local goat farms. Each

farm was located in each subdistrict of Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand (Figure 1 and Table 1).

Bacterial isolation and identification

The rectal swab samples were collected using the Cary-Blair transport medium (EUROTUBO®) and then inoculated onto sheep blood and MacConkey agar plates (Clinical diagnostics LTD., Thailand). A loopful of each culture was streaked on eosin methylene blue-selective agar (Oxoid LTD., England), and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. In addition, biochemical tests were performed for further confirmation, including gram staining, triple sugar iron, MIO-motility indole, urease, oxidase and catalase tests (Oxoid LTD., England) (Md Bashir Uddin, 2022). *E. coli* ATCC25922 was used as the

control strain. Then, confirmations of microorganism species were performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis at the Kamphaeng Saen Veterinary Diagnostic Center, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom Province, Thailand.

Antimicrobial Susceptibility Test

Disc diffusion method

The susceptibility of the isolates to antimicrobial agents was determined by the disc diffusion method using the following antimicrobials: ampicillin (10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), cefotaxime (30 µg), cefpodoxime (30



Figure 1. Modify geographic map of goat farms from 7 subdistricts in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand. (Google, 2022)

Table 1. Prevalence of *E. coli* isolated from goats in livestock farms from 7 subdistricts in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand

Subdistrict	Location of goat farms	No. of rectal swab (n=92)	No. of <i>E. coli</i> isolations (n=67)	Prevalence of isolated <i>E. coli</i> (%)
Sai Yok	14°28'08.2"N 98°50'32.3"E	8	8	100
Lumsum	14°05'14.8"N 99°07'54.0"E	14	12	85.7
Si Mongkhon	13°59'32.6"N 99°15'25.3"E	14	12	85.7
Tha Sao	14°19'07.1"N 98°58'36.8"E	14	12	85.7
Sing	14°06'54.9"N 99°12'19.6"E	14	11	78.6
Wang Krachae	14°15'31.5"N 98°56'13.4"E	14	7	50.0
Bongti	14°05'08.4"N 99°00'18.1"E	14	5	35.7

µg), ceftriaxone (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), enrofloxacin (5 µg), sulfonamides (25 µg), gentamycin (10 µg), amikacin (30 µg), nitrofurantoin (100 µg), and piperacillin/tazobactam (100/10 µg) (Oxoid LTD., England). The zone of inhibition (mm) was measured and interpreted in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). *E. coli* ATCC25922 was used as the control strain.

Screening of the ESBL-producing *E. coli* phenotype

The isolates showing resistance characteristics to cefotaxime (the zone of inhibition: less than 27 mm) and ceftriaxone (the zone of inhibition: less than 25 mm) were screened for ESBL production using a modified double-disc synergy test (MDDST). A lawn culture of the organisms was made on a Mueller-Hinton agar plate, as was recommended by CLSI (CLSI, 2018). The amoxicillin/clavulanate (20/10 µg) was placed at the center of the plate along with four cephalosporins: third-generation cephalosporins (cefotaxime, ceftriaxone, and cefpodoxime) and a fourth-generation cephalosporin (cefepime). The discs of third- and fourth-generation

cephalosporin were placed 15 and 20 mm apart (Kaur et al., 2013).

*bla*_{CTX-M} gene encoding in *E. coli* isolates by polymerase chain reaction (PCR) technique

The genomic DNA of *E. coli* isolates was extracted from a single colony following the boiling method (Bai et al., 2010). Briefly, a single colony was picked and boiled in 100 µl RNase-free water (Thermo Fisher Scientific, USA) in a 95 °C block heater for 10 min and then centrifuged at 1,300 rpm for 10 min to remove the cell debris. The supernatant was transferred to a new tube, whose concentration and purity were measured by a Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) at 260/280 and 260/230 ratios, respectively, and kept at -20 °C until use.

Amplification and detection of beta-lactamase gene

The supernatant DNA of boiled bacterial colonies was used as a template to amplify 543 base pairs (bp) of the *bla*_{CTX-M} gene using the CTX-M universal primers: MA1; 5'-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3' and

MA2; 5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3' (Macrogen laboratory, South Korea) (Saladin et al., 2002). The PCR reaction was set up as follows: 12.5 µl Taq polymerase TopTaq master mix (Qiagen., Hilden, Germany) and 0.5 µl each of forward and reverse primers (10 µM), 2.5 µl CoralLoad Concentrate, 2 µl DNA template (50 ng/µl), and up to 25 µl molecular biology grade water in a PCR tube. The CTX-M1 ESBL-producing *E. coli* was used as a positive control (Lugsomya et al., 2018). Amplifications were conducted in a T100™ Thermal Cycler. The thermocycling conditions were set up as follows: one 5 min step at 94 °C followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, and 60 s at 72 °C with a final extension step of 10 min at 72 °C. Amplicons were electrophoresed on 2.0% agarose gels, stained with GelRed™ (Biotium, USA), and visualized using a c150 UV transilluminator (Azure Biosystems, USA). To verify the DNA quality, we conducted 16S rRNA amplifications using 12.5 µl Taq polymerase TopTaq master mix 2.5 µl coralLoad concentrate, 0.5 µl forward primer (10 µM) (16S rRNA-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 0.5 µl reverse primer (10 µM) (16S rRNA-R: 5'-CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC-3') (Macrogen laboratory, South Korea) (Yadav et al., 2009; Magray et al., 2011), 2 µl DNA template (50 ng/µl), and up to 25 µl molecular biology-grade water. The thermocycling conditions were set up as follows: one 3 min at 94 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 60 s at 72 °C with a final extension step of 10 min at 72 °C. The PCR products (758 bp) were examined, stained, and visualized as described (Yadav et al., 2009).

Statistical analysis

The IBM SPSS Statistics 21 was used to analyze the statistical differences in the collected data. The influencing factors of goat farm operations were also analyzed by Chi-square test. All significant levels were justified at p -value < 0.05

Results

Prevalence of *E. coli* isolates from healthy goat farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province

A total of 67 *E. coli* isolates (72.8%) were identified from 92 swab samples. These *E. coli* isolates can be found in all goat farms in Sai Yok District. Table 1 showed the prevalence of *E. coli* from each subdistrict. The prevalence rates of the isolated samples from 6 subdistricts (85.7%) were higher than or equal to 50%.

Factors related to the prevalence of *E. coli*

The data of influencing factors related to farming operations were collected and classified (Table 2). The results showed that all 92 goats received antimicrobial agents at least 3 months before the sample collection, and 84.8% of the goats were given drugs by the owner. The number of *E. coli* isolates from these groups was significantly higher than that in the goats that received antimicrobial agents from a veterinarian ($p < 0.001$). The *E. coli* isolated from goats drinking water from natural source nearly livestock farms showed a significant difference compared with those found in goats drinking from the tap water system ($p < 0.038$). The method of farming and type of animal feed did not affect the number of *E. coli* observed.

Table 2. Farming operation factors categorized with the prevalence of *E. coli* isolated from goats in livestock farms from 7 subdistricts in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand.

Factors	Category	No. of rectal swab (%) n=92	No. of <i>E. coli</i> isolations (%) n=67	p-value
Method of farming	Intensive rearing	78 (84.8)	55 (82.1)	0.239
	Semi-Intensive rearing	14 (15.2)	12 (17.9)	
Animal feed	Roughage	64 (69.6)	48 (71.6)	0.479
	Roughage and	28 (30.4)	19 (28.4)	
	Concentrated			
Source of water	Tap water system	50 (54.3)	32 (47.8)	0.038*
	Natural sources	42 (45.7)	35 (52.2)	
Previous antimicrobial use	Ever	92 (100)	67 (72.8)	N/A
	Never	-	-	
Person giving antimicrobials	Owners	78 (84.8)	62 (92.5)	0.001*
	Veterinarian	14 (15.2)	5 (7.5)	

N/A=Not applicable, *Significance was determined when $p < 0.05$.

Antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates

The *E. coli* isolates showed a high susceptibility to almost of the antimicrobial agents tested (Table 3). The total samples did not show resistance characteristics to amoxicillin/clavulanic acid, fluoroquinolones, and trimethoprim/sulfamethoxazole. A moderate susceptibility to antimicrobial agents was found with the administration of cephalosporin (35.8%-55.2%) and amikacin (55.2%). The highest rate of resistance was observed with cefotaxime, but the value was less than 20%.

Among the 67 *E. coli* (38.8%) isolates from healthy goats, 26 exhibited the AMR patterns categorized by the number of antimicrobial agents in Table 4. Most of the *E. coli* showed resistance to one agent followed by two and at least three agents (63%, 27%, and 10%, respectively). Group 1 showed the highest number of *E. coli* isolates with cephalosporin resistance. Meanwhile,

57.1% of group 2 and 100% of group 3 also exhibited resistance to cephalosporin.

Screening of the ESBL-producing *E. coli* phenotype and *bla*_{CTX-M} gene expression

Out the 67 *E. coli* isolates (65.67%), 44 showed positive phenotypic results of MDDST. Thus, the conventional PCR technique was performed and screened the isolates to determine the *bla*_{CTX-M} gene expression in the total *E. coli* isolates using the universal primers. The results revealed that the *bla*_{CTX-M} gene expression could not be found in *E. coli* isolated (Figure 2 and 3) from the goat farms in Sai Yok District, Kanchanaburi Province.

Table 3. The antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolated from goats (n=67).

Antimicrobials		The antimicrobial susceptibility (%)	
		S	R
Penicillins	AMP	92.5 (62)	7.5 (5)
	AMC	100 (67)	-
Carbapenems	IPM	100 (67)	-
	MEM	89.6 (60)	10.4 (7)
Cephalosporins	CRO	95.5 (64)	4.5 (3)
	CPD	97.0 (65)	3.0 (2)
	CTX	80.6 (54)	19.4 (13)
Fluoroquinolones	NOR	100 (67)	-
	CIP	100 (67)	-
	ENR	100 (67)	-
Sulfonamides	STX	100 (67)	-
Aminoglycosides	CN	83.6 (56)	16.4 (11)
	AK	98.5 (66)	1.5 (1)
Other	F	97.0 (65)	3 (2)
	TZP	100 (67)	-

Abbreviation for table 3-4: S=Sensitivity, I=Intermediate, R=Resistant, AMP=Ampicillin,

AMC=Amoxicillin/clavulanic acid, IPM=Imipenem, MEM=Meropenem, CRO=Ceftriaxone, CPD=Cefpodoxime, CTX=Cefotaxime, CIP=Ciprofloxacin, NOR=Norfloxacin, ENR=Enrofloxacin, STX=Trimethoprim/sulfamethoxazole, AK=Amikacin, CN=Gentamicin, F=Nitrofurantoin, TZP=Piperacillin/tazobactam

Table 4. The pattern of antimicrobial-resistant of *E. coli* isolated from goats (n=27). Group 1: resistance to 1 antimicrobial agent, Group 2: resistance to 2 antimicrobial agents, Group 3: resistance to more than 3 antimicrobial agents.

By group	By pattern of resistance	The number of resistant <i>E. coli</i> (%)	
		Pattern	Group
1	CTX	6 (35.3)	17(63)
	CN	4 (23.5)	
	AMP	3 (17.6)	
	CRO	1 (5.9)	
	CPD	1 (5.9)	
	F	1 (5.9)	
	MEM	1 (5.9)	
2	CN+MEM	2 (28.5)	7 (27)
	CN+APM	1 (14.3)	
	CTX+AMP	1 (14.3)	
	CTX+MEM	1 (14.3)	
	CTX+AK	1 (14.3)	
	CTX+CN	1 (14.3)	
≥ 3	CTX+CPD+F	1 (33)	3 (10)
	CTX+CRO+CN+MEM	2 (67)	

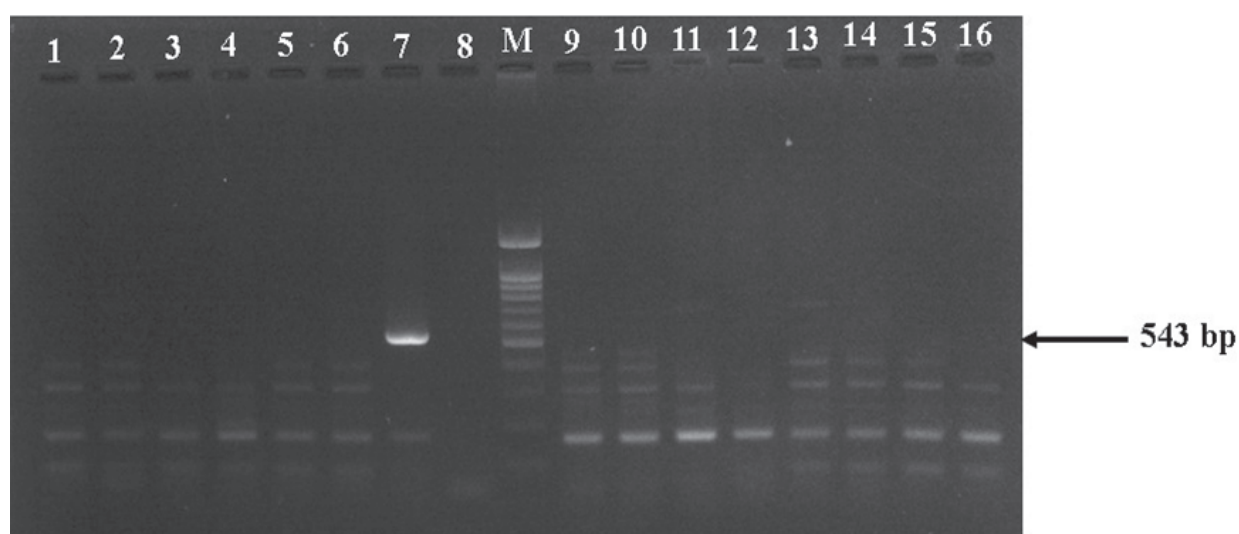


Figure 2. PCR amplification of *bla*_{CTX-M} gene of *E. coli* on 2% agarose gel electrophoresis. Lane M DNA ladder, MW 100 bp ladder. Lanes 7 showed a typical band size of 543 bp corresponding to *bla*_{CTX-M} of positive isolate using universal CTX primers (MA1 and MA2). Lanes 1-6 and 9-16 were the examples of isolated samples. Lane 8 was the negative control (nuclease-free water).

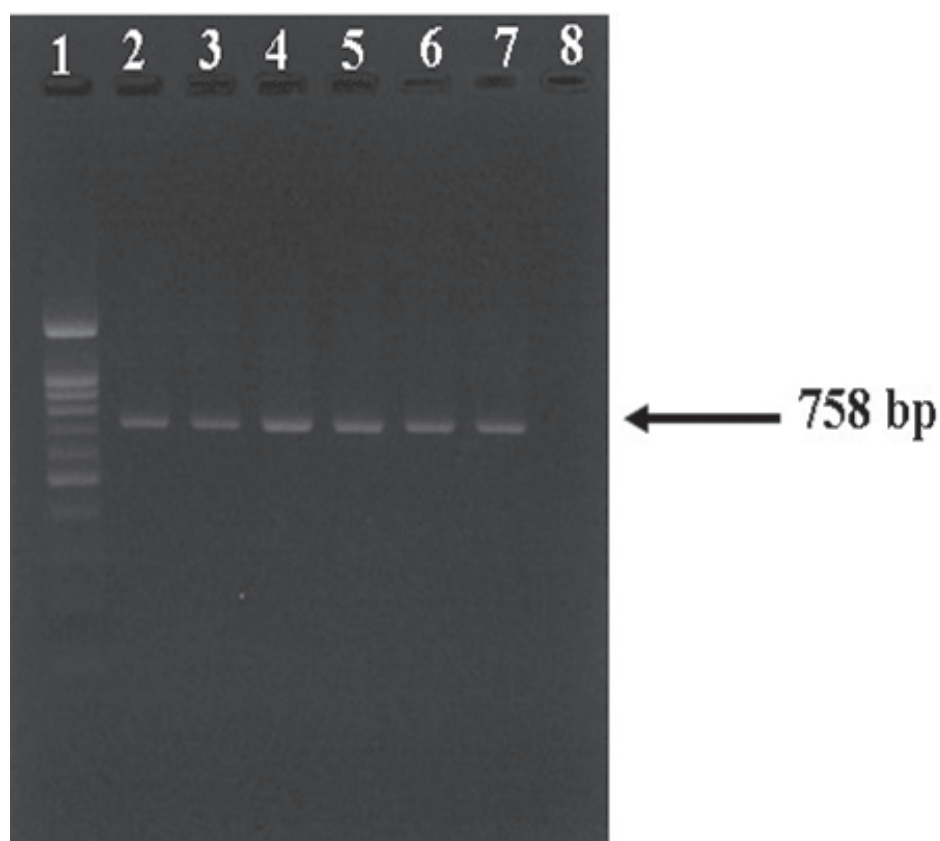


Figure 3. PCR amplification of 16S rRNA gene of *E. coli* on 2% agarose gel electrophoresis. Lane 1 DNA ladder, MW 100 bp ladder. Lane 2 positive control (CTX-M1 ESBL-producing *E. coli*). Lanes 3-7 showed a typical band size of 758 bp corresponding to 16S rRNA of the selected isolates using 16S rRNA primers. Lane 8 was the negative control (nuclease-free water).

Discussion

The monitoring system for the AMR patterns in ESBL-producing bacteria recently focused on relevant information from cattle, pigs, and poultry and linked the summarized data to human healthcare (Murphy et al., 2018; Schrijver et al., 2018). The prevalence *E. coli* isolates harbored *bla*_{CTX-M} genes trend to rise even in newborn and young dairy cattle (Waade et al., 2021; Nüesch-Inderbinen et al., 2022). The study of van Hoek showed that the rapid dissemination of ESBL-*E. coli* in broiler farm most likely occurred by the horizontal transfer of plasmid carrying *bla*_{CTX-M-1} (van Hoek AHAM et al., 2018). The high level of ESBL-*E. coli* carriage in veterinary healthcare workers due to occupational contact with animals might be important source of ESBL-*E. coli*. (Meijs et al., 2021).

Domestic ruminants, including goats, can be natural reservoirs by carrying *E. coli* in their intestine and excreting microorganisms through feces (Dulo et al., 2015). The digestive tract of goats is a natural habitat for *E. coli*. However (Kannan et al., 2021), the prevalence of *E. coli* in small domestic ruminants, especially goats, is less reported than that in cattle. The samples from healthy farm animals in Tunisia revealed that the highest number of *E. coli* isolated from goats (27.7%) was higher than those from sheep (20%) and cattle (14.2%) (Bessalah et al., 2021). The prevalence rate of *E. coli* isolated from healthy goats in this study (72.8%) was lower than that in studies in Spain (79%-86%) and South Africa (80.2%) (Malahlela et al., 2022). These values were higher than prevalence rates in Vietnam (38.5%) (Vu-Khac et al., 2008) and Greece (37.5%) (Tsilipounidaki et al., 2022). Moreover, *E. coli* can be found in petting zoos (20.0%) by rectal swabs (Göttling et al., 2022). Some previous reports revealed that healthy goats can be reservoirs of

pathogenic *E. coli*, including the Shiga toxin-producing and atypical enteropathogenic types. *E. coli* isolates were found in goat carcass, milk, feces, and farm environment, including feed pellets and water (Dulo et al., 2015; Álvarez-Suárez et al., 2016).

All *E. coli* samples from this study had a high susceptibility to almost all of the tested antimicrobial agents, including amoxicillin/clavulanic acid, imipenem, fluoroquinolones, and trimethoprim/sulfamethoxazole. The samples also showed a moderate susceptibility to cephalosporin and amikacin (more than 50%). The highest rate of resistance was observed with cefotaxime, but the value was not more than 20% (19.4%). The various data on AMR characteristics and gene expression were revealed from a previous study. Our results differed from those in studies in Tunisia and USA, where the *E. coli* isolated from goats had the highest resistance rates to tetracycline (44.4% and 51%, respectively) (Bessalah et al., 2021). Ndegwa et al. (2019) showed that *TetB* and *bla*-TEM were the most detected from drug-resistant *E. coli*. Most isolates in this study were resistant to only one antimicrobial agent (63%). Similar to the *E. coli* isolated from a goat farm in Bangkok, the resistance rate to at least one antimicrobial agent was 78.3%. However, the highest AMR was observed with streptomycin (65.6%) (Prapasawat and Intarapuk 2021). According to the definition by Magiorakos et al. (2012) MDR phenotypes are non-susceptible to at least one agent in three or more antimicrobial categories; the MDR *E. coli* isolates from this study (7%) had a lower rate than those obtained from another dairy cattle farm (37.1%) (Obaidat et al., 2018).

The recent emergence of MDR *E. coli* threatens worldwide public health. The existence of various antimicrobial gene-encoded β -lactamases poses a

concern. The ESBLs are encoded by specific ESBL genes, including *bla*_{TEM}, *bla*_{KPC}, and *bla*_{CTX}. ESBL-harboring *E. coli* were found in 50% of the fecal samples from healthy food-producing animals in Pakistan. Among the ESBL genes, *bla*_{CTX-M} was the most prevalent group detected (98.66%) (Shafiq et al., 2022). The *bla*_{CTX-M} is commonly detected in porcine (72.0%) and poultry farms (34.2%) (Balázs et al., 2021). In contrast to our results, which were in agreement with those of a previous study by Abdalhamed et al. (2021), *bla*_{CTX-M} expression could not be detected from the *E. coli* isolates from goats by rectal swabs. The highest rate of *bla*_{TEM} expression (25.9%) was found more than that of *bla*_{CTX-M}. In addition, our study performed the screening of *bla*_{CTX-M} gene using the universal primers (MA1/MA2) to indicate at least one of *bla*_{CTX-M} genes if the PCR result showed positive. (Ramadan et al., 2019). However, the CTX-M universal primer might not amplify *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-55}, and *bla*_{CTX-M-65}, which have been reported in sheep, the whole-genome sequencing should be used to explore the multiple CTX-M type (Atlaw et al., 2021).

In petting zoos, only one sample of *Escherichia fergusonii*, not *E. coli*, carried a *bla*_{CTX-M-1}-encoded ESBL phenotype (Göttling et al., 2022). CTX-M genotypes are associated with different geographical regions. The reports of isolates producing CTX-M remain sporadic in Asia (Hawkey and Jones 2009). In addition, the prevalence of ESBL-producing *E. coli* possessing the *bla*_{CTX-M} gene in healthy animals is usually lower than those in diarrheic animals (Shabana and Al-Enazi, 2020).

The contamination by drug-resistant *E. coli* in the farm environment may play a role in the acquisition of resistant bacteria shedding from feces of pastured goats (Ndegwa et al., 2019; Nichols et al., 2021). The

E. coli prevalence in intensively reared goats in this study was not significantly different from that in semi-intensively reared goats. However, intensive management was the influencing factor of prevalence and AMR of *E. coli* isolates from goats in Jordan (Novotna et al., 2005). From the report of Gutta et al. (2009), goats receiving concentrated feed had a higher level of *E. coli* in the rectum than hay-fed goats. These results differ from the findings of this study. The number of *E. coli* isolated from goats drinking water from the natural sources near livestock farms was significantly higher than that from goats drinking from the tap water system ($p < 0.038$). The antibiotic-resistant *E. coli* can be found from natural sources of water, such as stream, inflow rivers (Ma et al., 2022), and groundwater environments (Tropea et al., 2021). These water sources, which are composed of bed and bank sediments, can be a reservoir of fecal indicator bacteria, including *E. coli*, because of human and livestock fecal contamination (Brinkmeyer et al., 2015; Smolders et al., 2015; Salam et al., 2021). Some plasmid-mediated antibiotic-resistant *E. coli* were collected from riverbed sediments near aquaculture farms and almost had ampicillin, amoxicillin, and streptomycin resistance characteristics (Lihan et al., 2021). These MDR *E. coli* isolates from water samples near aquaculture farms showed high resistance rates to penicillin, amoxicillin, ampicillin, tetracycline, sulfamethoxazole, sulfisoxazole, chloramphenicol, florfenicol and rifampin (Liao et al., 2021). Moreover, other environmental contaminations may be the sources of MDR *E. coli* gene contaminating water sources. The samples from swine feces revealed several drug-resistant genes in *E. coli*, such as *clmA*, *gryB*, *tetO*, *tetM*, *fexA*, *ermA*, *qnrS*, *sul1*, *mcr1*, etc., that can be transmitted horizontally from animal feces to the surrounding environments of farms (Peng et al., 2021).

This study revealed the high prevalence of *E. coli* isolated from the goats that received antimicrobial agents from the farm owner ($p < 0.001$). The integration of work, monitoring, and data sharing system between veterinarians and farmers positively influence the animal health, biosecurity, production management, and livestock AMR problems (Magouras et al., 2017). As the antimicrobial agents dispensed without a veterinary prescription can aggravate the drug resistance problem in livestock farms, effective veterinary services are required to minimize the risk of prevalence and contamination by drug-resistant bacteria (Magnusson et al., 2021). Due to the complex association between the usage of antibiotics on farms and the human health risk (Samreen et al, 2021), the major aspects of future research in goat farm are to investigate of more covering data that may contribute to prevalence and transmission dynamics on goat farms. One Health system may be hopeful strategies for developing the food-animal farming management and managing the challenge of AMR.

In conclusion, the study showed the prevalence of *E. coli* isolated from healthy farm goats in Sai Yok District, Kanchanaburi Province, Thailand (72.8%, 67 isolates from a total of 92 swab samples). This finding implied the healthy goats can be natural reservoirs by carrying *E. coli* in their intestine. The influencing factors of *E. coli* prevalence in this area were the sources of drinking water and person providing the antimicrobial agents. The *E. coli* isolates had a high susceptibility to almost all of the antimicrobial agents tested. All isolates were susceptible to commonly used antimicrobials, such as amoxicillin/clavulanic acid, fluoroquinolones, and trimethoprim/sulfamethoxazole. The *E. coli* isolates showed a moderate susceptibility to cephalosporin (35.8%-55.2%) and amikacin (55.2%). The highest

resistance rate was found *E. coli* isolates exposed to cefotaxime (19.4%). Most of the drug-resistant *E. coli* resisted only one antimicrobial followed by two and at least three antimicrobials (63%, 27%, and 10%, respectively). In addition, 7% of the *E. coli* isolates showed the MDR phenotype. The *bla*_{CTX-M} gene could not be found from any of the *E. coli* isolates. Although the study revealed the slightly low level of MDR phenotype and non-expression of *bla*_{CTX-M} gene in the goat farms, appropriate management and monitoring strategies should be continuously carried out to protect the animal and human health, welfare, and food safety as public concern issues.

Acknowledgements

We thank Assoc. Prof. Dr. Nuvée Prapasarakul and Kittitat Lugsomya, Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for supporting the original material of ESBL-producing *E. coli* and Asst. Prof. Sakdichod Kimsakulvech for the assistance with the statistical analysis. The study was funded (2018) by the Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Thailand.

References

- Abdalhamed AM, Ghazy AA, Ibrahim ES, Arafa AA, Zeedan GSG. Therapeutic effect of biosynthetic gold nanoparticles on multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* species isolated from ruminants. *Vet World*. 2021;14(12):3200-10.
- Al-Ajmi D, Rahman S, Banu S. Occurrence, virulence genes, and antimicrobial profiles of *Escherichia coli* O157 isolated from ruminants slaughtered in Al Ain, United Arab Emirates. *BMC Microbiol*. 2020; 20(1):210.

- Álvarez-Suárez ME, Otero A, García-López ML, Dahbi G, Blanco M, Mora A, Blanco J, Santos JA. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int J Food Microbiol.* 2016;236:148-54.
- Atlaw NA, Keelara S, Correa M, Foster D, Gebreyes W, Aidara-Kane A, et al. Identification of CTX-M Type ESBL *E. coli* from sheep and their abattoir environment using whole-genome sequencing. *Pathogens.* 2021;10(11):1480.
- Bai J, Shi X, Nagaraja TG. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods.* 2010;82(1):85-9.
- Balázs B, Nagy JB, Tóth Z, Nagy F, Károlyi S, Turcsányi I, et al. Occurrence of *Escherichia coli* producing extended spectrum β -lactamases in food-producing animals. *Acta Vet Hung.* 2021;69(3):211-15.
- Bessalah S, Fairbrother JM, Salhi I, Vanier G, Khorchani T, Seddik M-M, et al. Characterization and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy farm animals in Tunisia. *Anim Biotechnol.* 2021;32(6):748-57.
- Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife.* 2015;4:e05826.
- Bosilevac JM, Gasseem MA, Al Sheddy IA, Almaiman SA, Al-Mohizea IS, Alowaimer A, et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in camels, cattle, goats, and sheep harvested for meat in Riyadh. *J Food Prot.* 2015;78(1):89-96.
- Brinkmeyer R, Amon RM, Schwarz JR, Saxton T, Roberts D, Harrison S, et al. Distribution and persistence of *Escherichia coli* and *Enterococci* in stream bed and bank sediments from two urban streams in Houston, TX. *Sci Total Environ.* 2015;502:650-8.
- Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes TA, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* 2010;10:161.
- Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance.* 2021;3(3):dlab092.
- CLSI. M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute;2018.
- Dulo F, Feleke A, Szonyi B, Fries R, Baumann MPO, Grace D. Isolation of multidrug-resistant *Escherichia coli* O157 from goats in the Somali region of Ethiopia: A cross-sectional, abattoir-based study. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142905.
- Elzhraa F, Al-Ashmawy M, El-Sherbini M, Abdelkhalek A. Critical occurrence of verotoxigenic *E. coli* and non-typhoidal salmonella in some heat treated dairy products. *Ital J Food Saf.* 2021;10(2):9318.
- Gonzalez AGM, Cerqueira AMF. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2020;128(6):1568-82.
- Google. Map (Sai Yok) [Internet]. Google 2022 [cited 2022 Mach 22]. Available from: <http://maps.google.co.th/>.
- Göttling J, Heckel J-O, Hotzel H, Fruth A, Pfeifer Y, Henning K, et al. Zoonotic bacteria in clinically healthy goats in petting zoo settings of zoological gardens in Germany. *Zoonoses Public Health.* 2022;69(4):333-43.
- Gutta VR, Kannan G, Lee JH, Kouakou B, Getz WR. Influences of short-term pre-slaughter dietary manipulation in sheep and goats on pH and microbial loads of gastrointestinal tract. *ScienceDirect.* 2009;81(1):21-28.

- Hanlon KE, Miller MF, Guillen LM, Echeverry A, Dormedy E, Cemo B, et al. Presence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 on the hide, and presence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* in feces from small-ruminant (goat and lamb) samples collected in the United States, Bahamas and Mexico. *Meat Sci.* 2018;135:1-5.
- Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64 (Suppl 1):i3-10.
- Ioanna F, Quaglia NC, Storelli MM, Castiglia D, Goffredo E, Storelli A, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Caciocotta goat cheese. *Food Microbiol.* 2018;70:200-5.
- Kaur J, Chopra S, Sheevani, Mahajan G. Modified double-disc synergy test to detect ESBL production in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(2):227-31.
- Kannan G, Mahapatra AK, Degala HL. Preharvest management and postharvest intervention strategies to reduce *Escherichia coli* contamination in goat meat: A Review. *Animals (Basel).* 2021;11(10):2943.
- Lambrech NJ, Wilson ML, Bridges D, Eisenberg JNS, Adu B, Baylin A, et al. Ruminant-related risk factors are associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in Southern Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2021;106(2):513-22.
- La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Wales AD. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33(2):394-410.
- Leekitcharoenphon P, Johansson MHK, Munk P, Malorny B, Skarżyńska M, Wadepohl K, et al. Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2021;11(1):15108.
- Liao CY, Balasubramanian B, Peng JJ, Tao SR, Liu WC, Ma Y. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from aquaculture farms and their environment in Zhanjiang, China. *Front Vet Sci.* 2021;8:806653.
- Lihan S, Lee SY, Toh SC, Leong SS. Plasmid-mediated antibiotic resistant *Escherichia coli* in sarawak rivers and aquaculture farms, Northwest of Borneo. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(7):776.
- Lugsomya K, Chatsuwan T, Niyomtham W, Tummaruk P, Hampson DJ, Prapasarakul N. Routine prophylactic antimicrobial use Is associated with increased phenotypic and genotypic resistance in commensal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy fattening pigs on farms in Thailand. *Microb Drug Resist.* 2018;24(2):213-23.
- Ma CY, Sugie Y, Yu Z, Okuno Y, Tanaka H, Ihara M. Occurrence of *E. coli* and antibiotic-resistant *E. coli* in the southern watershed of Lake Biwa, including in wastewater treatment plant effluent and inflow rivers. *Chemosphere.* 2022;301:134372.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
- Magnusson U, Moodley A, Osbjør K. Antimicrobial resistance at the livestock-human interface: implications for veterinary services. *Rev Sci Tech.* 2021;40(2):511-21.
- Magouras I, Carmo LP, Stärk KDC, Schüpbach-Regula G. Antimicrobial usage and -resistance in livestock: where should we focus?. *Front Vet Sci.* 2017;4:148.
- Magray MS, Kumar A, Rawat AK, Srivastava S. Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. *Bio information.* 2011; 6(10):370-1.

- Malahlela MN, Cenci-Goga BT, Marufu MC, Fonkui TY, Grispoli L, Etter E, et al. Occurrence, aerotypes and virulence characteristics of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolates from goats on communal rangeland in South Africa. *Toxins (Basel)*. 2022;14(5):353.
- Manishimwe R, Moncada PM, Musanayire V, Shyaka A, Scott HM, Loneragan GH. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* from the feces of food animals in the east province of Rwanda. *Animals (Basel)*. 2021;11(4):1013.
- Meijs AP, Gijsbers EF, Hengeveld PD, Dierikx CM, de Greeff SC, van Duijkeren E. ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* carriage among veterinary healthcare workers in the Netherlands. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10(1):147.
- Miltgen G, Martak D, Valot B, Kamus L, Garrigos T, Verchere G, et al. One Health compartmental analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* on Reunion Island reveals partitioning between humans and livestock. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(5):1254-62.
- Mora A, Herrerra A, Lopez C, Dahbi G, Mamani R, Pita JM, et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol*. 2011;14(3):121-41.
- Murphy CP, Carson C, Smith BA, Chapman B, Marrotte J, McCann M, et al. Factors potentially linked with the occurrence of antimicrobial resistance in selected bacteria from cattle, chickens and pigs: A scoping review of publications for use in modelling of antimicrobial resistance (IAM.AMR Project). *Zoonoses Public Health*. 2018;65(8):957-71.
- Mwanyika G, Call DR, Rugumisa B, Luanda C, Murutu R, Subbiah M, et al. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from fresh goat meat in Arusha, Tanzania. *J Food Prot*. 2016;79(9):1635-41.
- Ndegwa E, Almeshmadi H, Chyer K, Kaseloo P, Ako AA. Longitudinal shedding patterns and characterization of antibiotic resistant *E. coli* in pastured goats using a cohort study. *Antibiotics*. 2019;8(3):136.
- Nichols MC, Gacek P, Phan Q, Gambino-Shirley KJ, Gollarza LM, Schroeder MN, et al. Agritourism and kidding season: A large outbreak of human shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157) infections linked to a goat dairy farm-Connecticut, 2016. *Front Vet Sci*. 2021;8:744055.
- Novotna R, Alexa P, Hamrik J, Madanat A, Smola J, Cizek A. Isolation and characterization shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157:H7. *Veterinarni Medicina*. 2005;50(3):111-18.
- Nüesch-Inderbinen M, Hänni C, Zurfluh K, Hartnack S, Stephan R. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in calves from organic and conventional dairy farms in Switzerland. *Microbiologyopen*. 2022;11(2):e1269.
- Obaidat MM, Bani Salman AE, Davis MA, Roess AA. Major diseases, extensive misuse, and high antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in large- and small-scale dairy cattle farms in Jordan. *J Dairy Sci*. 2018;101(3):2324-34.
- Peng JJ, Balasubramanian B, Ming YY, Niu JL, Yi CM, Ma Y, et al. Identification of antimicrobial resistance genes and drug resistance analysis of *Escherichia coli* in the animal farm environment. *J Infect Public Health*. 2021;14(12):1788-95.

- Prapasawat W, Intarapuk A. Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* isolated from feces of dairy goats in Nong Chok, Bangkok, Thailand. *Vet Integr Sci*. 2021;19(2): 223-36.
- Ragione RML, Best A, Woodward MJ, Wales AD. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants, *FEMS Microbiology Rev*. 2009;33(2):394-410.
- Ramadan AA, Abdelaziz NA, Amin MA, Aziz RK. Novel *bla*_{CTX-M} variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2019;9(1):4224.
- Riley LW. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2020;8(4).
- Salam S, McDaniel R, Bleakley B, Amegbletor L, Mardani S. Variability of *E. coli* in streambed sediment and its implication for sediment sampling. *J Contam Hydrol*. 2021;242:103859.
- Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;209(2):161-8.
- Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;27:101-11.
- Schrijver R, Stijntjes M, Rodríguez-Baño J, Tacconelli E, Babu Rajendran N, Voss A. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(6):577-90.
- Shafiq M, Rahman SU, Bilal H, Ullah A, Noman SM, Zeng M, et al. Incidence and molecular characterization of ESBL-producing and colistin-resistant *Escherichia coli* isolates recovered from healthy food-producing animals in Pakistan. *J Appl Microbiol*. 2022; 133(3):1169-82.
- Shabana II, Al-Enazi AT. Investigation of plasmid-mediated resistance in *E. coli* isolated from healthy and diarrheic sheep and goats. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(3):788-96.
- Smolders A, Rolls RJ, Ryder D, Watkinson A, Mackenzie M. Cattle-derived microbial input to source water catchments: An experimental assessment of stream crossing modification. *J Environ Manage*. 2015; 156:143-9.
- Tropea E, Hynds P, McDermott K, Brown RS, Majury A. Environmental adaptation of *E. coli* within private groundwater sources in southeastern Ontario: Implications for groundwater quality monitoring and human health. *Environ Pollut*. 2021;285:117263.
- Tsilipounidaki K, Florou Z, Lianou DT, Michael CK, Katsarou EI, Skoulakis A, et al. Detection of zoonotic gastrointestinal pathogens in dairy sheep and goats by using filmarray® multiplex-PCR technology. *Microorganisms*. 2022;10(4):714.
- van Hoek AHAM, Veenman C, Florijn A, Huijbers PMC, Graat EAM, de Greeff S, et al. Longitudinal study of ESBL *Escherichia coli* carriage on an organic broiler farm. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(12): 3298-304.
- Vu-Khac H, Cornick NA. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Vet Microbiol*. 2008;126(4):356-63.
- Waade J, Seibt U, Honscha W, Rachidi F, Starke A, Speck S, et al. Multidrug-resistant enterobacteria in newborn dairy calves in Germany. *PLoS One*. 2021; 16(3):e0248291.
- Yadav V, Prakash S, Srivastava S, Verma PC, Gupta V, Basu V, et al. Identification of *Comamonas* species using 16S rRNA gene sequence. *Bioinformation*. 2009;3(9):381-3.

Species Diversity of Mosquito Vectors in Kubae Salo Village, Kaluwo Sub-District, Mueang Narathiwat District, Narathiwat Province for Surveillance and Control

Sedthapong Laojun Muhammadnabil Hayitantu Juthamad Janhyok
Natthaya Manklang Jittawan Nammoontree Kanyarat Kaisaeng
Pongmada Damapong Peerada Damapong Wea-anisa Ama Tanawat Chaiphongpachara*

Department of Public Health and Health Promotion, College of Allied Health Sciences,
Suan Sunandha Rajabhat University, Thailand

*Corresponding author, E-mail address: tanawat.ch@ssru.ac.th

Received: 11 November 2022; Revised: 2 December 2022; Accepted: 6 December 2022

Abstract

Mosquitoes are small flying insects that are found all over the world, particularly in tropical and temperate regions. Currently, there are approximately 3,617 officially recognized species of mosquitoes. Many mosquito species are vectors of many important pathogens to humans and animals. However, different species of mosquitoes have different abilities to carry disease-causing pathogens. Therefore, planning to control mosquito-borne diseases requires information on the species diversity of vectors in the endemic area in order to be able to control them appropriately and effectively. The purpose of this study was to study the species diversity of mosquito vectors in Kubae Salo village, Kaluwo Sub-District, Mueang Narathiwat District, Narathiwat Province. A total of 1,214 mosquitoes were collected in this study, classified into 26 species in 10 genera (genus), of which 10 genera were found: *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Neomelania*, and *Uranoteania*. The value of the species diversity index of mosquitoes in Kubae Salo village, Kaluwo Sub-District, Mueang Narathiwat District, Narathiwat Province was 2.139 and the species evenness was 0.657. The most common mosquito species in this survey was *An. sundaicus* s.l. accounted for 3.96%, followed by *Cq. ochracea* accounted for 21.09%, *Cq. crassipes* accounted for 18.29%, *Cx. gelidus* accounted for 4.20%, and *Ma. bonneae* accounted for 3.71%, respectively. The results of this study could be useful in controlling mosquito vectors in Kubae Salo village, Kaluwo Sub-District, Mueang Narathiwat District, Narathiwat Province. It is also used as an entomological database for people to know about the risk of mosquito-borne diseases in the future.

Keywords: Species diversity, mosquito vectors, Narathiwat

ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคในพื้นที่บ้านกุแบสาโล ตำบลกะหลวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส เพื่อการเฝ้าระวังและควบคุม

เศรษฐพงศ์ เหล่าจันทร์ มุฮัมมัดนาบิล หะยีตันตู จูทามาต จันหยก ญัณฐยา ม่านกลาง จิตรวรรณ นามมูลตรี
กัญญารัตน์ ไชแสง พงศ์มาดา ดามาพงษ์ ไพรดา ดามาพงษ์ แวอานีชา อามะ ธนวัฒน์ ชัยพงศ์พัชรา*

สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์และการส่งเสริมสุขภาพ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: tanawat.ch@ssru.ac.th

Received: 11 November 2022; Revised: 2 December 2022; Accepted: 6 December 2022

บทคัดย่อ

ยุงเป็นแมลงบินได้ขนาดเล็กที่สามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนและเขตอบอุ่น ปัจจุบันมียุงที่ได้รับชื่ออย่างเป็นทางการ จำนวนประมาณ 3,617 ชนิด ยุงหลายชนิดเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคที่สำคัญหลายชนิดมาสู่มนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามยุงพาหะแต่ละชนิด มีความสามารถในการนำเชื้อก่อโรคได้แตกต่างกัน ดังนั้นการวางแผนควบคุมโรคติดต่อที่นำโดยยุงย่อมต้องอาศัยข้อมูลความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของพาหะนำโรคในพื้นที่ จึงจะดำเนินการควบคุมได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคในพื้นที่บ้านกุแบสาโล ตำบลกะหลวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส โดยยุงที่รวบรวมได้ในครั้งนี้มีทั้งสิ้น 1,214 ตัว จำแนกออกเป็น 26 ชนิด (species) ใน 10 สกุล (genus) ซึ่งทั้ง 10 สกุลที่พบ ได้แก่ *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Neomelania* และ *Uranoteania* ค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงในบ้านกุแบสาโล ตำบลกะหลวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส อยู่ที่ 2.139 และมีค่าความสม่ำเสมอของชนิด อยู่ที่ 0.657 โดยยุงชนิดที่พบมากที่สุดในการสำรวจ ได้แก่ ยุงก้นปล่อง *An. sundaicus* s.l. คิดเป็นร้อยละ 3.96 รองลงมา คือ *Cq. ochracea* คิดเป็นร้อยละ 21.09 *Cq. crassipes* คิดเป็นร้อยละ 18.29 *Cx. gelidus* คิดเป็นร้อยละ 4.20 และ *Ma. bonnea* คิดเป็นร้อยละ 3.71 ตามลำดับ ผลของการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมยุงพาหะนำโรคในพื้นที่บ้านกุแบสาโล ตำบลกะหลวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส อีกทั้งยังใช้เป็นฐานข้อมูลให้แก่ประชาชนรับรู้ถึงโอกาสเสี่ยงของโรคติดต่อที่นำโดยยุงต่อไป

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ ยุงพาหะนำโรค จังหวัดนราธิวาส

บทนำ

ยุงเป็นแมลงบินได้ขนาดเล็กที่สามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่เขตร้อนและเขตอบอุ่น (Simonetti 1996) ปัจจุบันมียุงที่มีชื่ออย่างเป็นทางการ จำนวนประมาณ 3,617 ชนิด (Harbach 2022) ส่วนในประเทศไทยพบว่ามียุง จำนวนประมาณ 450 ชนิดที่กระจายตัวอยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ โดยยุงจัดเป็นแมลงที่อยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Culicidae ยุงหลายชนิดเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคที่สำคัญหลายชนิดมาสู่มนุษย์และสัตว์จากการกัดดูดเลือดของยุงเพศเมีย เพื่อนำโปรตีนและสารสำคัญในเลือดไปใช้ในการสร้างไข่ โดยยุงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และทางสัตวแพทย์ ส่วนใหญ่เป็นยุงในสกุล *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, และ *Mansonia* (Simonetti 1996)

ตัวอย่างเชื้อก่อโรคที่สร้างปัญหาแก่มนุษย์ เช่น ไวรัสก่อโรค ได้แก่ Japanese encephalitis virus ที่เป็นสาเหตุของโรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis) (Auerswald et al., 2021) dengue virus ที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever) และ chikungunya virus ที่เป็นสาเหตุของโรคไข้ปวดข้อยุงลาย (chikungunya) (Paixão et al., 2018) โปรโตซัวก่อโรค ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, และ *P. knowlesi* ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย (malaria) (Saifi et al., 2016) และ หนอนพยาธิก่อโรค ได้แก่ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) (Famakinde 2018)

ขณะที่เชื้อก่อโรคที่สร้างปัญหาแก่สัตว์ เช่น ไวรัสก่อโรค ได้แก่ canarypox virus, fowlpox virus, pigeonpox virus และ turkeypox virus ที่เป็นสาเหตุของโรคฝีดาษนก (Yeo et al., 2019) bovine ephemeral fever virus ที่เป็นสาเหตุของโรคไข้ขาแข็งหรือโรคไข้สามวันในแพะ แกะ วัว ควาย (Stokes et al., 2020) โปรโตซัวก่อโรค ได้แก่ *Trypanosoma evansi* ที่เป็นสาเหตุของโรค Trypanosomiasis หรือเชอว์รา (surra) ในโคและกระบือ (Chansiri et al., 2002) *Plasmodium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในสัตว์ (Rivero and Gandon 2018) หนอนพยาธิก่อโรค ได้แก่ *Dirofilaria immitis* ที่เป็นสาเหตุของโรคพยาธิหนอนหัวใจและ *D. repens* ที่เป็นสาเหตุของ

หนอนพยาธิในชั้นใต้ผิวหนังของสุนัขและแมว (Genchi et al., 2019)

อย่างไรก็ตามยุงพาหะแต่ละชนิด มีความสามารถแตกต่างกันในการนำเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ซึ่งมีสาเหตุมาจากภูมิคุ้มกันในร่างกายของยุงแต่ละชนิดที่ยอมรับต่อเชื้อชนิดนั้น (Clayton et al., 2014) รวมทั้งพฤติกรรมต่าง ๆ ของพวกมัน เช่น พฤติกรรมความชอบในการเข้ากัดเหยื่อ (host preference) ล้วนเกี่ยวข้องต่อการแพร่กระจายทั้งสิ้น (Sumruayphol et al., 2020) ยุงมีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดในสภาพแวดล้อมแบบป่าเขตร้อน เนื่องจากยุงหลายชนิดสามารถพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว อยู่รอดได้ดี และขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมาก (Srisuka et al., 2022) นอกจากนี้ยุงหลายชนิดยังมีอาณาเขตการกระจายตัวที่จำเพาะต่อสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น ยุงก้นปล่อง *An. epiroticus* ที่สามารถพบได้เพียงบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเล เนื่องจากยุงชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์เป็นแหล่งน้ำกร่อย (Sumruayphol et al., 2010) ดังนั้นการวางแผนควบคุมโรคติดต่อที่นำโดยยุง ย่อมต้องอาศัยข้อมูลความหลากหลายชนิดของพาหะนำโรคในพื้นที่เป้าหมาย จึงจะดำเนินการควบคุมได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

นราธิวาสเป็นจังหวัดชายแดนที่ตั้งอยู่บริเวณทางตอนใต้ของประเทศไทย มีอาณาเขตติดประเทศมาเลเซีย มีสภาพภูมิประเทศส่วนใหญ่เป็นป่าทึบและภูเขาหนาแน่น โดยคิดเป็นจำนวน 2 ใน 3 ส่วนของพื้นที่ในจังหวัดทั้งหมด ขณะที่พื้นที่ราบส่วนใหญ่อยู่ติดกับอ่าวไทย มีชายฝั่งทะเลยาวประมาณ 59 กิโลเมตร สภาพอากาศของนราธิวาสมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งปีประมาณ 27.2 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ยตลอดทั้งปีประมาณ 31.8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยตลอดทั้งปีประมาณ 23.3 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา 2565) ประชาชนส่วนใหญ่นับถือศาสนาอิสลาม นอกจากนี้ประชาชนในจังหวัดส่วนใหญ่ประกอบอาชีพการเกษตร และอุตสาหกรรม ทำให้มีโอกาสเสี่ยงมากขึ้นในการถูกยุงกัดจากการทำการเกษตร เช่น ระหว่างการกรีดยางพารา สำหรับโรคติดต่อที่นำโดยยุงในพื้นที่นราธิวาส พบหลายโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ เช่น โรคไข้เลือดออก โรคไข้ปวดข้อยุงลาย และมาลาเรียในมนุษย์ (Boonklong and

Bhumiratana 2016; Rojanapanus et al., 2019) และโรคพยาธิหนอนหัวใจในแมว (Wongkamchai et al., 2014) จากข้อมูลของกองโรคติดต่อมาโดยแมลง กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานจำนวนผู้ป่วยโรคติดต่อที่นำโดยยุงของจังหวัดนราธิวาส ในปี 2565 (มกราคม-พฤศจิกายน) ประกอบด้วย โรคไข้เลือดออก จำนวน 523 ราย มาลาเรีย จำนวน 14 ราย และโรคไข้ปวดข้อยุงลาย จำนวน 1 ราย (กองโรคติดต่อมาโดยแมลง 2565) โดยพื้นที่บ้านกูเบสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส เป็นอีกพื้นที่หนึ่งที่ต้องจับตา เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีมนุษย์อาศัยอยู่หนาแน่นมากขึ้น รวมทั้งมีการเลี้ยงสัตว์ เช่น วัว ซึ่งพบเห็นได้ทั่วไป อีกทั้งยังมียุงชุกชุม ซึ่งสร้างปัญหาความรำคาญให้แก่ประชาชนในพื้นที่ อย่างไรก็ตามข้อมูลความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคและความสม่ำเสมอของขนาดแคลน และควรดำเนินการอย่างเร่งด่วน เพื่อนำมาใช้ในการประเมินระดับความหลากหลายทางชนิดพันธุ์และความสม่ำเสมอของยุงในพื้นที่ว่าอยู่ระดับใด และทำให้ทราบว่าเมื่อมีการควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร ซึ่งจะทำให้การควบคุมประชากรยุงในอนาคตมีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากปัญหาทั้งหมดคณะผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการสำรวจความหลากหลายของยุงพาหะนำโรคในพื้นที่บ้านกูเบสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่ใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมประชากรยุงพาหะนำโรคในจังหวัดนราธิวาสให้มีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

จริยธรรมการวิจัยในสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการอย่างเคร่งครัดตามแนวทางการดูแลและการใช้สัตว์เพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา สำหรับขั้นตอนการเก็บรวบรวมและการกระทำต่าง ๆ กับตัวอย่างได้รับการพิจารณาและอนุมัติ โดยคณะกรรมการการดูแลและการใช้สัตว์เพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา (หมายเลขจริยธรรมในสัตว์เพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์: IACUC 64-004/2021)

การรวบรวมยุงพาหะในภาคสนาม

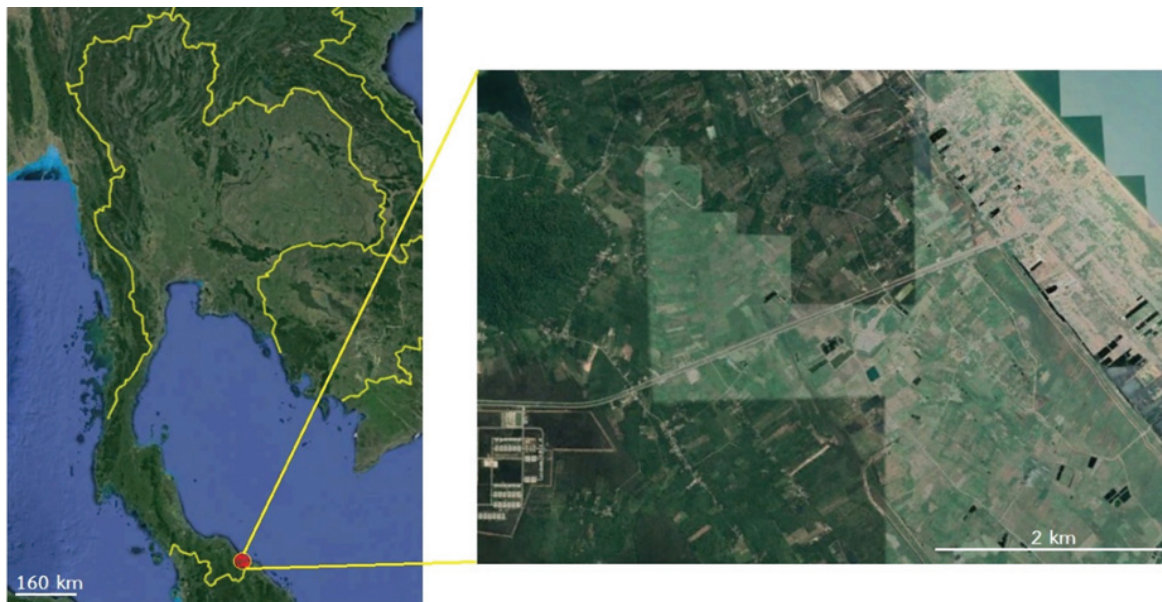
พื้นที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกพื้นที่เจาะจง คือ บ้านกูเบสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส (6°21'19.1"N, 101°53'41.8"E) สภาพแวดล้อมของบ้านกูเบสาลอเป็นพื้นที่ชนบท อยู่ใกล้กับพื้นที่เขตเมืองและห่างจากชายฝั่งทะเล ประมาณ 2-3 กิโลเมตร โดยในเขตพื้นที่บ้านกูเบสาลอยังคงมีต้นไม้ ป่าที่สมบูรณ์ บึงและหนองน้ำ กระจายตัวอยู่ทั่วไปในพื้นที่ บ้านเรือนของประชาชนมีอาณาเขตอยู่ห่างกันในแต่ละหลังคาเรือน และแต่ละหลังมักมีการเลี้ยงวัวและแพะ เพื่อนำไปขายเมื่อโตเต็มที่ (ภาพที่ 1, ภาพที่ 2A และ 2B) นอกจากนี้ยังเป็นพื้นที่การพบผู้ป่วยโรคติดต่อที่นำโดยยุงในพื้นที่

การรวบรวมยุงพาหะในภาคสนามในการศึกษานี้ใช้กับดักยุง BG-Pro CDC-style trap (BioGents, Regensburg, Germany) จำนวน 8 กับดัก ถูกนำมาใช้คู่กับตลับกลิ่นล่อยุง BG-lure cartridge (BioGents, Regensburg, Germany) และน้ำแข็งแห้ง (solid carbon dioxide) เพื่อใช้ในการดึงดูดยุงให้เข้ามาหากับดัก (ภาพที่ 2C) ซึ่งกับดักชนิดนี้เป็นกับดักในการวิจัยที่ถูกออกแบบมาใช้ในการงานภาคสนาม พกพาได้ง่ายในพื้นที่ห่างไกล

บ้านจำนวน 4 หลัง ถูกคัดเลือกออกผ่านการสุ่มและติดตั้งกับดักหลังละ 2 เครื่องในพื้นที่บ้าน สำหรับเกณฑ์การคัดเลือกบริเวณที่ติดตั้งกับดัก ประกอบด้วย (1) ต้องเป็นบริเวณพื้นที่ที่ไม่โดนฝนหรือโดนเพียงเล็กน้อย เพื่อป้องกันกับดักที่อาจได้รับความเสียหายในระหว่างการรวบรวม และ (2) ต้องไม่เป็นสถานที่ที่ผ่านการฉีดพ่นสารเคมีฆ่าแมลงในช่วง 1 อาทิตย์ที่ผ่านมา โดยกับดักทั้งหมดถูกติดตั้งในพื้นที่บ้านกูเบสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส ในช่วงเดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม 2565 ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูร้อนและต้นฤดูฝน รวมทั้งเป็นช่วงที่เริ่มมีการระบาดของโรคติดต่อที่นำโดยยุงเกิดขึ้น (กองโรคติดต่อมาโดยแมลง, 2565) การรวบรวมยุงพาหะดำเนินการเป็นระยะเวลารวมทั้งสิ้น 25 วัน ทำการดักจับในเวลากลางคืน ตั้งแต่เวลา 18.00 ถึงเวลา 06.00 รวมทั้งหมด 12 ชั่วโมง โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยของช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง คือ 29.93 องศาเซลเซียส และ

ความชื้นในอากาศเฉลี่ย คือ 73.62% เมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างจากก้นดักในทุก ๆ เช้า แล้วนำถุงไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าตัวอย่างที่ยังคงมีชีวิต แล้วทำการบันทึกข้อมูลของถุงเก็บ

ประกอบด้วย หมายเลขกับดัก วันที่ เดือน จากนั้นตัวอย่างถูกนำส่งมาที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา เพื่อดำเนินการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาต่อไป



ภาพที่ 1 พื้นที่การศึกษา บ้านนุเบสาโล ตำบลละดูอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส แผนที่นำมาจาก Google Earth Pro v 7.1.8 (<https://earth.google.com>)



ภาพที่ 2 สภาพพื้นที่ที่ติดตั้งกับดัก (A และ B) และกับดักที่ใช้ในการรวบรวมยุงตัวอย่าง (C)

การจำแนกยุงด้วยวิธีมาตรฐานทางสัตววิทยา

เมื่อตัวอย่างยุงมาถึงห้องปฏิบัติการ คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการจำแนกยุงด้วยวิธีมาตรฐานทางสัตววิทยาทันที เริ่มจากคัดแยกเพศของยุง โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ยุงเพศเมียเท่านั้น เนื่องจากเพศผู้ไม่ถูกจัดว่าเป็นพาหะนำโรค หลังจากนั้น ยุงเพศเมียทั้งหมดได้ถูกมาจำแนกชนิดอย่างระมัดระวัง โดยการตรวจสอบเอกลักษณ์และอวัยวะสำคัญภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเทียบกับคู่มือทางสัตววิทยาของยุงในประเทศไทย จำนวน 6 เล่ม

คู่มือทางสัตววิทยาของยุงในประเทศไทย ที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย

1. คู่มือจำแนกชนิดยุงทางสัตววิทยาของยุงในประเทศไทยเบื้องต้น (Rattanaarithikul et al., 2005b)
2. คู่มือจำแนกชนิดยุงทางสัตววิทยาของยุงในสกุล *Culex* และ *Lutzia* ในประเทศไทย (Rattanaarithikul et al., 2005a)
3. คู่มือจำแนกชนิดยุงทางสัตววิทยาของยุงในสกุล *Aedeomyia*, *Ficalbia*, *Mimomyia*, *Hodgesia*, *Coquillettia*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ในประเทศไทย (Rattanaarithikul et al., 2006b)
4. คู่มือจำแนกชนิดยุงทางสัตววิทยาของยุงในสกุล *Anopheles* ในประเทศไทย (Rattanaarithikul et al., 2006a)
5. คู่มือจำแนกชนิดยุงทางสัตววิทยาของยุงในสกุล *Orthopodomyia*, *Kimia*, *Malaya*, *Topomyia*, *Tripteroides* และ *Toxorhynchites* ในประเทศไทย (Rattanaarithikul et al., 2007)
6. คู่มือจำแนกชนิดยุงทางสัตววิทยาของยุงในเผ่า Aedini ในประเทศไทย (Rattanaarithikul et al., 2010)

การวิเคราะห์

คำนวณค่าร้อยละของยุงแต่ละชนิดที่รวบรวมมาได้ รวมทั้งคำนวณค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ (species diversity index) โดยใช้รูปแบบการประเมิน Shannon-Wiener diversity index ตามวิธีของ Washington (Washington 1984) และคำนวณค่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์ (species evenness)

ตามวิธีของ Nolan and Callahan (2006) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

สูตรคำนวณความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ (Shannon-Wiener diversity index)

$$H' = - \sum_{i=1}^s (P_i)(\ln P_i)$$

แทนค่า

H' คือ ค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ (species diversity index)

S คือ จำนวนชนิด (number of species)

P_i คือ สัดส่วนระหว่างจำนวนยุงของชนิดพันธุ์นั้น ๆ ต่อจำนวนยุงของทุกชนิดพันธุ์รวมกัน

สูตรคำนวณความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์ (species evenness)

$$J' = H' / \ln S$$

แทนค่า

J' คือ ความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์ (species evenness)

H' คือ ค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ (species diversity index)

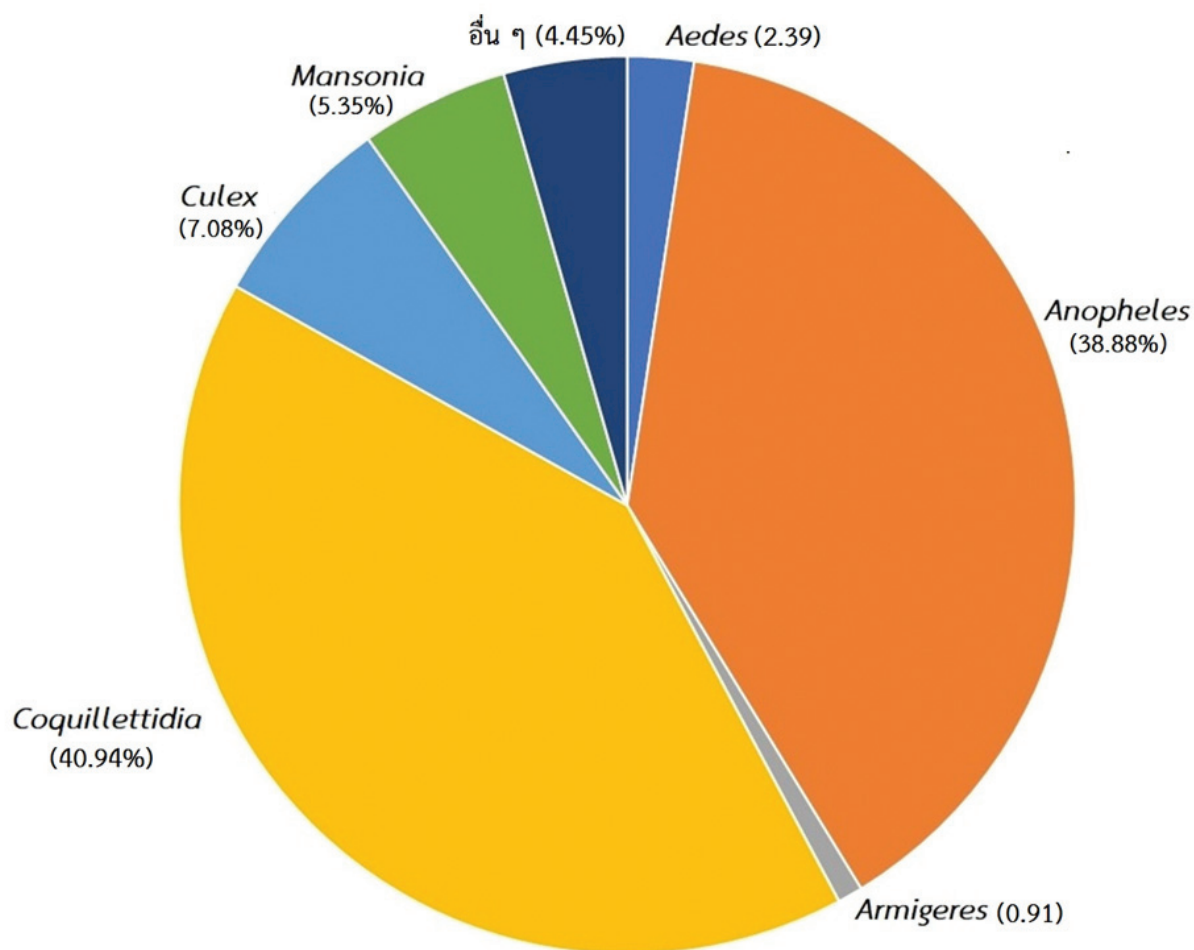
S คือ จำนวนชนิด (number of species)

ผลการวิจัย

ผลการสำรวจยุงในพื้นที่บ้านกุแบสาธิต ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส ในช่วงเดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม 2565 จำนวน 25 วัน โดยยุงที่รวบรวมได้มีทั้งสิ้น 1,214 ตัว จำแนกออกเป็น 26 ชนิด (species) ใน 10 สกุล (genus) ซึ่งทั้ง 10 สกุลที่พบ ประกอบด้วย *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Neomelania*, และ *Uranotaenia* ในการสำรวจครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยรวบรวมยุงในสกุล *Coquillettia* ได้มากที่สุด จำนวน 497 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 40.94 ของจำนวนยุงทั้งหมด) รองลงมา คือ ยุงในสกุล

Anopheles จำนวน 472 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 38.88) อยู่ในสกุล *Culex* จำนวน 86 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 7.08) อยู่ในสกุล *Mansonia* จำนวน 65 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 5.35) อยู่ในสกุล *Neomelaniconion* จำนวน 40 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 3.29) อยู่ในสกุล *Aedes* จำนวน 29 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 2.39) อยู่ใน

สกุล *Armigeres* จำนวน 11 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 0.91) อยู่ในสกุล *Uranotaenia* จำนวน 6 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 0.49) อยู่ในสกุล *Mimomyia* จำนวน 5 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 0.41) และอยู่ในสกุล *Aedeomyia* จำนวน 3 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 0.25) ตามลำดับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 สัดส่วนของยุงในสกุลต่าง ๆ ที่รวบรวมได้ในพื้นที่บ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส

จากการคำนวณค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุง พบว่าบ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส มีค่าอยู่ที่ 2.139 และมีค่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์ อยู่ที่ 0.657 โดยยุงชนิดที่พบมากที่สุดในการสำรวจครั้งนี้ ได้แก่ ยุงก้นปล่อง *An. sudaicus* s.l. จำนวน 388 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 31.96) รองลงมา คือ *Cq. ochracea* จำนวน 256 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 21.09) *Cq. crassipes*

จำนวน 222 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 18.29) *Cx. gelidus* จำนวน 51 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 4.20) และ *Ma. bonneae* จำนวน 45 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 3.71) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงที่รวบรวมได้ในพื้นที่บ้านกุแบสาธอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส

ชนิดของยุง (Species)	จำนวน (ตัว)	ร้อยละ	ความสำคัญทางการแพทย์ (พาหะนำโรค)	ความสำคัญทางสัตวแพทย์ (พาหะนำโรค)
Genus: Aedes				
<i>Ae. albopictus</i>	5	0.41	Dengue/chikungunya/ Zika	Dirofilariasis
<i>Ae. vexans</i>	24	1.98	ไม่มีรายงาน	Dirofilariasis
Genus: Aedeomyia				
<i>Ad. catacticta</i>	3	0.25	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
Genus: Anopheles				
<i>An. annularis</i>	5	0.41	Malaria	ไม่มีรายงาน
<i>An. barbirostris</i> group	10	0.82	Malaria/JE	Monkey malaria/ Lymphatic filariasis/ Buffalo malaria
<i>An. sundaicus</i> s.l.	388	31.96	Malaria	ไม่มีรายงาน
<i>An. jamesii</i>	3	0.25	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
<i>An. nivipes</i>	3	0.25	Malaria	ไม่มีรายงาน
<i>An. tessellatus</i>	40	3.29	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
<i>An. kochi</i>	6	0.49	Malaria	ไม่มีรายงาน
<i>An. pollicaris</i>	7	0.58	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
<i>An. umbrosus</i> group	10	0.82	Malaria	ไม่มีรายงาน
Genus: Armigeres				
<i>Ar. subalbatus</i>	11	0.91	Lymphatic filariasis	Dirofilariasis/ Lymphatic filariasis
Genus: Coquillettidia				
<i>Cq. crassipes</i>	222	18.29	Lymphatic filariasis	Cardiofilaria/ Dirofilariasis
<i>Cq. ochracea</i>	256	21.09	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
<i>Cq. nigrosignata</i>	19	1.57	ไม่มีรายงาน	Dirofilariasis
Genus: Culex				
<i>Cx. gelidus</i>	51	4.20	JE	Dirofilariasis
<i>Cx. nigropunctatus</i>	8	0.66	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	12	0.99	Lymphatic filariasis/JE	Dirofilariasis
<i>Cx. vishnui</i> subgroup	15	1.23	JE	Dirofilariasis/ Lymphatic filariasis

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงที่รวบรวมได้ในพื้นที่บ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส (ต่อ)

ชนิดของยุง (Species)	จำนวน (ตัว)	ร้อยละ	ความสำคัญทางการแพทย์ (พาหะนำโรค)	ความสำคัญทางสัตวแพทย์ (พาหะนำโรค)
Genus: <i>Mansonia</i>				
<i>Ma. bonneae</i>	45	3.71	Lymphatic filariasis	Dirofilariasis
<i>Ma. indiana</i>	12	0.99	Lymphatic filariasis	Dirofilariasis
<i>Ma. uniformis</i>	8	0.66	Lymphatic filariasis	Cardiofilaria/ Dirofilariasis/ Lymphatic filariasis
Genus: <i>Mimomyia</i>				
<i>Mi. aurea</i>	5	0.41	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน
Genus: <i>Neomelanicion</i>				
<i>Ne. lineatopenne</i>	40	3.29	ไม่มีรายงาน	Rift Valley fever
Genus: <i>Uranotaenia</i>				
<i>Uranotaenia</i> spp.	6	0.49	ไม่มีรายงาน	Avian malaria
รวมทั้งหมด	1,214	100		
Species diversity index	2.139			
Species Evenness	0.657			

*ความสำคัญทางการแพทย์ อ้างอิงตามรายงานของ Rattarithikul et al. (2005b) และ Lai et al. (2020) ขณะที่ความสำคัญทางสัตวแพทย์ อ้างอิงตามรายงานของ Hendrix et al. (1980), Klinkaewnarong et al. (1985), Atmosoedjono et al. (1993), Azari-Hamidian et al. (2019), Muslim et al. (2013), Vinnie-Siow et al. (2022) และ Nugraheni et al. (2022)

อภิปรายผล

การศึกษาความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคในบ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส ในครั้งนี้ พบยุงทั้งสิ้น 1,214 ตัว จำแนกออกเป็น 26 ชนิด ใน 10 สกุล โดยยุงพาหะนำโรคที่พบมากที่สุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ *An. sudaicus* s.l., *Cq. ochracea*, *Cq. crassipes*, *Cx. gelidus* และ *Ma. bonneae*

ยุงก้นปล่อง *An. sudaicus* s.l. เป็นชนิดพันธุ์ที่ถูกพบมากที่สุดในการศึกษานี้ แม้ว่าในประเทศไทยมีการรายงานยุงในกลุ่ม *Sundaicus* complex เพียงชนิดเดียว คือ *An. epiroticus* แต่ประวัติของประชากรในพื้นที่นี้ยังไม่เคยมีการยืนยันชนิดด้วยเทคนิคอนุชีววิทยา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงระบุเป็น

An. sudaicus s.l. ทดแทน โดยยุงชนิดนี้เป็นพาหะรองของโรคมาลาเรีย จากการสำรวจในพื้นที่จังหวัดระยองที่ผ่านมาของ Sumruayphol et al. (2010) พบการติดเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่อง *An. epiroticus* จำนวน 9 ตัวจาก 926 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 0.97) โดยพบว่า 6 ตัวเป็นการติดเชื้อ *P. falciparum* และ 3 ตัวเป็นการติดเชื้อ *P. vivax* นอกจากนี้ยุงชนิดนี้มีความสัมพันธ์ต่อสภาพแวดล้อมที่จำเพาะ พบได้ทั่วไปตามพื้นที่ชายฝั่งทะเล เนื่องจากมีแหล่งเพาะพันธุ์เป็นแหล่งน้ำกร่อย (Chaiphongpachara and Sumruayphol 2017) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ในพื้นที่ของบ้านกุเบาสาลอ ซึ่งอยู่ใกล้กับชายฝั่งทะเล ประมาณ 2-3 กิโลเมตร สำหรับการควบคุมยุงชนิดนี้ทำได้ยาก เนื่องจากมีแหล่งเพาะพันธุ์ในธรรมชาติที่ยาก

ต่อการเข้าไปจัดการ อย่างไรก็ตาม ประชาชนสามารถป้องกันตัวเองได้ โดยการทายากันยุงหรือใช้มุ้งชุบสารเคมี

ยุง *Cq. ochracea* และ *Cq. crassipes* เป็นยุงที่พบมากเป็นอันดับ 2 และ 3 ในพื้นที่บ้านกุเบาสาลอ ยุงในสกุล *Coquillettidia* มีเอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากยุงชนิดอื่น ๆ อย่างชัดเจน โดยเป็นยุงขนาดกลางและมีสีเหลืองทองชีววิทยาคล้ายคลึงกับยุงในสกุล *Mansonia* (ยุงเสือ) ที่ในระยะตัวอ่อนต้องเจาะพืชน้ำเพื่อหายใจ (Chiang et al., 1986) ปกติแล้วยุงในกลุ่มนี้มักพบเห็นได้ยาก แต่การศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้พบยุง *Coquillettidia* เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจเนื่องจากสภาพสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการดำรงชีวิต เช่น มีพืชน้ำที่จำเพาะกระจายตัวอยู่มากในพื้นที่ หรือปัจจัยคุณภาพของแหล่งน้ำที่เอื้อต่อการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อสรุปถึงสิ่งนี้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *Cq. crassipes* เป็นพาหะของพยาธิฟิลาเรียหลายชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ (Klinkaewnarong et al., 1985; Chiang et al., 1986; Azari-Hamidian et al., 2019) แตกต่างจาก *Cq. ochracea* ที่ยังไม่มีการรายงาน สำหรับการควบคุมยุงในกลุ่มนี้สามารถดำเนินการได้ โดยการควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกน้ำ โดยเฉพาะแหล่งที่มีพืชน้ำ เช่น การกลบถมและทำลายวัชพืช รวมทั้งการลดการสัมผัสระหว่างคนและยุง เช่น การใส่เสื้อผ้าให้มิดชิด โดยเสื้อผ้าที่ใส่ควรเนื้อหนา เมื่อจำเป็นที่ต้องเข้าไปในพื้นที่เสี่ยง เช่น พื้นที่สวน (Rattanarithikul et al., 2005a)

ขณะที่ยุงรำคาญ *Cx. gelidus* ที่พบเป็นอันดับ 4 ได้รับการยอมรับว่าเป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis vectors) มาสู่มนุษย์ รวมทั้งมีสัตว์เป็นแหล่งรังโรค (Ramesh et al., 2015) นอกจากนี้ยังเป็นพาหะต้องสงสัยของพยาธิ *D. immitis* ซึ่งเป็นสาเหตุของ *Dirofilariasis* ในสัตว์เลี้ยง โดยยุงชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์ เป็นแหล่งน้ำรอบคอกสัตว์ที่มีมูลสัตว์ปะปน นาข้าว คุน้ำ ทุ่งหญ้ารอบนาข้าว และคอกสัตว์ ดังนั้นการควบคุมยุงชนิดนี้ สามารถทำได้โดยการปรับสภาพแวดล้อมไม่ให้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น การทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ โดยการกลบถมหลุมดินหรือการเร่งระบายน้ำออกจากบริเวณรอบคอกสัตว์ (Rattanarithikul et al., 2005a)

ยุงเสือ *Ma. bonneae* มีรายงานการพบมากในภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำที่มีสภาพเป็นกรด ทำให้พบได้เพียงบางพื้นที่ (Apiwathnasorn et al., 2006) ยุงชนิดนี้มีรายงานว่า เป็นพาหะของพยาธิ *lymphatic filariasis* หลายหลายชนิด ซึ่งทำให้เกิดอันตรายได้ทั้งมนุษย์และสัตว์ เช่น พยาธิ *Brugia malayi* ที่เป็นสาเหตุของโรค *filariasis* ในมนุษย์ และพยาธิ *D. immitis*, *Brugia pahangi* และ *Cardiofilaria* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรค *filariasis* ในสัตว์ (Atmosoedjono et al., 1993) สำหรับการควบคุมยุงเสือ คล้ายกับการควบคุมประชากรยุงในสกุล *Coquillettidia* คือ การปรับแหล่งเพาะพันธุ์ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกน้ำ โดยการกำจัดพืชน้ำ (Rattanarithikul et al., 2005a)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ประเมินค่าดัชนีความหลากหลายและค่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์ โดยผลการคำนวณ คือ 2.139 และ 0.657 ตามลำดับ โดยผลการคำนวณเหล่านี้ถูกนำไปเทียบกับเกณฑ์ของ Shannon-Weiner Index ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ario et al. (2020) ที่ระบุไว้ว่า ค่าความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ในพื้นที่ น้อยกว่า 1 แสดงว่าความหลากหลายทางชนิดพันธุ์อยู่ในระดับต่ำ ค่าอยู่ในช่วง 1-2.9 แสดงว่าความหลากหลายทางชนิดพันธุ์อยู่ในระดับปานกลาง และถ้ามีค่ามากกว่า 3 แสดงว่าความหลากหลายทางชนิดพันธุ์อยู่ในระดับสูง ขณะที่ค่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์ในพื้นที่ น้อยกว่า 0.4 แสดงว่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์อยู่ในระดับต่ำ ค่าอยู่ในช่วง 0.4-0.59 แสดงว่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์อยู่ในระดับปานกลาง และถ้ามีค่ามากกว่า 0.6 แสดงว่าความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์อยู่ในระดับสูง ดังนั้นจึงสรุปผลการสำรวจครั้งนี้ในเบื้องต้นได้ว่า บ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส มีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงอยู่ในระดับปานกลางและมีความสม่ำเสมอของชนิดพันธุ์อยู่ในระดับสูง โดยค่าเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรยุงพาหะนำโรคเมื่อดำเนินมาตรการการควบคุมพาหะ

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะในพื้นที่บ้านกุเบาสาลอ ตำบลกะลุวอ

อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส กับพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศไทยที่มีรายงาน พบว่า พื้นที่บ้านกูแบสาโล มีความหลากหลายมากกว่าพื้นที่ชายฝั่งทะเลในจังหวัดสมุทรสงคราม (ดัชนีความหลากหลาย = 0.94) (Chaiphongpachara and Sumruayphol 2017) และพื้นที่ป่า พื้นที่ห้วยของป่าขนาดเล็ก พื้นที่นาข้าว พื้นที่ชานเมือง และพื้นที่เมืองในจังหวัดนครนายก (ดัชนีความหลากหลาย = 1.47, 1.59, 1.21, 1.80, และ 2.00 ตามลำดับพื้นที่) (Thongsripong et al., 2013) ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าพื้นที่บ้านกูแบสาโล จังหวัดนราธิวาส มีสภาพพื้นที่เหมาะกับการมีอยู่ของยุงหลายชนิด อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่มีความหลากหลายเมื่อเทียบกับพื้นที่อื่น ๆ ที่กล่าวมา ทั้งระบบนิเวศชายฝั่งทะเล ระบบนิเวศป่า และระบบนิเวศกึ่งชุมชน สอดคล้องกับผลการวิจัยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติคอกยอินทนนท์ ในจังหวัดเชียงใหม่ (ดัชนีความหลากหลาย = 3.81) (Srisuka et al., 2022) และพื้นที่ชนบทในจังหวัดนครนายก (ดัชนีความหลากหลาย = 2.30) (Thongsripong et al., 2013) ที่มีสภาพแวดล้อมที่หลากหลายและความสมบูรณ์ของพื้นที่ป่าไม้ ซึ่งพบว่ามีค่าความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงสูงกว่าพื้นที่บ้านกูแบสาโล จังหวัดนราธิวาส

สรุป

ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปใช้ควบคุมและเฝ้าระวังโรคติดต่อที่นำโดยยุง อย่างไรก็ตามข้อมูลเหล่านี้ มักถูกละเลยและไม่ได้ให้ความสำคัญ ทำให้เมื่อเกิดการระบาดของโรค จึงมักกระทำการควบคุมโรคได้อย่างล่าช้า การศึกษานี้ได้ทำการสำรวจยุงชนิดพันธุ์ต่าง ๆ ในบ้านกูแบสาโล ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส และพบว่าความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงอยู่ในระดับปานกลาง โดยมียุงหลายชนิดที่มีรายงานว่า เป็นพาหะนำโรคมานุษย์และสัตว์หลายชนิด กระจายตัวอยู่ในพื้นที่ ดังนั้นผลของการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมยุงพาหะนำโรคในพื้นที่บ้านกูแบสาโล ตำบลกะลุวอ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส อีกทั้งยังใช้เป็นฐานข้อมูลให้แก่ประชาชนรับรู้ถึงโอกาสเสี่ยง

ที่เกี่ยวข้องกับโรคติดต่อที่นำโดยยุง สำหรับประชาชนสามารถลดความเสี่ยงของโรคเหล่านี้ โดยเริ่มจากการปรับสภาพแวดล้อมในพื้นที่เขตบ้านของตน ไม่ให้มีแหล่งเพาะพันธุ์ของยุง หรือก่อนจะเข้าพื้นที่สวนหรือป่า ควรใส่เสื้อผ้ามิดชิด หรือทาโลชั่นป้องกันยุง ฉีดสเปรย์ก่อนทุกครั้ง เพื่อป้องกันตัวเองจากการเข้ามกัดของยุง รวมทั้งควรมีการป้องกันสัตว์เลี้ยงของตน เช่น การจัดการฟาร์ม โดยติดตั้งหลอดไฟไล่แมลง หรือ ใช้มุ้งป้องกัน

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษารังหน้า ควรมีการเพิ่มช่วงเวลาในการเก็บและแบ่งเป็นช่วงฤดูกาล หรือทุกเดือน โดยอาจวางแผนในการวางกับดักเป็น 1 สัปดาห์ต่อเดือน เพื่อให้เห็นความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคตามฤดูกาล อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้ได้ดักจับในช่วงเวลา 18.00-6.00 น. ทำให้ได้เพียงยุงที่ออกหากินในเวลากลางคืน จึงควรมีการดักจับเพิ่มเติมในช่วงเวลากลางวัน นอกจากนี้การศึกษาด้านความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของยุงในอนาคต ควรมีการนำเทคนิคสมัยใหม่และมีประสิทธิภาพเข้ามาช่วยในการจำแนกยุงในพื้นที่อื่น ๆ ต่อไปควบคู่กับการจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา เพื่อให้ข้อมูลชนิดพันธุ์ของยุงเหล่านั้นแม่นยำและชัดเจนมากยิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยพบยุงหลายชนิดที่จำแนกได้ยากและมักผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นเพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลการศึกษา คณะผู้วิจัยจึงจำแนกยุงเหล่านั้น ไว้เป็นกลุ่มแทน เช่น *An. sondaicus* s.l., *An. barbirostris* group, *An. umbrosus* group, *Cx. vishnui* subgroup และ *Uranoteania* spp.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทาที่สนับสนุนด้านการศึกษา และโอกาสในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กองโรคติดต่อฯ โดยแมลง. สถานการณ์โรคติดต่อฯ โดยแมลง. 2565 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2565]. เข้าถึงจาก: <https://datastudio.google.com/embed/reporting/a07ebb2a-e458-4aee-8284-437cd48edcef/page/eeR0C>.
- กรมอุตุนิยมวิทยา. ภูมิอากาศจังหวัดนราธิวาส. 2565 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2565]. เข้าถึงจาก: <http://climate.tmd.go.th/data/province/ใต้ฝั่งตะวันออก/ภูมิอากาศนราธิวาส.pdf>.
- Apiwathnasorn C, Samung Y, Prummongkol S, Asavanich A, Komalamisra N, McCall P. Bionomics studies of *Mansonia* mosquitoes inhabiting the peat swamp forest. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006;37(2):272-8.
- Ario A, Damanik S, Rabbani A, Naibaho BD, Hasibuan AR, Hasibuan S, et al. Assessing the species diversity in non-conservation areas: A first systematically camera trapping survey in Batang Angkola Landscape, North Sumatra, Indonesia. Indones J Appl Environ Stud. 2020;1(2):14-24.
- Atmosoedjono S, Purnomo, Ratiwayanto S, Marwoto HA, Bangs MJ. Ecology and infection rates of natural vectors of filariasis in Tanah Intan, South Kalimantan (Borneo). Indonesia Bul Penelit Kesehat. 1993; 21(2):1-14.
- Auerswald H, Maquart PO, Chevalier V, Boyer S. Mosquito vector competence for Japanese encephalitis virus. Viruses. 2021;13(6):1154.
- Azari-Hamidian S, Norouzi B, Harbach RE. A detailed review of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Iran and their medical and veterinary importance. Acta Trop. 2019;194:106-22.
- Boonklong O, Bhumiratana A. Seasonal and geographical variation of dengue vectors in Narathiwat, South Thailand. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2016; 2016:8062360.
- Chaiphongpachara T, Sumruayphol S. Species diversity and distribution of mosquito vectors in coastal habitats of Samut Songkhram province, Thailand. Trop Biomed. 2017;34:524-32.
- Chansiri K, Khuchareontaworn S, Nopporn S. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. Mol Cell Probes. 2002;16(3):173-7.
- Chiang GL, Samarawickrema WA, Mak JW, Cheong WH, Sulaiman I, Yap HH. Field and laboratory observations on *Coquillettidia crassipes* in relation to transmission of *Brugia malayi* in Peninsular Malaysia. Ann Trop Med Parasitol. 1986;80(1): 117-21.
- Clayton AM, Dong Y, Dimopoulos G. The anopheles innate immune system in the defense against malaria infection. J Innate Immun. 2014;6(2):169-81.
- Famakinde D. Mosquitoes and the lymphatic filarial parasites: Research trends and budding roadmaps to future disease eradication. Trop Med Infect Dis. 2018;3(1):4.
- Genchi M, Rinaldi L, Venco L, Cringoli G, Vismarra A, Kramer L. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: A questionnaire study in Italy. Vet Parasitol. 2019;267:26-31.
- Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory. 2022 [cited 2022 Nov 10]. Available from: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>.
- Hendrix CM, Bemrick WJ, Schlotthauer JC. Natural transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes vexans*. Am J Vet Res. 1980;41(8):1253-5.
- Klinkaewnarong W, Chiang GL, Eng KL. Studies of *Coquillettidia (Coquillettidia) crassipes* (Vanderwulp, 1881) in relation to transmission of *Cardiofilaria nilesi*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1985;16(1):10-4.

- Lai Z, Zhou T, Liu S, Zhou J, Xu Y, Gu J, et al. Vertical transmission of zika virus in *Aedes albopictus*. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(10):e0008776.
- Muslim A, Fong MY, Mahmud R, Lau YL, Sivanandam S. *Armigeres subalbatus* incriminated as a vector of zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in suburban Kuala Lumpur, Peninsular Malaysia. Parasit Vectors. 2013;6:219.
- Ng'Habi KR, Knols BG, Lee Y, Ferguson HM, Lanzaro GC. Population genetic structure of *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* in a malaria endemic region of southern Tanzania. Malar J. 2011;10:289.
- Nolan K, Callan J. Beachcomber biology: The Shannon-Weiner species diversity index. In: Proc. Workshop ABLE. 2006;27:334-8.
- Nugraheni YR, Arnuphappasert A, Nguyen TT, Narapakdeesakul D, Nguyen HLA, Poofery J, et al. Myzorhynchus series of *Anopheles* mosquitoes as potential vectors of *Plasmodium bubalis* in Thailand. Sci Rep. 2022;12(1):5747.
- Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: The causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. BMJ Glob Health. 2018;3(Suppl1):e000530.
- Ramesh D, Muniaraj M, Philip Samuel P, Thenmozhi V, Venkatesh A, Nagaraj J, et al. Seasonal abundance & role of predominant Japanese encephalitis vectors *Culex tritaeniorhynchus* & *Cx. gelidus* theobald in Cuddalore district, Tamil Nadu. Indian J Med Res. 2015;142(Suppl1):S23-S29.
- Rattanarithikul R, Harbach RE, Harrison BA, Panthusiri P, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand V. Genera *Orthopodomyia*, *Kimia*, *Malaya*, *Topomyia*, *Tripteroides*, and *Toxorhynchites*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007;38(Suppl2):1-65.
- Rattanarithikul R, Harbach RE, Harrison BA, Panthusiri P, Coleman RE, Richardson JH. 2010. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. VI. Tribe Aedini. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41(Suppl1):1-225.
- Rattanarithikul R, Harbach RE, Harrison BA, Panthusiri P, Jones JW, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. II. Genera *Culex* and *Lutzia*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005a;36(Suppl2):1-97.
- Rattanarithikul R, Harrison BA, Harbach RE, Panthusiri P, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand IV. *Anopheles*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006a;37(Suppl2):1-128.
- Rattanarithikul R, Harrison BA, Panthusiri P, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. I. Background; geographic distribution; lists of genera, subgenera, and species; and a key to the genera. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005b;36(Suppl1):1-80.
- Rattanarithikul R, Harrison BA, Panthusiri P, Peyton EL, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand: III. Genera *Aedeomyia*, *Ficalbia*, *Mimomyia*, *Hodgesia*, *Coquillettidia*, *Mansonia*, and *Uranotaenia*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006b;37(Suppl1):1-85.
- Rivero A, Gandon S. Evolutionary ecology of avian malaria: Past to present. Trends Trends Parasitol. 2018;34(8):712-26.
- Rojanapanus S, Tothong T, Boondej P, Thammapalo S, Khuanyoung N, Santabutr W, Et al. How Thailand eliminated lymphatic filariasis as a public health problem. Infect Dis Poverty. 2019;8(1):38.
- Saifi MA, Alyousif MS, Amoudi MA. Anopheline species and their *Plasmodium* infection status in Aligarh, India. Saudi J Biol Sci. 2016;23(5):649-53.

- Simonetti AB. The biology of malarial parasite in the mosquito - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(5):519-41.
- Srisuka W, Sulin C, Sommitr W, Rattanaarithikul R, Aupalee K. Mosquito (Diptera: Culicidae) diversity and community structure in Doi Inthanon National Park, Northern Thailand. Insects. 2022;13(9):814.
- Stokes JE, Darpel KE, Gubbins S, Carpenter S, Fernández de Marco MDM, Hernández-Triana LM, et al. Investigation of bovine ephemeral fever virus transmission by putative dipteran vectors under experimental conditions. Parasit Vectors. 2020; 13(1):597.
- Sumruayphol S, Apiwathnasorn C, Komalamisra N, Ruangsittichai J, Samung Y, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P. Bionomic status of *Anopheles epiroticus* Linton & Harbach, a coastal malaria vector, in Rayong Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41:541-7.
- Sumruayphol S, Chaiphongpachara T, Samung Y, Ruangsittichai J, Cui L, Zhong D, et al. Seasonal dynamics and molecular differentiation of three natural *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) of the Maculatus group (Neocellia series) in malaria hotspot villages of Thailand. Parasit Vectors. 2020;13(1):574.
- Thongsripong P, Green A, Kittayapong P, Kapan D, Wilcox B, Bennett S. Mosquito vector diversity across habitats in central Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(10):e2507.
- Vinnie-Siow WY, Low VL, Tan TK, Wong ML, Leong CS, Ahmad NW, et al. Identification of potential vectors of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* (Spirurida: Filariidae): First observation of infective third-stage larva of *B. pahangi* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Pathog Glob Health. 2022;116(6):356-64.
- Washington HG. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. Water Res. 1984;18:653-94.
- Wongkamchai S, Nochote H, Foongladda S, Dekumyoy P, Thammapalo S, Boitano JJ, et al. A high resolution melting real time PCR for mapping of filaria infection in domestic cats living in brugian filariosis-endemic areas. Vet Parasitol. 2014;201(1-2):120-7.
- Yeo G, Wang Y, Chong SM, Humaidi M, Lim XF, Mailepessov D, et al. Characterization of fowlpox virus in chickens and bird-biting mosquitoes: A molecular approach to investigating avipoxvirus transmission. J Gen Virol. 2019;100(5):838-50.

The Effect of Duration of Weaning to Bone Markers and Bone Radiographic Diagnosis in Asian Elephant (*Elephas maximus*)

Petchroi Petchreing¹ Taweepoke Angkawanish² Somkiat Huaijantug³
Walasinee Sakcamduang³ Nlin Arya^{4*}

¹Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock, Ministry of Agriculture and Cooperatives,
Pathum Thani, Thailand.

²National Elephant Institute, Thailand Forest Industry Organization, Lampang, Thailand

³Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

⁴Department Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

*Corresponding author, E-mail address: nlin.arya@mahidol.edu

Received: 6 February 2023; Revised: 13 March 2023; Accepted: 16 March 2023

Abstract

Metabolic bone disease is an important bone disease in elephant calves. This study investigates the effect of the duration of weaning on osteocalcin and C-terminal telopeptide of type-1 collagen with the radiographic diagnosis of limbs of elephants. Ten elephant calves were set into two groups by their duration of weaning. The early-weaned group was weaned before 2 years old, and the normal-weaned group was weaned after 2 years old. Blood was collected from these two groups to measure bone makers and bone-related parameters. Meanwhile, a radiographic diagnosis was performed to evaluate the elephant bone. A statistically significant difference was found in the osteocalcin of the two groups. The Osteocalcin of the early-weaned group was higher than the normal-weaned group ($P = 0.028$). Other parameters were not significantly different. All radiographic diagnosis images of elephant bone were normal, with no lesion found. The significantly higher osteocalcin in early weaned elephant calves may indicate the high bone turnover in these elephants. This elevated bone turnover was not seen by radiographic diagnosis. Further investigations and adequate management should be carried out to confirm and prevent metabolic bone disease in early weaned elephant calves.

Keywords: elephant, bone marker, metabolic bone disease, radiographic diagnosis

การศึกษาผลของระยะเวลาหย่านมต่อสัญญาณโรคกระดูกของช้างเอเชีย ควบคู่กับการใช้รังสีวินิจฉัยกระดูก

เพชรร้อย เพชรเรียง¹ ทวีโชค อังควานิช² สมเกียรติ ห้วยจันทิก³ วลาสินี ตักดีคำดวง³ นลิน อารียา^{4*}

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย

²สถาบันคชบาลแห่งชาติในพระอุปถัมภ์ฯ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม จังหวัดลำปาง ประเทศไทย

³ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

⁴ภาควิชาปรีคลินิกและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: nlin.ary@mahidol.edu

Received: 6 February 2023; Revised: 13 March 2023; Accepted: 16 March 2023

บทคัดย่อ

โรคกระดูกเมตาโบลิคเป็นโรคกระดูกสำคัญที่พบได้ในลูกช้าง งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาผลของระยะเวลาหย่านมที่มีต่อสัญญาณโรคกระดูก ได้แก่ ออสติโอแคลซิน และซีเทอร์มินอล เทโลเปปไทด์ ไทป์วัน คอลลาเจน พร้อมกับการใช้รังสีวินิจฉัยกระดูกของลูกช้าง โดยแบ่งลูกช้างจำนวน 10 เชือกเป็น 2 กลุ่ม ตามระยะเวลาหย่านม ลูกช้างในกลุ่มหย่านมเร็วมีประวัติหย่านมก่อนสองปี และลูกช้างในกลุ่มหย่านมปกติมีประวัติหย่านมหลังสองปี ลูกช้างทุกตัวจะทำการเก็บเลือดเพื่อวัดสัญญาณโรคกระดูก และค่าชีวเคมีอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พร้อมกับการใช้รังสีวินิจฉัยกระดูกเพื่อประเมินภาวะกระดูกของลูกช้าง ผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของออสติโอแคลซินระหว่างช้างสองกลุ่มโดยที่กลุ่มหย่านมเร็วมีย่านมเร็วกว่ากลุ่มปกติ ($P = 0.028$) ส่วนค่าอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลของการใช้รังสีวินิจฉัยกระดูกของช้างทุกตัวพบว่าปกติ และไม่พบพยาธิสภาพใดๆ บนกระดูก ผลการเพิ่มขึ้นของออสติโอแคลซินนั้นอาจแสดงถึงภาวะการหมุนเวียนของกระดูกที่เพิ่มมากขึ้น ในลูกช้างกลุ่มที่หย่านมเร็วอาจมีการหมุนเวียนของกระดูกมากกว่าช้างกลุ่มที่หย่านมปกติ โดยที่ไม่สามารถถ่ายภาพทางรังสีเพื่อวินิจฉัยการหมุนเวียนของกระดูกที่เพิ่มขึ้นได้ จึงควรมีการวินิจฉัยเพิ่มเติม และมีการจัดการที่เหมาะสมเพื่อป้องกันโรคกระดูกในลูกช้างที่หย่านมเร็ว

คำสำคัญ: ช้าง สัญญาณโรคกระดูก โรคกระดูกเมตาโบลิค รังสีวินิจฉัย

Introduction

Metabolic bone disease is a prominent bone disease in elephant calves (Emanuelson 2006). Metabolic bone disease is caused by the imbalance of minerals which are essential for bone metabolism. The clinical signs of metabolic bone disease in elephant calves are disoriented limbs, varus-valgus, abnormal gait, etc. These signs usually present when elephant calves are 8-9 months old. Most of the elephant calves that presented with the clinical signs often died despite appropriate treatment (Emanuelson 2006). Early diagnosis and treatment prior to the presence of clinical signs are important ways to reduce the mortality rate.

Most of metabolic bone disease cases in elephant calf are related to nutritional etiology. Elephant calves may not show clinical signs of metabolic bone disease immediately, but in several years later they may develop the abnormal gait, other signs of metabolic bone disease, and die (Krajaysri et al., 2003). It is believed that early weaning may be related to the metabolic bone disease. There is a study in neonate rats that shows that three days early weaning neonate rats have lower bone mass, serum parathyroid hormone, osteocalcin and CTx but higher serum 25(OH)D compared to rats that have free access to the milk. This indicates breastfeeding is important to bone development and the underlying mechanism might involve alteration of parathyroid hormone and 25(OH)D activities. Normally, wild elephants are weaned at 3 to 5 years old, but in captive elephants, they usually wean at 2.5-3 years old. However, there are several reasons why elephant calves were early separated from their mother. For example, 1) the mother died 2) the owners want to sell the calf for money, etc.

There are multiple ways to diagnose bone diseases, for example, radiographic diagnosis including bone x-ray, computer tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) (West 2006; McIlwraith 2005; Greco et al., 2023). However, there are limitations of using radiographic diagnosis in elephants due to their sizeable skeletons. The radiographic diagnosis can only be used in a few parts of long bones, for example, the tibia, fibula, radius, and ulna (West 2006). Another limitation is the difficulties in the early diagnosis of bone disease. Bone lesions are often present in the severe stage of disease progression. Bone markers diagnosis is another method of bone diagnosis which has the advantage of early diagnosis of the imbalance of bone metabolism. Moreover, it can diagnose abnormalities of bone prior to the clinical signs developing (Kilgallon et al., 2008; Udomtanakunchai et al., 2019; Takehana et al., 2020).

Bone markers indicate bone metabolism. Bone metabolism has two major processes; bone synthesis and bone degradation where osteoblasts and osteoclasts play an important role in these two processes. Abnormalities in bone metabolism cause changes in bone markers. Osteocalcin, the bone synthesis marker, is used in some species such as horses (McIlwraith 2005; Kamr et al., 2020). C-terminal telopeptide of type-1 collagen (CTx), on the other hand, is a bone degradation marker that is used in humans (Glendenning et al., 2018).

The study of bone markers in Asian elephants is not widely distributed. There are only a few studies on normal middle-aged elephants (Kilgallon et al., 2008) and variation in health at different ages (Arya et al., 2015; Takehana et al., 2018). To date, the study about bone markers in early weaned elephant calves which are the risk group for metabolic bone disease is limited. We hypothesized that osteocalcin, CTx, and bone radiographic

images were different between early-weaned calves and normal ones.

Materials and Methods

Animals

Ten healthy Asian elephant calves at the age of 4-10 years were comprised in this study. The elephants were divided into two groups according to their age of weaning. Group A was a normal weaned and all of them were weaned at the age of more than two years old. Group B included elephant calves that were weaned before two years of age. All elephants were kept under the same condition, environment, and feed in the National

Elephant Institute (NEI), Lampang Province, Thailand. All elephants consume mainly grasses (80-90% of daily diet) and supplement with fruits such as bananas, sugar cane, and concentrate food. Gait and posture were evaluated by the veterinarian at the NEI. All elephants showed normal range of movement, walking stride, and no abnormality of limbs, including asymmetry, swelling, and atrophy noted. Elephant demographic data are shown in the Table 1. This study was approved by the Animal Care and Use Committee (Protocol No. MUVS-2013-19) of the Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand.

Table 1. Elephants demographic data.

No	Group*	Age		Sex	Body weight (Kg)	Leg (cm.)		Foot (cm.)	
		Year	Month			Circumference	Width	Circumference	Width
1	A	8	9	F	1720	105	18	69	14
2	A	5	11	M	1410	99	19	77	14
3	A	8	8	F	1710	109	17	72	15
4	A	3	10	F	935	85	14	66	12
5	A	5	11	M	895	86	16	61	12
6	B	3	0	M	480	75	15	51	11
7	B	3	0	M	430	76	14	54	11
8	B	5	0	F	345	**	13	47	12
9	B	3	0	F	850	84	16	63	12
10	B	6	0	F	1390	97	18	65	14

* group A is normal weaned elephant calves; group B is early weaned elephant calves.

** the leg of the calf number 8 is swollen and painful, the circumference and width cannot be measured at that time.

Radiographic diagnosis

Radiographic diagnostic procedures were undertaken following the assessment of gait and posture by a mobile x-ray machine (Hitachi® Sirius Star Mobile, Japan). The Centre of foreleg circumferences and the size of the foot were measured. Two planes of the radiographic image were taken in each elephant. The first plane was a lateromedial view of the left hind limb to assess the long bone. The other plane was dorsoplantar views of the phalange to evaluate growth plate adjustment. kV and mAs for the radiographic technique depended on the thickness of the limbs of each elephant.

All radiographic images were interpreted by Dr. Somkiet Huaijantug and Dr. Petchroi Petchrieng, for abnormal alignments of bones, pathological lesion of soft tissue, cartilage, bone parenchyma and ratio of cortex to bone diameter (CD ratio). The CD ratio was measured manually on computer software (eFilm Workstation® 3.4, Merge Healthcare, Hartland, WI 53029)

Blood parameters

Five millilitres of blood were collected from the auricular vein of each elephant into Plain tube for biochemistry profiles, EDTA tube for N-MID osteocalcin and CTx and heparin tube for haematological parameters. Blood samples were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes and plasma/serum was separated from blood cells and stored at -20°C. for analysis. All elephant blood samples were collected on the same day in the late morning time.

N-terminal mid-fragment osteocalcin (N-MID osteocalcin) and C-terminal telopeptide of type-1 collagen were measured by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA). Calcium, phosphorus, and ALP, CBC, total protein, BUN, and creatinine were measured using automate machine. Hematology and blood

biochemistry were analyzed within 24 hours after blood collection. N-MID Osteocalcin and NTx were sent to the lab and analysis within a week after blood collection.

Statistical analysis

Comparison of N-MID osteocalcin, CTx, calcium, phosphorus, calcium to phosphorus ratio, ALP, BUN, creatine, total protein, WBC counts, hematocrit, age, CD ratio, and leg circumference of the two groups were undertaken by Mann-Whitney U test. Correlations between all parameters are tested by the Spearman rank test. All statistical analysis was obtained by computerized statistical software, SPSS statistics version 17.0. Probabilities <0.05 were considered significant.

Results

Elephants

All elephants were bright, alert, and responsive from observation and physical examination. There were 3 males and 2 females in each group. The postures and gaits of every elephant were normal. The range of age of the two groups was 4-10 years. There was no significant difference in age between the two groups ($P = 0.07$, Table 2).

Radiographic diagnosis

There was neither lesion nor abnormal bone alignment found from the tibia and fibula radiographic images (Figure 1). Cartilages and joints on the phalange images were normal and no lesion was found. There was no difference between the tibia CD ratios of the two groups as shown in Table 2 ($P = 0.92$).

Table 2. Comparisons of age, osteocalcin, CTx, calcium, phosphorus, ALP, BUN, creatinine, total protein, WBC counts, hematocrit, CD ratio, and leg circumference between group A (normal weaned elephant calves) and group B (early weaned elephant calves). Statistical differences between groups were tested by Mann-Whitney U test. (Reference from Fowler and Mikota 2006).

Variable		25 th percentile	Median	75 th percentile	p-value	Reference range
Age (year)	Group A	5.50	7.00	9.00	0.07	-
	Group B	3.50	3.50	6.50		
Osteocalcin (ng/ml)	Group A	15.50	16.88	24.04	0.03	n/a
	Group B	25.39	31.03	39.21		
CTx (ng/ml)	Group A	2.61	4.11	4.58	0.35	n/a
	Group B	2.13	2.69	3.93		
ALP (U/L)	Group A	190	266	291	0.99	60-450
	Group B	218	229	234		
Calcium (mg/dl)	Group A	10.45	11.00	12.75	0.53	9-12
	Group B	10.45	10.60	11.10		
Phosphorus (mg/dl)	Group A	5.60	6.20	22.10	0.75	4-6
	Group B	6.15	6.50	6.75		
BUN (mg/dl)	Group A	5.50	7.00	9.00	0.14	5-20
	Group B	3.50	3.50	6.50		
Creatinine (mg/dl)	Group A	1.15	1.40	1.55	0.24	1-2
	Group B	0.80	1/20	1.50		
Total protein (g/d)	Group A	7.30	8.40	11.55	0.35	6-12
	Group B	6.50	7.60	7.90		
Haematocrit (%)	Group A	34.75	37.30	40.15	0.18	30-40
	Group B	38.60	33.50	39.45		
WBC (x 10 ⁹ /L)	Group A	15.65	20.20	25.20	0.60	10-18
	Group B	16.90	18.70	21.25		
CD ratio	Group A	0.32	0.43	0.72	0.92	
	Group B	0.35	0.42	0.54		
Leg circumference (cm.)	Group A	63.50	69.00	74.50	0.05	
	Group B	51.75	58.50	64.50		

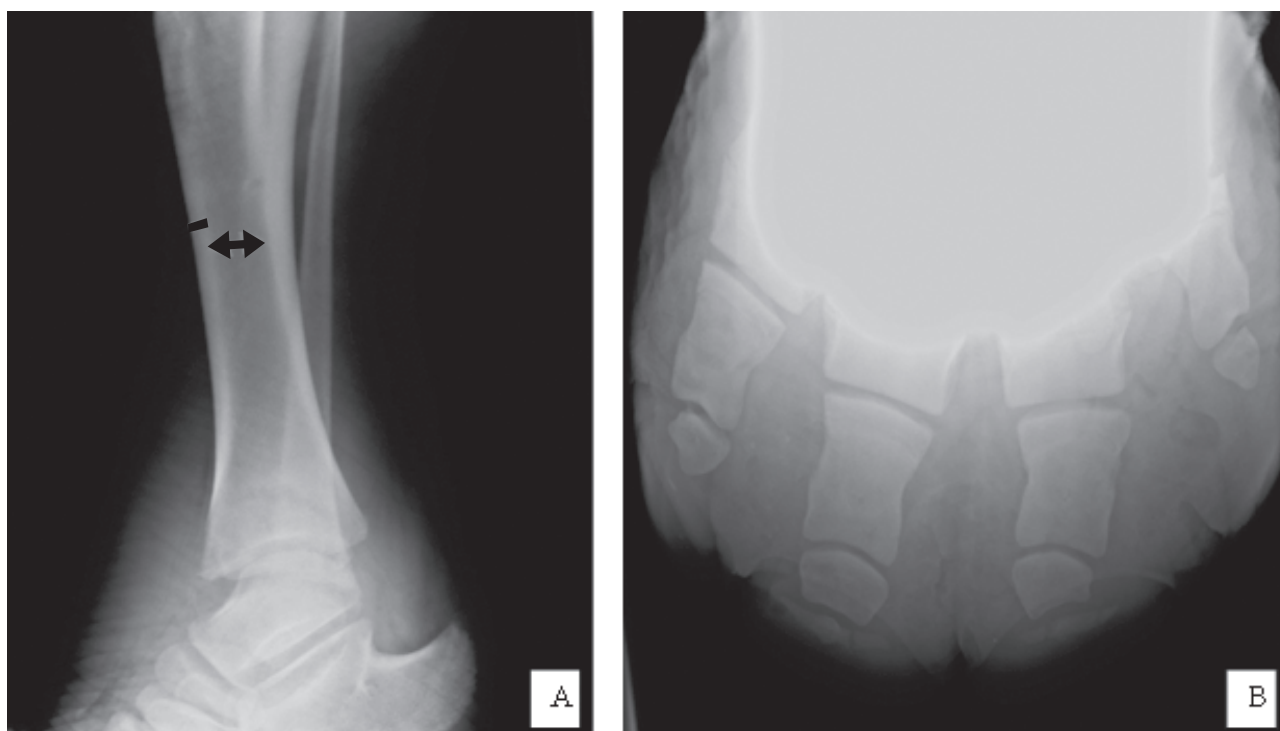


Figure 1. Radiographic images of tibia (A) and phalanges (B) of elephants. There was neither lesion nor abnormal bone alignment found from all radiographic images. In (A), the line indicates tibia cortex and two head arrow indicate diameter for the tibia.

Haematology and serum biochemistry

WBC count, hematocrit, BUN, creatinine, total protein, ALP, calcium and phosphorus, of all elephants were mostly within normal range. There was no significant difference in these variables between the two groups (Table 2).

Bone markers

N-MID Osteocalcin of group B (early weaned) was significantly higher than group A (normal weaned) ($P=0.028$). The data of the early-weaned group was all assembled in the same range as well as the normal group. However, one elephant from group A had an N-MID osteocalcin outlier high level (elephant number 2; N-MID osteocalcin = 30.46 mg/dl).

Correlations between parameters

The correlation between all parameters of 10 elephants was shown in the table 3. The correlations between age and leg circumference, total protein and BUN, total protein and creatinine, and phosphorus and calcium to phosphorus ratio, are naturally found. The strong correlation between age and creatinine (0.73; $P = 0.03$) along with creatinine and leg circumference (0.77; $P = 0.02$) was explained by the higher muscular mass of the elephant. The higher muscle mass can elevate creatinine levels. There was a strong reverse correlation between N-MID osteocalcin and BUN (-0.82 ; $P = 0.03$).

Discussion

Osteocalcin is a non-collagenous protein and is mainly secreted by osteoblasts. It is also secreted by megakaryocytes and adipocytes and excreted by the kidney. It has been reported to be an osteoblast-specific product (Allen 2003). The alteration of osteocalcin can be induced by many factors, including high bone turnover, absence from clearance, administration of some therapeutic agents, and collected time (circadian variation) etc. (Arya et al., 2015; Lee et al., 2000). In the present study, plasma N-MID osteocalcin was higher in early weaned elephant calves. This may indicate that higher bone turnover was likely to be involved with the elevation of plasma N-MID osteocalcin in these early-weaned elephant calves, since all elephants in our study were kept under the same environment and health condition. There are many metabolic bone diseases those cause the abnormality in bone turnover. Indeed, high bone turnover caused thinner bone in some bone diseases such as osteomalacia, rickets in children, and osteoporosis. These diseases were known to have higher osteocalcin from previous studies (Oginni et al., 1996; Brown et al., 2022). Further investigations are required to diagnose these diseases in early weaned elephant calves.

Generally, wild elephant calves are weaned gradually at 2-5 years old, whereas captive elephants are normally weaned at 2-2.5 years old (Emanuelson 2006). Therefore, we used two years old as the cut-point value to differentiate normal-weaned from early weaned elephant calves. The calves in the normal weaned group were mostly weaned at 2.5 years old, in accordance with the training program of Thai Elephant Conservation Center. All the early-weaned calves in the present study were confiscated from illegal properties and weaned at less than two years of age. The findings in the present study implied that the

early-weaned calves require an adequate management as they may develop the bone turn over higher than the normal calves. The management to prevent the development of the thinner bone could be carried out appropriately, for example, adequate milk replacement, calcium supplements, proper exercise, and regular physical examination.

It is interesting to note that an elephant in the normal-weaned group had the highest bone CD ratio and higher than the normal range. This could be caused by some diseases such as osteopetrosis or scatter interference (Haugeberg 2008). The higher kV and mAs used in radiographic diagnosis of these calves were carried out because of their large limbs. The higher of kV yielded scatter to the images that may be less accuracy in diagnostic interpretation (Voges 2018). The cause of the bone CD ratio in this case is more likely to be from effects of scatter.

There was only one elephant in the normal weaned group that had higher level of N-MID osteocalcin (30.46 ng/ml). Moreover, his bone CD ratio was lower than others (CD ratio = 0.26; median CD ratio in this group = 0.43). Although there was no correlation between the bone CD ratio and N-MID osteocalcin, this elephant had shown negative correlation between them. More interestingly, he was classified into the normal wean elephant calf, but his history was different from others in the group. He was born from artificial insemination and rejected by her mother after calving. However, he had a stepmother and fed him milk until 2.5 years old.

Alkaline phosphatase (ALP) was also measured in this study. There were no significant different between two groups. Still, ALP has many sources including intestine, liver and not specific to the bone. Bone-specific alkaline phosphatase (BLAP) should be an appropriate test to

measure. Takehana et al. (2020) compared three bone markers, t-APL, ALP3, and TRAP5b, between a hand reared Asian elephant calf and two mother-reared elephant calves during 3-12 month-old. Their data suggested that although there is no different in weight gain and growth, lower bone markers in hand-reared elephant calf indicate abnormal bone metabolism. However, this data is from the study of three to twelfth month-old elephant and this present study evaluate the value of alkaline phosphatase in older elephant calves (2-10 year-old), and there could be other factors affect the bone metabolism markers

CTx of two elephant groups was not significantly different. CTx is the degradation product from type I collagen, which is the main component in bone (Glendenning et al., 2018). There are many factors affecting serum CTx, including fasting state, circadian variation, and some hormones. These variations are difficult to measure and interpret. The knowledge about serum CTx in elephants are limited and there is no reference interval to compare. Although, there is a study of CTx in osteoarthritis elephant (Chusyd et al., 2023), the level of CTx is lower than reported in this study. It could be the effect of age, as CTx decrease when human become an adult (Diemar et al., 2021). Further investigation is warrant. The experiment of more samples should be done to investigate or confirm these correlations.

Further plan of the study is to include more elephants, multiple bone markers, and bone-related parameters, for example bone alkaline phosphatase, and parathyroid hormone. In addition, the final diagnosis should be confirmed the bone diseases.

Conclusion

The present study showed that N-MID osteocalcin was significantly higher in early weaned elephant calves, which may indicate the high bone turnover in these elephants. This elevated bone turnover was not seen by radiographic diagnosis. Further investigations and appropriate management should be carried out to confirm and prevent metabolic bone disease in early weaned elephant calves.

Acknowledgements

This study owed the attitude for Faculty of Veterinary Science, Mahidol University for financially support. Grate attitude to Veterinary team at NEI, Dr. Kajohnpat Boonprasert, Dr. Pethisak Sombatpootorn, Dr. Pitikarn Bampenpol, Dr. Warangkhan Langkaphin, and more for supporting and giving valuable consults. Profound thanks to Dr. Jaratpong Ngammoh, Dr. Tanikarn Teerabunyakul, Dr. Waraporn Raksapol, Dr. Jutaporn Sanghan, Dr. Panuwat Pakpiboon, Dr. Nanmanas Sikong, Dr. Maythawee Singhabud, Dr. Asawin Thongprasri, Dr. Sawanee Kwansuk and Veterinary students from KKU; Nipat Pitoonpong and friends on the help of elephant radiographic diagnosis. Finally, this study couldn't finish without the great help from all NEI mahout team and staffs.

References

- Allen MJ. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet Clin Pathol.* 2003;32(3):101-13.
- Arya N, Moonarmart W, Cheewamongkolnimit N, Keratikul N, Poon-Iam S, Routh A, et al. Osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in Asian elephants (*Elephas maximus*) at different ages. *Vet J.* 2015;206(2):239-40.

- Brown JP, Don-Wauchope A, Douville P, Albert C, Vasikaran SD. Current use of bone turnover markers in the management of osteoporosis. *Clin Biochem.* 2022;109-110:1-10.
- Chusyd DE, Brown JL, Golzarri-Arroyo L, Dickinson SL, Kraus L, et al. Relationship between reproductive and bone biomarkers and osteoarthritis in zoo Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta Africana*) elephant. *J Zoo Wildl Med.* 2023;53(4):801-10.
- de Albuquerque Maia L, Lisboa PC, de Oliveira E, da Silva Lima N, da Costa CA, de Moura EG. Two models of early weaning decreases bone structure by different changes in hormonal regulation of bone metabolism in neonate rat. *Horm Metab Res.* 2013;45(5):332-7.
- Diemar SS, Lylloff L, Rønne MS, Møllehave LT, Heidemann M, Thuesen BH, et al. Reference intervals in Danish children and adolescents for bone turnover markers carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (β -CTX), pro-collagen type I N-terminal propeptide (PINP), osteocalcin (OC) and bone-specific alkaline phosphatase (bone ALP). *Bone.* 2021;146:115879.
- Emanuelson K. Neonatal Care and Hand Rearing. In: Fowler ME, Mikota SK, editors. *Biology, Medicine, and Surgery of Elephants*. 1st ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2006. p. 223-41.
- Glendenning P, Chubb SAP, Vasikaran S. Clinical utility of bone turnover markers in the management of common metabolic bone diseases in adults. *Clinica Chimica Acta.* 2018;481:161-70.
- Greco A, Meomartino L, Gnudi G, Brunetti A, Di Giancamillo M. Imaging techniques in veterinary medicine. Part II: Computed tomography, magnetic resonance imaging, nuclear medicine. *Eur J Radiol Open.* 2023;10:100467.
- Haugeberg G. Imaging of metabolic bone diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(6):1127-39.
- Kajaysri J, Renunpech S, Thammakarn C, Warrasuth N, Eardmusic S. Case report: The condition of paper thin bone layer and fracture of metabolic bone disease in an orphan elephant. *Proceedings of 41th Kasetsart University Annual Conference.* Bangkok, Thailand: Kasetsart University; 2003. p. 508-15.
- Kamr AM, Dembek KA, Gilsenan W, Bozorgmanesh R, Hassan HY, Rosol TJ, et al. C-terminal telopeptide of type I collagen, osteocalcin, alkaline phosphatase, and parathyroid hormone in healthy and hospitalized foals. *Domest Anim Endocrinol.* 2020;72:106470.
- Kilgallon C, Flach E, Boardman W, Routh A, Strike T, Jackson B. Analysis of biochemical markers of bone metabolism in Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Zoo Wildl Med.* 2008;39(4):527-36.
- Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem.* 2000;37(Pt 4):432-46.
- Fowler M, Mikota S. *Biology, Medicine, and Surgery of Elephants.* Iowa: Blackwell Publishing; 2006.
- McIlwraith CW. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J.* 2005;37(5):473-82.
- Oginni LM, Worsfold M, Sharp CA, Oyelami OA, Powell DE, Davie MW. Plasma osteocalcin in healthy Nigerian children and in children with calcium-deficiency rickets. *Calcif Tissue Int.* 1996;59(6):424-7.
- Takehana K, Hatate K, Yamagishi N. Serum activities of two bone markers in captive Asian elephants (*Elephas maximus*) at different ages. *J Vet Med Sci.* 2018;80(1):63-7.

- Takehana K, Kitani R, Hatate K, Onomi R, Yamagishi N. Anthropometric and blood data on a hand-reared captive Asian elephant (*Elephas maximus*) calf: A retrospective case report. J Vet Med Sci. 2020; 82(7):943-7.
- Udomtanakunchai C, Pongsopawijit, P, Langkaphin W, Lawongwan S, and Tasomkan S. Evaluation of the bone mineral density of Asian elephants (*Elephas maximus*) via dual-energy x-ray imaging of tails. J Zoo Wildl Med. 2019;50(2):375-82.
- Voges KA. Radiographic Anatomy of the Appendicular Skeleton. In: Thrall DE, editor. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. 7th ed. Philadelphia: Saunders. 2018. p. 305.
- West G. Musculoskeletal System. In: Fowler ME, Mikota SK, editors. Biology, Medicine, and Surgery of Elephants. 1st ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2006. p. 263-70.

Clear Cell Renal Cell Carcinoma in a Dog

Poonnut Darakamas^{1*} Panyakamol Chandrasakha¹ Parin Suwannaprapha²
Surachart Banjathammarak¹ Krittin Chuaychoo¹ Thirawut Kongtasai³

¹Prasu-arthorn small animal hospital, Faculty of Veterinary Sciences, Mahidol University,
Phuttamonthon 4 Rd., Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

²Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Sciences, Mahidol University,
Phuttamonthon 4 Rd., Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

³Department of Veterinary Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Sciences, Mahidol University,
Phuttamonthon 4 Rd., Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

*Corresponding author, E-mail address: poonnut.dar@mahidol.edu

Received: 25 January 2023; Revised: 6 March 2023; Accepted: 7 March 2023

Abstract

A 10-year-old, spayed, female poodle was presented at Prasuarthon Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University for further investigation on abdominal enlargement, anorexia and frequent vomiting for 1 week. Upon an abdominal palpation, a firm abdominal mass was noted in the cranial abdomen. Hematology and blood chemistry values were within normal limits, except elevated symmetric dimethylarginine (SDMA). Ultrasonography reported a large oval shaped mass at the left retroperitoneal area of unknown origin. The computed tomography (CT) result revealed that the left kidney was severely enlarged with an irregular shape. The dog was diagnosed with a renal mass. An exploratory laparotomy and nephrectomy were performed for diagnosis and treatment. The renal mass was submitted for a histopathological examination and was reported to be a clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). The patient was clinically healthy and was under follow up for 24 weeks without any sign of metastasis.

Keywords: clear cell renal cell carcinoma, renal carcinoma, dog, histopathology

โรคมะเร็งไตชนิดเคลียร์เซลล์ในสุนัข

ปุณณัตต์ ดาระกะมาศ^{1*} ปัญญกมล จันทรสาขา¹ ปริญ สุวรรณประภา²
สุรชาติ เบญจธรรมรักษ์¹ กฤติน ช่วยชู¹ ธีรวุฒิ คงตาทราย³

โรงพยาบาลสัตว์ ประศูอาทร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170
²ภาควิชาปริคลินิกและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170
³ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: poonnut.dar@mahidol.edu

Received: 25 January 2023; Revised: 6 March 2023; Accepted: 7 March 2023

บทคัดย่อ

สุนัขตัวเมีย พันธุ์พุดเดิ้ล อายุ 10 ปี ถูกส่งตัวมาที่โรงพยาบาลสัตว์ประศูอาทร มหาวิทยาลัยมหิดลด้วยปัญหาพบช่องท้องขยายใหญ่ อาเจียน และทานอาหารลดลงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ การตรวจร่างกายภายนอกบริเวณช่องท้องคลำพบก้อนเนื้อภายในช่องท้องส่วนหน้าขนาดใหญ่ ผลการตรวจเลือดพบค่า symmetric dimethylarginine (SDMA) เพิ่มขึ้น รังสีวินิจฉัยช่องอกไม่พบลักษณะการกระจายตัวของมะเร็งและรังสีวินิจฉัยช่องท้องพบลักษณะก้อนเนื้อขนาดใหญ่ ทำการตรวจช่องท้องด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงพบลักษณะก้อนเนื้อบริเวณช่องท้องฝั่งซ้ายใกล้กระเพาะปัสสาวะแต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งที่มาได้ จึงได้ทำการใช้เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์พบลักษณะก้อนเนื้อที่ไต ทำการรักษาด้วยวิธีศัลยกรรมและวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าก้อนเนื้อดังกล่าวเป็นมะเร็งไตชนิดเคลียร์เซลล์ จากนั้นทำการติดตามอาการเป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์พบว่าสุนัขหลังศัลยกรรมแก้ไขสุขภาพดี ไม่พบการกระจายตัวของมะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นภายในร่างกาย

คำสำคัญ : เนื้องอกที่ไต มะเร็งไตชนิดเคลียร์เซลล์ สุนัข พยาธิวิทยา

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common canine primary renal tumor, which is accounted for approximately 60% (Meuten and Meuten 2016). Additionally, the incidence of this tumor is 0.5 - 1.5% in dog (Baskin and De Paoli 1977). The tumor typically affects middle aged dogs (mean = 7.1 years, range = 3 - 15 years) (Lucke and Kelly 1976), and it is usually unilateral (Bryan et al., 2006). The gender distribution of RCC has been demonstrated as 1.3-1.8 : 1 in male to female (Bryan et al., 2006). Breed predilection for RCC has been reported in German shepherds, Labrador retrievers, Golden retrievers and Boxers (Edmondson et al., 2015; Meuten and Meuten 2016). Common clinical signs of RCC in dogs are hematuria, palpable abdominal mass and non-specific signs including anorexia, depression and weight loss (Lucke and Kelly 1976; Collicutt et al., 2013).

In dogs with RCC, hematologic abnormalities may be demonstrated including neutrophilic leukocytosis, mild anemia, mild thrombocytopenia and polycythemia associated with an increase of erythropoietin (Meuten and Meuten 2016). Urinalysis may show hematuria, proteinuria, pyuria or inactive sediment in dogs with primary renal tumor (Klausner and Caywood 1995). Urine cytology with Giemsa's staining may demonstrate transitional epithelial cells and large clusters of markedly pleomorphic cells (Birdane et al., 2004). Hepatic enzymes were found to be elevated in 10-25% of dogs due to secondary liver disease (Meuten and Meuten 2016). Only 16% and 19% of the dogs had increased levels of creatinine and urea, respectively, while mild hypoalbuminemia was observed in just 13%; no other specific biochemical abnormalities were identified (Carvalho et al., 2017). Radiography and ultrasonography are effective and accessible for the diagnosis of renal tumors, however, there are limitations

for the identification of tumor metastasis by these techniques (Collicutt et al., 2013). To aid in the visualization of renal tumor and tumor metastasis to other structures, computed tomography (CT) is a useful diagnostic tool (Noh et al., 2022). Pulmonary metastasis is reported in dogs with RCC of 16-26.7% (Noh et al., 2022). The common sites of tumor metastasis in dogs are lungs, lymph nodes, bones, skin and liver (Herthel et al., 2011). The histopathological findings of RCC demonstrate a highly cellular nature with numerous cohesive sheets of round to polygonal epithelial cells with ill-defined cytoplasmic borders (Collicutt et al., 2013). The cells are usually closely packed and the cytoplasm is abundant, dense and non-vacuolated (Nielsen et al., 1976). RCC is classified into three types based on histological patterns: solid, papillary, and tubular (Nielsen et al., 1976). Furthermore, this histocytological pattern of RCC can be divided into three subtypes: chromophobic, eosinophilic and clear cell variants (Gil da Costa et al., 2010). Cytologic criteria for clear cell RCC are solid tumors with extensive areas of numerous carcinoma cells, clear, vacuolated cytoplasm and an extensive network of small caliber blood vessels (Edmondson et al., 2015). Canine clear cell RCC is rare in dogs, with only 9% observed compared to 77% in humans (Keegan et al., 2012; Carvalho et al., 2017).

For therapeutic options, nephrectomy may extend survival time in dogs with primary renal tumors (Bryan et al., 2006). Survival time has been reported from 8 to 24 months with a median of 16 months in dogs with RCC after nephrectomy (Meuten and Meuten, 2016). The Fuhrmann grading system, histological subtype and mitotic count (MC) are all prognostic factors for RCC (Avallone et al., 2021). Moreover, the COX-2 immuno-histochemical score (IHS) and the mitotic index (MI) predict individual outcomes (Carvalho et al., 2017).

Adjunctive therapy using tyrosine kinase inhibitors to prolong the survival time of a dog with metastatic RCC after nephrectomy was recently reported (Damian and Di Bella 2022). Only a few case reports on clear cell RCC in dogs have been published in the veterinary medicine literature. The purpose of this case report is to demonstrate the character of the clinical signs, laboratory findings, diagnostic imaging, histopathologic diagnosis and effect of treatment on survival time in a dog with clear cell RCC.

Case description

History

A 10-year-old, spayed, female Poodle dog was presented at Prasuarthon Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University for further investigation on abdominal enlargement. The dog was suspected of having an abdominal mass of unknown origin.

The dog previously had intermittent vomiting and decreased appetite for a week. Antiemetics such as ondansetron and metoclopramide were administered from a private clinic without any improvement. The dog was indoor living and its vaccination status was current.

Physical examination and laboratory findings

For the physical examination, the dog was quiet, alert and responsive. The patient's vital signs were assessed and found to be within normal limits: the heart rate was 108 beats/minute, respiratory rate was 24 breaths/minute, rectal temperature was 101.4 °F, capillary refill time was normal, cardiothoracic auscultation revealed no abnormal sounds, and the femoral pulse was normal. The mucous membrane was pale-pink. The dog was slightly obese, with a body condition score of 6/9. Upon an abdominal palpation, the dog was uncomfortable and a large abdominal mass was anticipated.

At the first visit to the referral center, laboratory findings including complete blood count (CBC) and biochemistry profile were performed. The CBC showed leukocytosis and mild anemia (Table 1). The biochemical findings revealed elevation of plasma symmetric dimethylarginine (SDMA) concentration with normal blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), total protein, albumin, alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) concentrations (Table 1).

Diagnostic imaging

To further assess the abdominal mass and its metastasis, thoracic and abdominal radiography, abdominal ultrasonography and CT scan were performed. Thoracic and abdominal radiographs were taken in 2 views, lateral and ventrodorsal. Thoracic radiographs showed a bronchial lung pattern without evidence of pulmonary metastasis (Figure 1). Abdominal radiographs demonstrated a caudal abdominal mass with ill-defined margins and loss of serosal detail, and loss of peritoneal space (Figure 2). Abdominal ultrasonography revealed a large oval-shaped mass at the left retroperitoneal area with an unknown origin. The mass was approximately 10 x 15 centimeters in dimension and appeared to be the left kidney with heterogeneous parenchyma and irregular contour (Figure 3). No urolith was detected. Other abdominal organs had unremarkable findings. Based on these findings, a presumptive diagnosis of unilateral renal mass was made. Subsequently, thoracic and abdominal CT scans were performed. The thoracic CT scan showed normal lungs and heart. The left kidney was markedly enlarged with irregular shaped and had heterogeneous contrast enhancement. Vessel enhancement was found in the cortico-medullary phase of post contrast. The regional lymph nodes near the left kidney were slightly prominent

Table 1. Hematological report from the first visit.

Parameters	References (Absolute)	D0	Parameters	References	D0
Wbc (/uL)	6000-17,000	25,580	Alb (g/dL)	2.7-3.8	2.9
Monocyte	150-1,530	1,535	Alp (U/L)	23-212	173
Neutrophil	3,000-11,500	19,952	Alt (U/L)	10-100	19
Lymphocyte	1,000-4,800	4,093	Bun (mg/dL)	7-27	23
Eosinophil	100-1,250	0	Crea (mg/dL)	0.5-1.8	1.37
Basophil	<100	0	Glu (mg/dL)	77-125	84
RBC (10 ⁶ /uL)	5-9	5.08	Total prot (g/dL)	5.2-8.2	6.3
HB (g/dL)	10-18	9.6	SDMA (ug/dL)	0-14	19
Hct %	35-55	29.8	Plt (10 ³ /uL)	200-500	556

Hct: hematocrit, PLT: platelet, RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin, BUN: blood urea nitrogen, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, SDMA: symmetric dimethylarginine

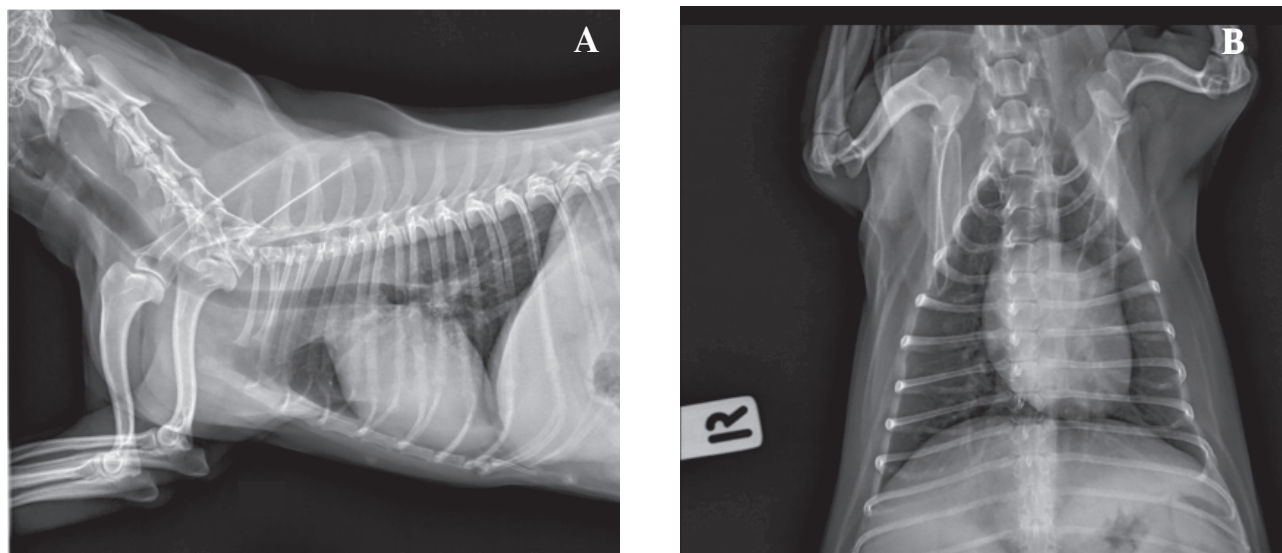


Figure 1. Lateral (A) and ventral-dorsal (B) views of plain thoracic radiographs revealed the absence of pulmonary metastasis at first visit.

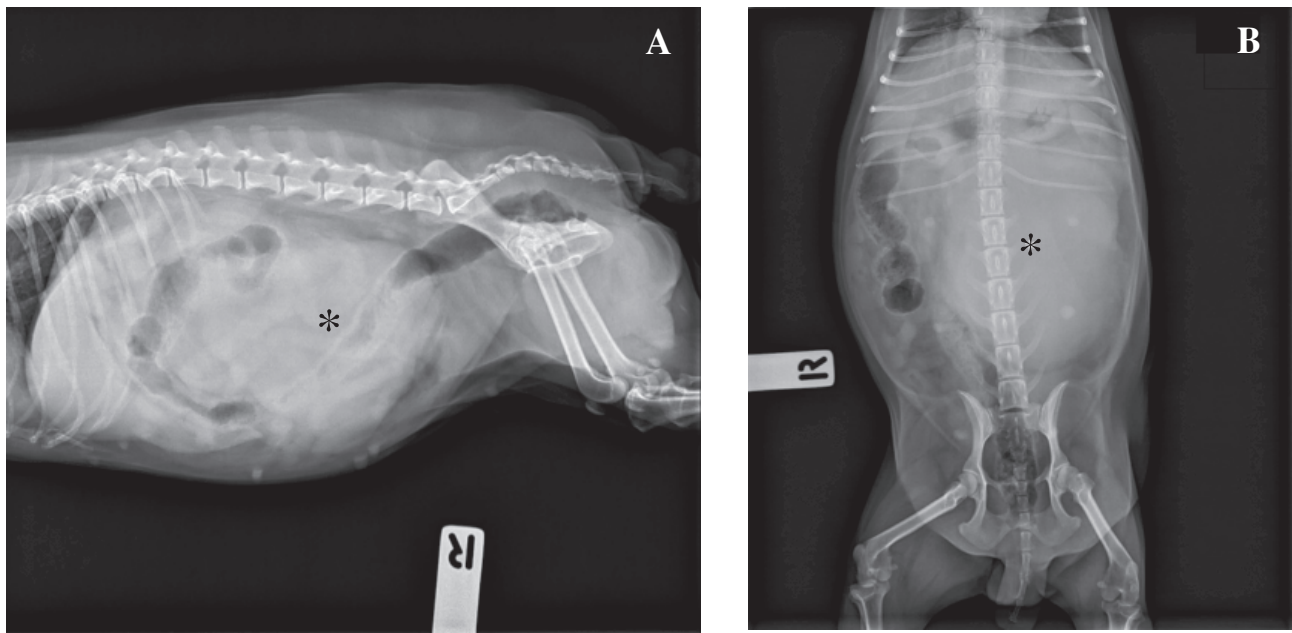


Figure 2. Lateral (A) and ventral-dorsal (B) views of plain abdominal radiographs revealed a soft tissue density mass at the caudal part of the abdomen (asterisk).

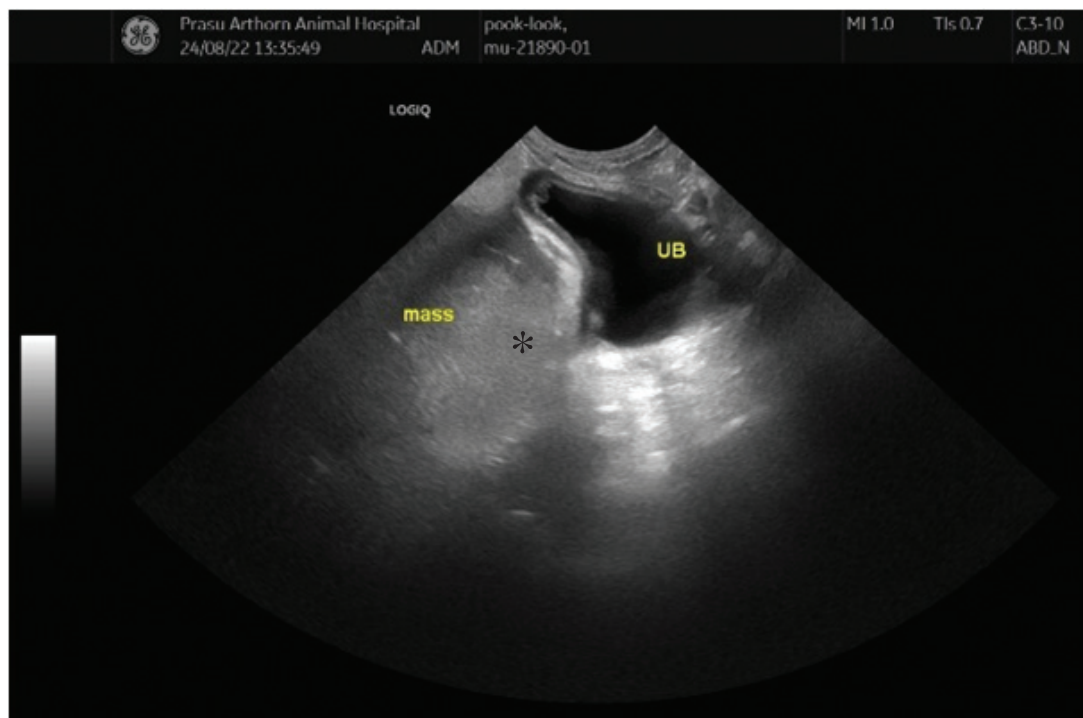


Figure 3. Abdominal ultrasonography showed an unlocated mass (asterisk) which was adjacent to the urinary bladder (UB) (US mode: B-mode, frequency 10 Megahertz, transducer C3 -10).

with inhomogeneous contrast enhancement. Based on these results, the dog was diagnosed as having a left renal mass with regional lymph nodes involvement (Figure 4).

Treatment and monitoring

After the diagnostic imaging, the treatment plan was to implement a surgical removal of renal mass or nephrectomy. Thus, an exploratory laparotomy and unilateral nephrectomy were performed. During the laparotomy, the mass was 15x10 centimeters in dimension, had irregular form with contour, was covered with omentum and was proven to be the left kidney. After the left nephrectomy, the mass was sent for histopathological examination. During visual inspection and palpation, no gross abnormalities were found on the right kidney, liver, gall bladder, intestine and urinary bladder.

After surgery, the dog was hospitalized for 3 days at the intensive care unit for monitoring and post-operative care. During hospitalization, the dog was treated by intravenous fluid, amoxicillin/clavulanic acid (20 mg/kg; Clavamox®, Zoetis Thailand Ltd., Bangkok, Thailand) for 10 days and analgesics. Analgesics included a constant rate infusion (CRI) of fentanyl (4 ug/kg; fentanyl-hameln®, Siam Bioscience Co. Ltd., Nonthaburi, Thailand) for 24 hours, combined with a fentanyl patch (25ug/kg; Sandoz®, Hexal AG, Holzkirchen, Germany) for 48 hours, and robenacoxib (1 mg/kg; Onsior®, Novartis Animal Health US, Inc., Greensboro, NC 27408, USA) for 3 days. A veterinarian monitored the patient's vital signs, including respiratory rate, heart rate, capillary refill time, mucous membrane color and femoral pulse. Blood and urine samples were tested at the first and second days

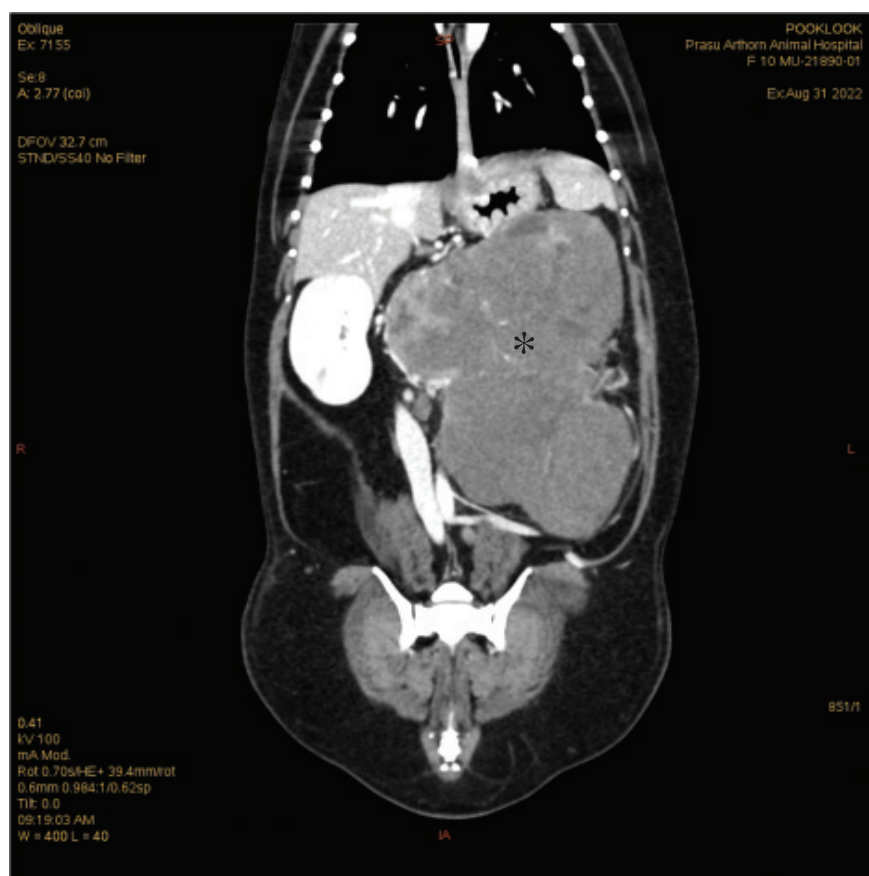


Figure 4. A left renal mass (asterisk) and involved regional lymph node reported from computed tomography.

of hospitalization. The CBC results showed mild anemia and leukocytosis (Table 2). Biochemical profile revealed normal concentrations of plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) (Table 2). Urinalysis including physical examination, dipstick and sediment analysis were normal (Table 2). Also, the dog had normal urine output (UOP) throughout the hospitalization. After recovering with a normal appetite, the dog was discharged

from the hospital and prescribed oral antibiotics and anti-inflammatory medication. Amoxicillin/clavulanic acid (20mg/kg; MOXCLAVET 62.5®, BIC Chemical Co., Ltd. Bangkok, Thailand) for 7 days and robenacoxib (1 mg/kg; Onsior®, Novartis Animal Health US, Inc., Greensboro, NC 27408, USA) for 3 days oral preparation were prescribed for continuation. At the 7-days follow-up after discharge, the dog's vital signs were normal and

Table 2. Hematology and Urinalysis report from post-operative care Days 1, 2, 7 and 120.

Parameters	References (Absolute)	Post-operative Day 1	Post-operative Day 2	Post-operative Day 7	Post-operative Day 120
Wbc (/uL)	6000-7,000	26,340	28,750	17,650	9,070
Monocyte	150-1,530	1,580.4	863.5	529.5	544.2
Neutrophil	3,000-11,500	21,072	23,575	1,3414	6,258.3
Lymphocyte	1,000-4,800	3,688.6	3,450	3,353.5	2,176.8
Eosiphil	100-1,250	0	863.5	353	90.7
Basiophil	<100	0	0	529.5	544.2
RBC (10 ⁶ /uL)	5-9	4.64	5.08	5.88	7.14
HB (g/dL)	10-18	8.9	9.6	11.2	14.4
Hct %	35-55	27.4	30.4	35.2	43.1
Plt (10 ³ /uL)	200-500	532	599	892	396
BUN (mg/dL)	7-27	18	20	26	20
Creatinine (mg/dL)	0.5-1.8	1.24	1.35	1.64	1.83
Glu (mg/dL)	77-125	99	120	122	109
Alb (g/dL)	2.7-3.8	-	-	3.1	3.3
Alp (U/L)	23-212	-	-	745	135
Alt (U/L)	10-100	-	-	144	40
Total protein (g/dL)	5.2-8.2	-	-	7.1	6.9
Urinalysis (Cystocentesis)					
SG	1.015-1.045	1.017	1.015	1015	1030
pH	5.2-6.8	6	6.5	7.5	6.0
Leu	negative	-	-	-	-
NIT	negative	-	-	-	-
PRO	negative	-	1+	1+	-
GLU	normal	-	-	-	-
KET	negative	-	-	-	-
UBG	normal	-	-	-	-
BIL	negative	-	-	-	-
ERY	negative	1+	2+	-	-

Hct: hematocrit, PLT: platelet, RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin, BUN: blood urea nitrogen, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, SG: specific gravity

there was no evidence of vomiting or hematuria. The blood examination showed thrombocytosis, increased alanine transaminase (ALT), increased alkaline phosphatase (ALP), normal BUN, and normal creatinine concentrations (Table 2). Ultrasonography demonstrated early chronic kidney disease (CKD) from the right kidney, no evidence of peritonitis, and unremarkable other abdominal organs.

At the 120 days of follow-up, the dog was clinically healthy. Blood examination including complete blood count (CBC), blood biochemistry and urinalysis were all within references intervals (Table 2). Thoracic radiographs were performed and showed no pulmonary metastasis (Figure 6). There was no tumor metastasis observed from the ultrasonography.

Histopathological findings

Histopathologic examination confirmed the resected mass as a clear cell renal cell carcinoma. The specimen displayed a cancerous mass with well-

demarcated, partially encapsulated, densely cellular appearance. Neoplastic cells were overgrown and compressing the adjacent normal left kidney parenchyma (Figure 5). Those cells were typically arranged in compact nests and sheets with distinct cytoplasmic border. The cells were large, round to polygonal and contained eosinophilic cytoplasm which occasionally displayed multiple small clear vacuoles within the cytoplasm or contained large clear intracytoplasmic vacuoles (Figure 5). The nuclei were irregularly round with finely granular chromatin. There was moderate cellular and nuclear pleomorphism and the rate of mitosis was low. The single cell necrosis and small amounts of multifocally scattered hemorrhages were found throughout the neoplasm. Multifocal aggregates of few lymphocytes, plasma cells and macrophages were observed within the adjacent cortical stroma and mild multifocal interstitial fibrosis was also presented.

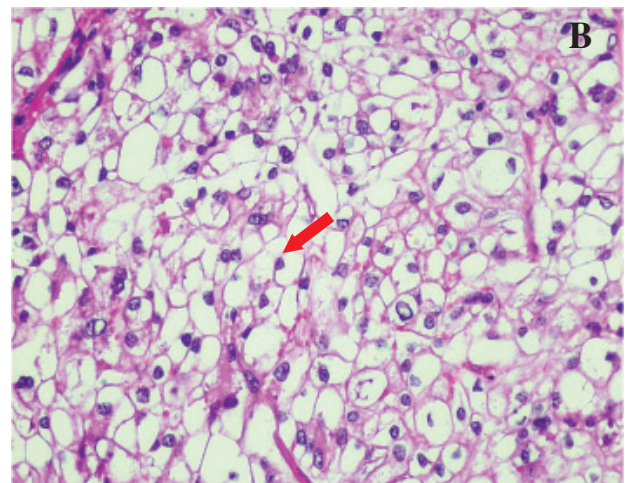
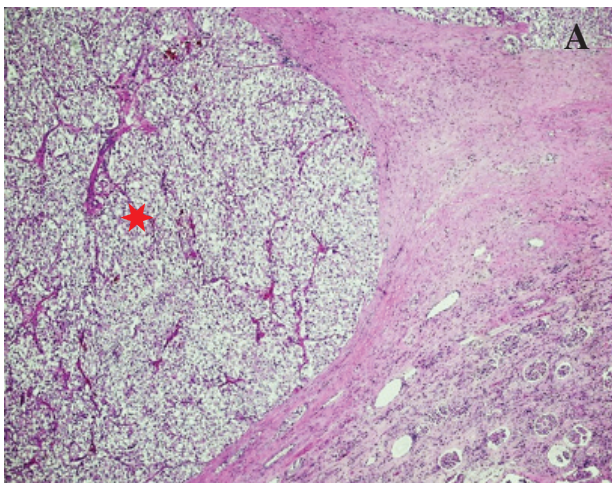


Figure 5. (A) The specimen shows cancer cells with a well-defined, partially encapsulated, tightly cellular appearance (asterisk). Neoplastic cells are hyperproliferative and compress the adjacent normal left renal parenchyma (H&E, 40x). (B) Tumor cells are large, round to polygonal cells with clear intracytoplasmic vacuoles and some neoplastic cells contain small amount of eosinophilic cytoplasm. The nuclei are irregularly round with finely granular chromatin (H&E, 400x) (arrow).

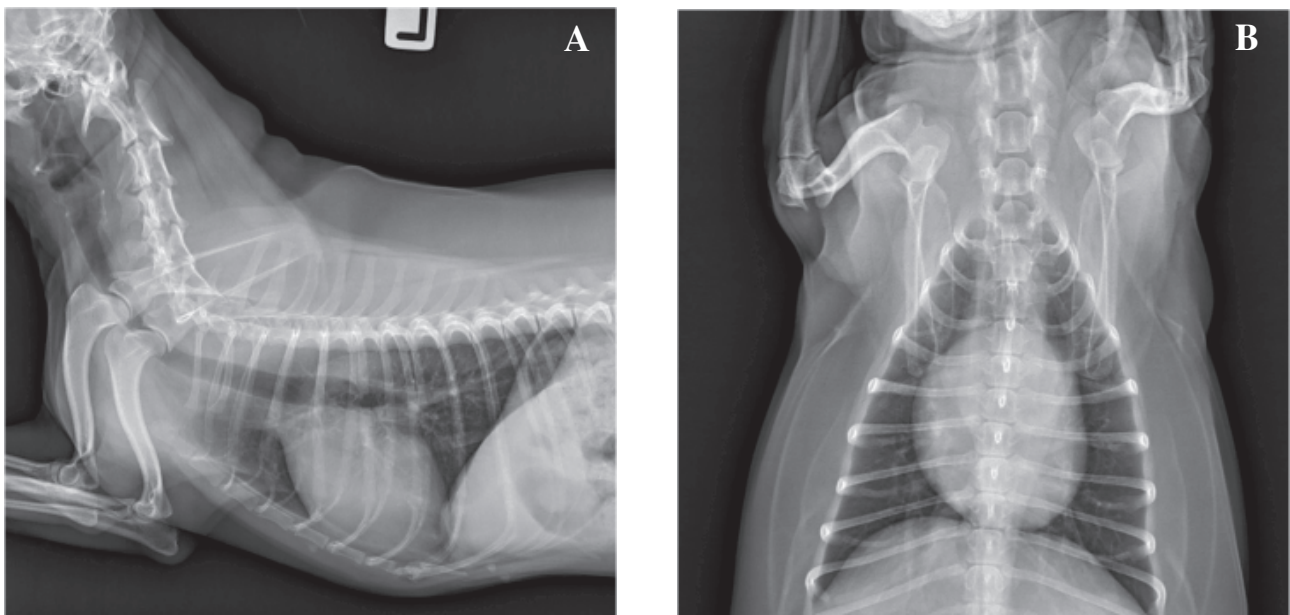


Figure 6. Lateral (A) and ventral-dorsal (B) views of plain thoracic radiograph revealed the absence of pulmonary metastasis at day 120 after nephrectomy.

Discussion

Primary renal tumors including cancers such as RCC, transitional cell carcinoma, sarcoma and nephroblastoma are found in many species such as horses, sheep, dogs and cats (Bryan et al., 2006; Paca and Lazar 2013; Meuten and Meuten 2016). Actually, RCC commonly affects a unilateral kidney. Nevertheless, bilateral involvement is rarely found (Lucke and Kelly 1976). In this case report, unilateral RCC was demonstrated. Breed predilection includes German shepherds and other large sized canine families (Edmondson et al., 2015; Meuten and Meuten 2016). The proportion of male dogs having renal cell carcinoma is higher than females (Gil da Costa et al., 2010), similar to cases reported in humans (Hayes and Fraumeni 1977). Nonetheless, this case report was found in a female Poodle. The age of dogs with RCC in this report was 8 years, in accordance with the age range 3-15 years reported in a previous study (Lucke and Kelly 1976). Dogs with RCC can express clinical signs such as anorexia, weight loss, hematuria and palpable abdominal

mass (Birdane et al., 2004) which was also observed in this case report, except without hematuria.

Laboratory findings in RCC hematologic abnormalities include anemia (33%) leukocytosis (20%), lymphopenia (9%), thrombocytopenia (9%), monocytosis (6%) and rarely polycythemia (Bryan et al., 2006). Several paraneoplastic syndromes are found in dogs with primary renal tumor such as mild anemia, mild thrombocytopenia, neutrophilic leukocytosis, and secondary polycythemia related with increased erythropoietin production by a tumor (Meuten and Meuten 2016). Urinalysis often reveals macroscopic and microscopic hematuria, aiding in the differentiation between urinary inflammation and neoplasia (Wycislo and Piech 2019). Urine sediment cytology often demonstrates large clusters of pleomorphic cells and mitotic figures (Birdane et al., 2004). Nevertheless, urinalysis was unable to be performed in this case during the diagnostic process because the bladder was empty during the examination at the hospital. Several studies have suggested that radiography is imperative for

diagnosis (Meuten and Meuten 2016). Abdominal radiographs often reveal a soft tissue mass with ill-defined margins and a radiopaque silhouette at the caudal part of the abdomen (Lee et al., 2005). Also, ultrasonography helps to verify an abdominal mass; however, it is difficult to differentiate the origin of the mass (Noh et al., 2022). Comparably, the ultrasonography in this case report could not identify the origin of the tumor. Currently, CT scan is very helpful for visualizing RCC and its metastasis (Lee et al., 2011; Tanaka et al., 2019). In this case report, all recommended imaging techniques were performed to precisely locate the location, the origin and the metastasis of the mass.

Renal biopsy in dogs with renal mass is required for a definitive diagnosis and determination of disease severity. The techniques include percutaneous methods with ultrasonographic guidance and biopsy during laparoscopy or surgery (Vaden 2005). Also, fine-needle aspiration from the kidney was suggested as a noninvasive technique to get the samples for cytology (Petterino et al., 2011). Renal cytology is particularly helpful for identifying inflammation, neoplasia, abscesses, infection and metastasis neoplasia (Borjesson 2003). Surgery is the most effective treatment for dogs with unilateral renal neoplasia (Araujo et al., 2021). Thus, unilateral nephrectomy was performed in this case. The renal mass subsequently underwent histopathological examination.

Histopathology for RCC revealed a tubular cell origin containing solid, tubular and papillary patterns (Baskin and De Paoli 1977). One study reported histologic types of RCC which are indicated in dogs as 34 % for solid, papillary 24 % and tubular 4%, but tubular is the most common type in other animals (Meuten and Meuten 2016). Nonetheless, tubular cell type was a result in this study. Clear cell RCC or ccRCC is a type of kidney cancer.

In humans, ccRCC is the most common type of kidney cancer, accounting for approximately 80% of all cases of renal cell carcinoma. In contrast, ccRCC in dogs was observed in only 9% of cases (Edmondson et al., 2015). Clear cell RCC arises from the epithelium of the proximal convoluted tubules and exhibits a predominantly expansive growth pattern. Grossly, it is a firm to solid, yellowish lesion with varying degrees of internal necrosis, hemorrhage and cystic degeneration. Such findings are most frequently observed in large, rapidly growing tumors. Histologically, such lesions have clear cells due to their lipid- and glycogen-rich cytoplasmic content. Such tumors often also contain cells with eosinophilic granular cytoplasm (Athanasio et al., 2021).

After nephrectomy, adjunctive therapy such as chemotherapy and anti-inflammatory drugs have been used in dogs with RCC in some case studies, resulting in similar survival time when comparing treatment or no treatment (Watanabe et al., 2008; Carvalho et al., 2017). Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inflammatory enzyme, which plays a role in modulation of neoplastic cell growth (Khan et al., 2001). In addition, the use of target chemotherapy medication of tyrosine kinase inhibitor (Toceranib phosphate) was reported in a dachshund dog to reduce the size of a lung mass from metastasis of RCC and prolong survival time (Damian and Di Bella 2022).

Dogs diagnosed with clear cell RCC had significantly shorter survival times (Edmondson et al., 2015). The survival times for RCC after surgery were reported as 8 ñ 24 months (median 16 months) (Meuten and Meuten 2016). The combination between nephrectomy and chemotherapy with tyrosine kinase inhibitor (Toceranib phosphate) treatment gave a recorded survival time of 36 months (Damian and Di Bella 2022). The survival time of the dog in this case report has already been 6 months thus

far. About 50-70 % of dogs with RCC have tumor metastasis (Meuten and Meuten 2016). Metastatic behavior in RCC is highly spread, and involves a wide range of organs including liver, bone, skin and especially lungs and local lymph nodes (Arai et al., 1991; Herthel et al., 2011). In humans, metastasis of RCC is found in bone as the most common site, which is different from animal species (Padala et al., 2020). Human ccRCCs also have shorter survival times compared to papillary and chromophobe subtypes, and human ccRCC variants more frequently cause metastatic disease (Keegan et al., 2012; Montironi and Cimadamore 2022). No evidence of metastasis has been observed in the dog in this case report after 6 months post operation. During monitoring, RCC dogs that had undergone nephrectomy could develop chronic renal failure, which subsequently led to systemic hypertension and proteinuria (McKiernan et al., 2002). Hence, an angiotensin II receptor blocker such as telmisatan is an additional medication that helps to alleviate systemic hypertension and proteinuria in RCC dogs that had undergone nephrectomy (Kwon et al., 2018). The guideline recommendations for this case are to monitor metastasis, clinical assessment, hematology, blood biochemistry, urinalysis, ultrasonography and chest radiographs at 3 and 6 months (Dobson and Lascelles 2011). After 6 months monitoring, a 6-month to an annual follow up should be continued (Biller et al., 2016). Ideally, CT scan is the most effective tool for close monitoring of metastasis (Noh et al., 2022). In humans, a CT scan every 6 ñ 12 months is very useful for monitoring metastasis and prognosis disease (Kassouf et al., 2009), but its use was limited in this case due to a financial issue.

Conclusion

In this case report, a nephrectomy was effective in treating renal carcinoma, along with supportive treatment to minimize the side effects after the surgery. Monitoring the patient was essential since ccRCC is highly recurrent in nature. Diagnostic imaging such as radiography, ultrasonography and CT scan were used in this patient to monitor for metastasis and blood profile was done regularly for general health condition observation. The limitation of this case was the lack of urinalysis from the first visit, because of having no clinical signs that can lead to urinary tract disorder such as hematuria, pollakiuria and stranguria. However, this might not affect the diagnosis for renal neoplasia. Furthermore, ccRCC in dogs has been reported in only a few publications, making it difficult to compare survival time and laboratory tests. Histopathologic examination of RCC subtypes was limited because of a low number of specialists. Ultimately the dog was given a final diagnosis as ccRCC and nephrectomy was performed. Within 6 months of observation, the dog had recovered well and was clinically improved.

Acknowledgements

The authors would like to express their sincere gratitude to Dr. Patsuda Sawasdiyakorn and all staff at Prasuarthon Animal Hospital as well as for the owner's permission and this patient whose support and collaboration made this case report possible.

References

- Arai C, Ono M, Une Y, Shiota K, Watanabe T, Nomura Y. Canine renal carcinoma with extensive bone metastasis. *J Vet Med Sci.* 1991;53(3):495-7.
- Araujo DCC, da Silva MA, da Veiga CCP, Fernandes Ji. Renal nephroblastoma in adult dog. *Braz J Vet Med.* 2021;42(1):e107820.
- Athanazio DA, Amorim LS, da Cunha IW, Leite KRM, da Paz AR, de Paula Xavier Gomes R, et al. Classification of renal cell tumors - current concepts and use of ancillary tests: recommendations of the Brazilian Society of Pathology. *Surg Exp Pathol.* 2021;4(1):4.
- Avallone G, Rasotto R, Chambers JK, Miller AD, Behling-Kelly E, Monti P, et al. Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Vet Pathol.* 2021;58(5):809-28.
- Baskin GB, De Paoli A. Primary Renal Neoplasms of the Dog. *Vet Pathol.* 1977;14(6):591-605.
- Biller B, Berg J, Garrett L, Ruslander D, Wearing R, Abbott B, et al. 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2016; 52(4):181-204.
- Birdane FM, Hatipoğlu F, Ortatli M, Koc Y, Turgut K. Renal cell carcinoma in a dog: Pathologic and cytologic findings. *Rev Med Vet.* 2004;155:212-6.
- Borjesson DL. Renal cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33(1):119-34.
- Bryan JN, Henry CJ, Turnquist SE, Tyler JW, Liptak JM, Rizzo SA, et al. Primary renal neoplasia of dogs. *J Vet Intern Med.* 2006;20(5):1155-60.
- Burgess KE, DeRegis CJ. Urologic Oncology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2019;49(2):311-23.
- Carvalho S, Stoll AL, Priestnall SL, Suarez-Bonnet A, Rassnick K, Lynch S, et al. Retrospective evaluation of COX-2 expression, histological and clinical factors as prognostic indicators in dogs with renal cell carcinomas undergoing nephrectomy. *Vet Comp Oncol.* 2017;15(4):1280-94.
- Collicutt NB, Garner BC, Brown CA, Camus MS. What is your diagnosis? Renal mass in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2013;42(3):389-90.
- Damian G, Di Bella A. Metastatic renal cell carcinoma in a dachshund with prolonged survival time. *Vet Rec Case Rep.* 2022;10(4):e500.
- Dobson JM, Lascelles BDX. *BSAVA manual of canine and feline oncology.* London: British Small Animals Veterinary Association; 2011.
- Edmondson EF, Hess AM, Powers BE. Prognostic significance of histologic features in canine renal cell carcinomas: 70 nephrectomies. *Vet Pathol.* 2015;52(2):260-8.
- Gil da Costa RM, Oliveira JP, Saraiva AL, Seixas F, Faria F, Gärtner F, et al. Immunohistochemical Characterization of 13 Canine Renal Cell Carcinomas. *Vet Pathol.* 2010;48(2):427-32.
- Hayes Jr HM, Fraumeni Jr JF. Epidemiological Features of Canine Renal Neoplasms. *J Cancer Res.* 1977;37(8 Pt 1):2553-6.
- Herthel P, Conceicao L, Barros M, Moreira J, Amorim R, Pinczowski P. Renal cell carcinoma with cutaneous metastasis in a dog. *Brazilian J Vet Pathol.* 2011;4: 132-7.
- Kassouf W, Siemens R, Morash C, Lacombe L, Jewett M, Goldenberg L, et al. Follow-up guidelines after radical or partial nephrectomy for localized and locally advanced renal cell carcinoma. *Can Urol Assoc J.* 2009;3(1):73-6.

- Keegan KA, Schupp CW, Chamie K, Hellenthal NJ, Evans CP, Koppie TM. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage. *J Urol*. 2012;188(2):391-7.
- Khan N, Stanfield K, Trajkovic D, Knapp D. Expression of Cyclooxygenase-2 in Canine Renal Cell Carcinoma. *Vet Pathol*. 2001;38:116-9.
- Klausner J, Caywood D. Canine and Feline Nephrology and Urology. *Can Vet J*. 1996;37.12:764.
- Kwon YJ, Suh GH, Kang SS, Kim HJ. Successful management of proteinuria and systemic hypertension in a dog with renal cell carcinoma with surgery, telmisartan, and amlodipine. *Can Vet J*. 2018;59(7):759-62.
- Lee KC, Jung Jh, Byeon YE, Oh S, Seo Ej, Song KJ, et al. Renal Cell Carcinoma in a Pekingese Dog. *J Vet Clin*. 2005;22(2):148-52.
- Lee S, Jung J, Chang J, Yoon J, Choi M. Evaluation of triphasic helical computed tomography of the kidneys in clinically normal dogs. *Am J Vet Res*. 2011;72(3):345-9.
- Letang N, Cabaniols L, Pouessel D, Robert M, Iborra F, Culine S, et al. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Bull Cancer*. 2009;96(4):475-84.
- Lucke VM, Kelly DF. Renal Carcinoma in the Dog. *Vet Pathol*. 1976;13(4):264-76.
- McKiernan J, Simmons R, Katz J, Russo P. Natural history of chronic renal insufficiency after partial and radical nephrectomy. *Urology*. 2002;59(6): 816-20.
- Meuten DJ, Meuten TL. Tumors of the urinary System. In: Meuten DJ editor. *Tumors in domestic animals*. 5th ed. Ames: John Wiley & Sons. Inc. Publishing; 2016. p. 632-88.
- Montironi R, Cimadamore A. Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs: 2022 World Health Organization Classification and Multidisciplinary. *Eur Urol*. 2022;82(5):483-6.
- Nielsen SW, Mackey LJ, Misdorp W. Tumors of the kidney. *Bull World Health Organ*. 1976;53(2-3): 237-46.
- Noh D, Shim J, Choi S, Choi H, Lee Y, Lee K. Computed tomographic findings of primary renal tumors in dogs and cats. *Thai J Vet Med*. 2022;52(3):499-505.
- Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol*. 2020;11(3): 79-87.
- Paca S, Lazar M. A case report of renal cell carcinoma in a dog. *Arq Med Vet Zootec*. 2013;65:1286-90.
- Petterino C, Luzio E, Baracchini L, Ferrari A, Ratto A. Paraneoplastic leukocytosis in a dog with a renal carcinoma. *Vet Clin Pathol*. 2011;40(1):89-94.
- Tanaka T, Akiyoshi H, Nishida H, Mie K, Lin LS, Iimori Y, et al. Contrast-enhanced computed tomography findings of canine primary renal tumors including renal cell carcinoma, lymphoma, and hemangiosarcoma. *PLoS One*. 2019;14(11):e0225211.
- Vaden SL. Renal biopsy of dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2005;20(1):11-22.
- Watanabe T, Hoshi K, Hasegawa Y, Ishida Y, Taguchi K, Sakata I. A Case of Canine Renal Cell Carcinoma Treated with Piroxicam with Long-Term Survival. *Jpn J Vet Res*. 2008;61:463-6.
- Wycislo KL, Piech TL. Urinary Tract Cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2019;49(2):247-60.