

**JOURNAL OF**

# **APPLIED ANIMAL SCIENCE**



**VOL. 19 NO. 1**

**JANUARY-JUNE 2026**



**ISSN 1906-2257**

**Print**

**ISSN 2985-1211**

**Online**

# “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 peered 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

### กองบรรณาธิการ

ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพไลพันธ์ พุทธวัฒน์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.เกียรติคุณ ดร.น.สพ.สถาพร จิตตपालพงศ์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ศ.ดร.น.สพ.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ศ.ดร.น.สพ.พงษ์ราม รามสูตร	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.น.สพ.ปานเทพ รัตนากร	มูลนิธิช้างแห่งประเทศไทย
รศ.ดร.น.สพ.วิทวัส วิริยะรัตน์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.สพ.ญ.สุกฤทัย บุญมาไสว	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.สพ.ญ.พนิดา ชนาภิวัฒน์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.น.สพ.อนุวัฒน์ วิรัชสุดากุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.สพ.ญ.จารุณลักษณ์ จิรภัทรเศรษฐ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.ชุตีเพ็ญ บูรณะสินทรัพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.น.สพ.ชาญณรงค์ รอดคำ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.ดร.น.สพ.อดิพร รุ่งสิทธิชัย	โรงพยาบาลรอยัลจูบิลี แคนาดา
รศ.ดร.น.สพ.เดิมาพงศ์ วงศ์ตะวัน	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
รศ.ดร.สพ.ญ.ศุภกร ทองชวน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผศ.ดร.สพ.ญ.วชิราพรธรรม ทรัพย์สวัสดิ์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผศ.ดร.สพ.ญ.วราพร สุขุมาวาสี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ดร.จอมขวัญ มีร์ภักย์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ.สพ.ญ.สุพรรณิภา พุทธชาติ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
สพ.ญ.นิจันท์ ศิริอาชาวัฒนา	โรงพยาบาลสัตว์พนาลัย

### Editor-in-Chief

Assoc. Prof. Dr. Tanasak Changbunjong

### Editorial Boards

Emeritus Prof. Dr. Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
Emeritus Prof. Dr. Sathaporn Jittapalpong	Kasetsart University
Prof. Dr. Thaweesak Songserm	Kasetsart University
Prof. Dr. Pongrama Ramasoota	Mahidol University
Assoc. Prof. Pamtep Ratanakorn	Asian Elephant Foundation of Thailand
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. Charoonluk Jirapatharasate	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Shutipen Buranasinsup	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Channarong Rodkhum	Chulalongkorn University
Assoc. Prof. Dr. Atthaporn Roongsitthichai	Royal Jubilee Hospital, Canada
Assoc. Prof. Dr. Tuempong Wongtawan	Walailak University
Assoc. Prof. Dr. Suporn Thongyuan	Kasetsart University
Asst. Prof. Dr. Wachiraphan Supsavhad	Kasetsart University
Asst. Prof. Dr. Woraporn Sukhumavasi	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Jomkwan Meerak	Chiang Mai University
Asst. Prof. Suphannika Pnutthachalee	Khon Kaen University
Dr. Nijanan Siriarchawattana	Panalai Veterinary Hospital

### Journal Management

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

999 ถนนพุทธมณฑล สาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

โทร. 0-2441-5242 ต่อ 1302 โทรสาร 0-2441-0937

Website [https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas\\_muvs](https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs)

E-mail address: editor.jass2020@gmail.com

Editor-in-Chief: Assoc. Prof. Dr. Tanasak Changbunjong,

Journal manger: Dr. Nicharee Income

### จัดพิมพ์โดย :

บริษัท ฟોร์ที 5 พรีเมส จำกัด

27 ซอยบรมราชชนนี 6 แขวงบางบำหรุ เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

โทร. 02 881 9089

E-mail address: prt5prepress@gmail.com

## “Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

### สารจากฉบับนี้

ท่านผู้อ่านและสมาชิกวารสาร Journal of Applied Animal Science (JAAS) ที่เคารพทุกท่าน

เนื่องในวาระดิถีขึ้นปีใหม่ พุทธศักราช 2569 ดิฉันในนามของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ขอส่งความปรารถนาดี และอวยพรให้ทุกท่านประสบแต่ความสุข ความเจริญ มีสุขภาพพลานามัยที่แข็งแรง และประสบความสำเร็จในภารกิจหน้าที่การงานทุกประการ

สำหรับวารสาร JAAS ฉบับปฐมฤกษ์ของปี Vol. 19 No. 1 (2026) นี้ ยังคงมุ่งเน้นการนำเสนอผลงานวิชาการที่มีคุณภาพและครอบคลุมหลากหลายสาขา ทั้งในด้านสรีรวิทยา พฤติกรรมสัตว์ การวิเคราะห์สารสำคัญในพืชสมุนไพร การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย ไปจนถึงรายงานสัตว์ป่วยที่หายได้ยาก เพื่อเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการ สัตวแพทย์ และบุคลากรในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ โดยเนื้อหาในฉบับประกอบด้วยบทความที่น่าสนใจ ดังนี้:

**ด้านพฤติกรรมสัตว์และการผลิต:** การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับอารมณ์และพฤติกรรมการเลียลูกของแม่โคเนื้อ กัมแพงแสน ซึ่งพบว่าแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีประสิทธิภาพในการเลียลูกให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นได้ดีกว่ากลุ่มอารมณ์รุนแรง

**ด้านโภชนศาสตร์และสารธรรมชาติ:** การวิเคราะห์เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและวิตามินของใบพืชสมุนไพรในไนจีเรีย 7 ชนิด เพื่อประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

**ด้านการพัฒนาการวินิจฉัย:** การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจ Brucellosis Antibodies ในแพะด้วยวิธี Lateral Flow Immunoassay ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการและเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองในภาคสนาม

**รายงานสัตว์ป่วย (Case Report):** การนำเสนออุบัติการณ์ของภาวะแคลเซียมต่ำที่เกิดขึ้นล่าช้าหลังการผ่าตัดในสุนัขที่เป็นมะเร็งต่อมพาราไทรอยด์ ซึ่งเน้นย้ำถึงความสำคัญของการติดตามอาการอย่างใกล้ชิดแม้จะพ้นระยะพักฟื้นเบื้องต้นไปแล้ว

**ด้านพยาธิวิทยาเชิงเปรียบเทียบ:** การรวบรวมข้อมูลอุบัติการณ์รอยโรคที่เกิดขึ้นเองในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิง (Historical Control Data) สำหรับการแปลผลทางจุลพยาธิวิทยาในงานวิจัยทางพิษวิทยาอย่างถูกต้อง

ดิฉันขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ร่วมแบ่งปันองค์ความรู้ รวมถึงกองบรรณาธิการและผู้ทรงคุณวุฒิที่ร่วมผลักดันให้วารสารฉบับนี้มีความสมบูรณ์ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเนื้อหาในฉบับนี้จะเป็นแรงบันดาลใจและเป็นแนวทางในการพัฒนางานด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์และการผลิตสัตว์ต่อไปอย่างยั่งยืน

รองศาสตราจารย์ ดร.สัตวแพทย์หญิงวลาลีณี สักดิ์คำดวง

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

# “Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

ปีที่ 19 ฉบับที่ 1 มกราคม-มิถุนายน 2569

Vol. 19 No. 1 January-June 2026

## สารบัญ

### Editor's Note

ชนศักดิ์ ช่างบรรจง

7

### Research Article

Relationship between Temperament and Nursing Behaviors on Body Weight Gain at 72 Hours Postpartum of Kamphaengsaen Beef Cattle 9

*Phonthep Puthanawong, Jamroen Thiengtham, Panwadee Sopannarath*

Comparative Analysis of Phytochemical, Proximate, and Vitamin Composition of Selected Nigerian Medicinal Leaves 24

*Oluwaseyi Phebian Aluko, Patience Olusola Fakolade, Johana Oluseyi Omiwole, Gbenga Oyewole Atoyebi*

Diagnostic Performance of Lateral Flow Immunoassay for Detecting Brucellosis Antibodies in Goats 37

*Phitcha Pongphitcha, Kanticha Wongsittigorn, Nuttakarn Meedeche, Phornnipha Charoenwisedsin, Teewara Charoensakdi, Pattranit Boonserm, Suporn Thongyuan, Niorn Ratanapob*

### Case Report

Delayed Hypocalcemia Post-Parathyroidectomy in a Dog with Parathyroid Carcinoma 46

*Alisa Saelee, Sukanya Manee-in, Wichayaporn Athikanon, Rungrote Osathanon*

### Research Article

Retrospective Study of the Incidence of Spontaneous Nonneoplastic Lesions in Wistar Rats (Mlac:WR) from 90-Day Oral Gavage Studies 58

*Chinnadit Ngamwongronnchai, Nuntalak Keawsa-Ard, Ganyawee Rittisorntanoo*

### Erratum

Erratum to Quality Evaluation of Chicken Powder from Broiler Chicken Fed Abattoir Wastes in Their Diet 75

*Oluwaseyi Phebian Aluko, Patience Olusola Fakolade, Ayodeji Oluwatosin Adedire, Afeez Adeleke Adegoke*

## คำแนะนำสำหรับผู้แต่ง

### “Journal of Applied Animal Science” (JAAS)

วารสารสัตวศาสตร์ประยุกต์เป็นวารสารวิชาการราย 6 เดือน (2 ฉบับต่อปี เดือนมกราคม-มิถุนายน และเดือน กรกฎาคม-ธันวาคม) ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เผยแพร่ผลงานวิจัยครอบคลุมสาขาวิชาทั้งสัตวแพทยศาสตร์ และสัตวศาสตร์ ตั้งแต่พื้นฐานถึงระดับโมเลกุล รวมถึงรายงานทางคลินิก บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารต้องผ่านการประเมิน โดยผู้ทรงคุณวุฒิ อย่างน้อย 2 ท่าน ในรูปแบบ double-blind peer review

ผู้สนใจส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารสัตวศาสตร์ประยุกต์กรุณาปฏิบัติตามข้อแนะนำและส่งพร้อมจดหมายนำ

1. **ประเภทบทความ** ที่รับพิจารณาได้แก่ รายงานการวิจัย รายงานฉบับย่อ บทความปริทัศน์และรายงานทางคลินิกเขียนด้วยภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ แต่บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

2. **การส่ง** ส่งบทความต้นฉบับด้วยไฟล์ MS-Word หรือซอฟต์แวร์ที่ใช้แทนกันได้ผ่านทางportalลงทะเบียนและเข้าสู่ระบบที่หน้าเว็บไซต์, [https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas\\_muvs/about/submissions](https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs/about/submissions).

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

4. **ส่วนประกอบ** รายงานการวิจัยต้องประกอบด้วยหน้าแรก (ได้แก่ ชื่อเรื่อง ชื่อผู้แต่ง สถานที่ทำงานและที่อยู่ ชื่อผู้แต่งหลักพร้อมที่อยู่ติดต่อได้และอีเมล พิมพ์ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) บทคัดย่อ (สั้นกระชับได้ใจความและคำสำคัญ 4-5 คำ) บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการวิจัย วิเคราะห์ การตีพิมพ์และเอกสารอ้างอิง

ก. **รายงานฉบับย่อและรายงานทางคลินิก** อาจเขียนโดยไม่แยกหัวข้อ หรืออาจรวมส่วนผลการวิจัยและวิจารณ์เป็นหัวข้อเดียว

ข. **บทความปริทัศน์** ควรเริ่มด้วยบทนำ แล้วบรรยาย โดยแยกตามหัวข้อที่ต้องการนำเสนอ พร้อมบทสรุป

5. **ตาราง-รูปภาพ** ตารางและรูปภาพให้แทรกไว้ท้ายสุดของบทความ คำบรรยายตารางพิมพ์ด้านบน คำบรรยายรูปภาพพิมพ์ใต้ภาพ และมีหมายเลขอาระบิกกำกับตามลำดับการอ้างถึง ตารางควรเข้าใจได้ง่าย ให้ส่งรูปภาพความละเอียดสูงแยกต่างหากมาพร้อมด้วย

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

กัมภีร์ กอธีระกุล, เทอด เทศประทีป, วรา พานิชเกรียงไกร, โสมทัต วงศ์สว่าง, วราภรณ์ แซ่ลี, สมศักดิ์ ภัคศิริภรณ์. การสำรวจพบเชื้อ *อี.โคไล* ซีโรไทป์ K88 จากลูกสุกรวัยคอกนมและหลังหย่านม. *เวชศาสตร์สัตวแพทย์*. 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](https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs)

อีเมลบรรณาธิการวารสาร [editor.jaas2020@gmail.com](mailto:editor.jaas2020@gmail.com)

ที่อยู่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 999 ถนนพหลโยธิน ซอย 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 2 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:** The submission file is in MS-Word format or compatible software. Submission via register and login to the submission website, [https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas\\_muvs/about/submissions](https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs/about/submissions).

**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 4-5 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 fomats of both in-test 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 aphabetically 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. 9<sup>th</sup> 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 19<sup>th</sup> 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](https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs)

**Editor-in-Chief email:** [editor.jaas2020@gmail.com](mailto:editor.jaas2020@gmail.com)

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

---



---

*Editor Note*

---



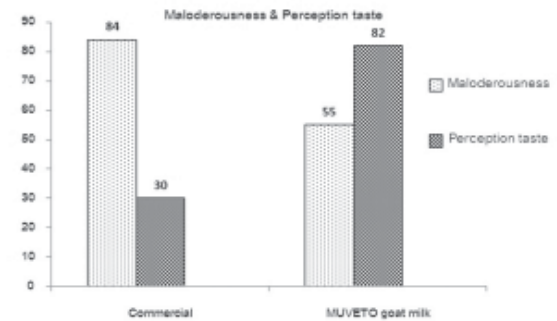
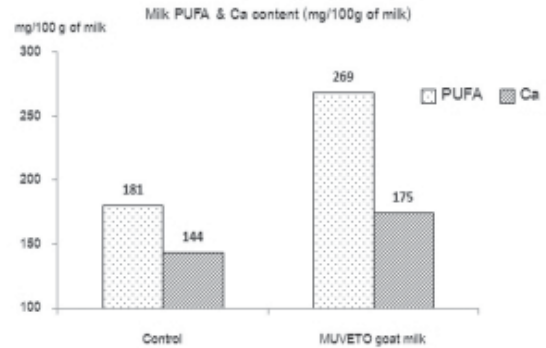
---

สวัสดิ์ท่านผู้อ่านและสมาชิกวารสาร Journal of Applied Animal Science (JAAS) ทุกท่าน วารสารฉบับนี้เป็นฉบับแรกของปีที่ 19 พ.ศ. 2569 ซึ่งนับเป็นอีกหนึ่งก้าวสำคัญของวารสาร ภายหลังจากการใช้รูปแบบหน้าปกเดิมมาอย่างต่อเนื่องยาวนานถึง 18 ปี กองบรรณาธิการจึงได้ปรับเปลี่ยนรูปแบบหน้าปกใหม่ เพื่อสะท้อนถึงความทันสมัยและพัฒนาการของวารสาร ควบคู่ไปกับการเพิ่มจำนวนบทความในแต่ละฉบับ เพื่อให้ผู้อ่านได้รับองค์ความรู้และข้อมูลทางวิชาการที่หลากหลาย ครบถ้วน และเข้มข้นยิ่งขึ้น

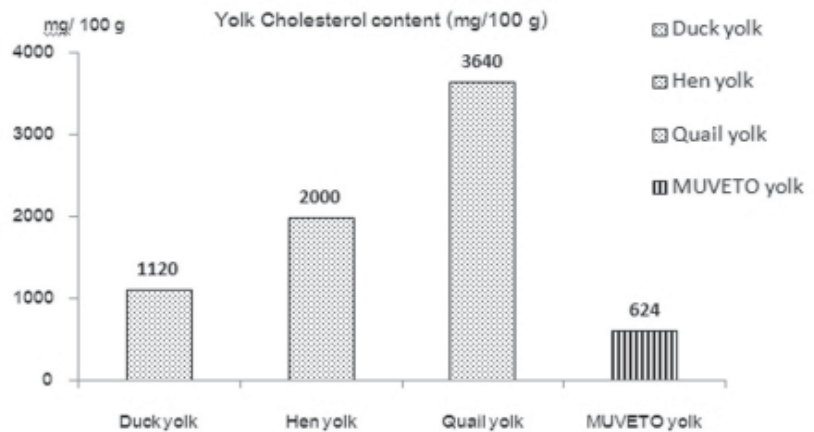
ในโอกาสนี้ ทางวารสารขอแสดงความยินดีกับ รศ.ดร.สพ.ญ.อาภรณ์ ลีสมบูรณ์ รศ.สพ.ญ.ดร.ทักษอร ดวงอุไร ผศ.ดร.สพ.ญ.รชชงค์ บุญฤทธิชัยกิจ ผศ.ดร.สุรศักดิ์ จิตตะโคตร และ สพ.ญ.วรัญธร อุทาสิน ที่ได้รับการคัดเลือกเป็นผู้ทรงคุณวุฒิดีเด่นระดับวารสาร (Reviewer Recognition and Certificate by Editor: RRC-E) ประจำปี พ.ศ. 2568 ซึ่งความทุ่มเทและความเชี่ยวชาญของผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการยกระดับคุณภาพของบทความและเสริมสร้างมาตรฐานทางวิชาการของวารสารอย่างต่อเนื่อง

สำหรับวารสารฉบับนี้ ประกอบด้วยบทความวิจัยจำนวน 4 เรื่อง ได้แก่ (1) ความสัมพันธ์ระหว่างระดับอารมณ์กับพฤติกรรมการเลียลูกต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมงหลังคลอดในลูกโคเนื้อกำแพงแสน (2) Comparative Analysis of Phytochemical, Proximate, and Vitamin Composition of Selected Nigerian Medicinal Leaves (3) ประสิทธิภาพของชุดตรวจอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดไหลในแนวราบในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรค布鲁เซล ไลซิสนิแพะ และ (4) การศึกษาแบบย้อนหลังของอุบัติการณ์รอยโรคที่เกิดขึ้นเองชนิดไม่ใช่เนื้องอกในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Mlac:WR) จากการทดสอบการได้รับสารทางปาก 90 วัน รวมถึงรายงานสัตว์ป่วยจำนวน 1 เรื่อง คือ ภาวะแคลเซียมต่ำที่เกิดขึ้นล่าช้าหลังการผ่าตัดต่อมพาราไทรอยด์ในสุนัขที่เป็นมะเร็งต่อมพาราไทรอยด์ ทำให้นักบรรณาธิการขอเชิญชวนนักวิจัย คณาจารย์ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ส่งผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพมาร่วมเผยแพร่ เพื่อร่วมกันพัฒนาองค์ความรู้และขับเคลื่อนวงการวิชาการด้านสัตวแพทยศาสตร์และสัตวศาสตร์ของประเทศต่อไป

**รองศาสตราจารย์ ดร.นายสัตวแพทย์ธนศักดิ์ 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.



# Relationship between Temperament and Nursing Behaviors on Body Weight Gain at 72 Hours Postpartum of Kamphaengsaen Beef Cattle

Phonthep Puthanawong<sup>1\*</sup>, Jamroen Thiengtham<sup>1</sup>, Panwadee Sopannarath<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, Western University, Thailand

<sup>2</sup>Department Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Thailand

\*Corresponding author, E-mail address: Puthanawong@gmail.com

Received: 22 September 2025; Revised: 11 November 2025; Accepted: 12 November 2025

## Abstract

Temperament is a physiological component that influences behavioral expression and productivity related to nursing behaviors. This study aimed to investigate the relationship between temperament and nursing behaviors on body weight gain at 72 hours postpartum in Kamphaengsaen beef cattle. A total of 20 Kamphaengsaen beef cows were used in the study. Temperament was assessed using the chute test and exit velocity test, and the results were used to classify the cattle according to their temperament characteristics as calm and ill-tempered. Eight calm cows and twelve ill-tempered cows were identified. After grouping, the cows were entered into the estrus synchronization program and mated using artificial insemination to study the relationship between nursing behavior and calf weight gain at 72 hours postpartum. The results showed that ill-tempered cattle had earlier calving-to-calf contact and calving-to-calf licking after parturition compared to calm cows. They also had a significantly higher rate of approaching their calves than calm cows ( $p < 0.01$ ). Analysis of the relationship between maternal behavior and calf behavior at 72 hours postpartum revealed a statistically significant positive correlation ( $p < 0.01$ ). Furthermore, the study found that calves raised by calm cows had greater weight gain at 72 hours postpartum than calves raised by ill-tempered cows.

**Keywords:** Beef cattle, Temperament, Calm and ill-tempered, Nursing behaviors

# ความสัมพันธ์ระหว่างระดับอารมณ์กับพฤติกรรมการเลียลูกต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมงหลังคลอดในลูกโคเนื้อกำแพงแสน

พรเทพ พุทชนวงศ์<sup>1\*</sup>, จำริญ เทียงธรรม<sup>1</sup>, พรรวณดี โสพรรณรัตน์<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สาขาสัตวบาลและพื้นฐานวิชาชีพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น ประเทศไทย

<sup>2</sup>สาขาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

\*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: Puthanawong@gmail.com

Received: 22 September 2025; Revised: 11 November 2025; Accepted: 12 November 2025

## บทคัดย่อ

สภาวะอารมณ์เป็นปัจจัยทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการให้ผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการเลียลูก หลังคลอดของโค การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับอารมณ์กับพฤติกรรมการเลียลูกต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมงหลังคลอดในลูกโคเนื้อกำแพงแสน การศึกษาใช้โคเนื้อกำแพงแสนจำนวน 20 ตัว ทดสอบอารมณ์โคโดยวิธีการทดสอบอารมณ์ในช่องบังคับ (Chute test) และการวัดความเร็วออกจากช่องบังคับ (Exit velocity test) และนำผลการทดสอบอารมณ์มาจัดกลุ่มโคตามลักษณะอารมณ์ได้แก่ โคที่มีอารมณ์สงบและโคที่มีอารมณ์รุนแรง โดยโคที่มีอารมณ์สงบมีจำนวน 8 ตัว และโคที่มีอารมณ์รุนแรงมีจำนวน 12 ตัว หลังการจัดกลุ่ม โคจะเข้าสู่โปรแกรมการชิงโครในซัดและผสมพันธุ์ด้วยวิธีการผสมเทียมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของพฤติกรรมการเลียลูกที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า แม่โคกลุ่มที่มีอารมณ์รุนแรงมีปฏิสัมพันธ์กับลูกโคและเลียลูกโคหลังคลอดเร็วกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบ รวมถึงมีจำนวนครั้งในการเข้าหาลูกโคมากกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพฤติกรรมของแม่โคและพฤติกรรมลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดพบว่า มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) นอกจากนี้ ผลการศึกษายังพบว่า ความสัมพันธ์ของพฤติกรรมแม่โคที่มีสภาวะอารมณ์แตกต่างกัน แม่โคที่มีอารมณ์สงบสามารถเลียลูกให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมงมากกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรง

คำสำคัญ: โคเนื้อ สภาวะอารมณ์ อารมณ์สงบและอารมณ์รุนแรง พฤติกรรมการเลียลูก

## บทนำ

พฤติกรรมโคมีความแตกต่างหรือเหมือนกันของพฤติกรรมที่แสดงออก ขึ้นอยู่กับสิ่งเร้าและประสบการณ์ของโคแต่ละตัว ปัจจุบันมีคำศัพท์ที่ใช้เรียกแทนพฤติกรรมที่สัตว์แสดงออกว่า อารมณ์ (Marçal-Pedroza et al., 2020) การศึกษาของ Finkemeier et al. (2018) แสดงให้เห็นว่าอารมณ์มีความเกี่ยวข้องกัน โดยตรงกับพฤติกรรมที่แสดงออกต่อสถานการณ์ ความกลัว สภาพการผลิต หรือการจัดการของมนุษย์ (Da Silva et al., 2024)

พฤติกรรม คือ การตอบสนองต่อสิ่งเร้าและสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติหรือเกิดจากการจัดการของมนุษย์ ปัจจัยที่ส่งผลต่ออารมณ์ในการแสดงออกผ่านพฤติกรรม คือ พันธุกรรม และสภาพแวดล้อม พันธุกรรมคือส่วนหนึ่งที่ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก (Acharya et al., 2022) สภาพแวดล้อมคือสิ่งที่จะทำให้สัตว์เรียนรู้ ปรับตัว และเป็นประสบการณ์ที่สัตว์ได้รับเพื่อการตอบสนองและแสดงออกมาเป็นพฤติกรรมในลักษณะต่าง ๆ (Brandão and cook 2021) ดังนั้นจึงมีความแตกต่างในการแสดงออกของพฤติกรรมถึงแม้จะเป็นสัตว์ชนิดหรือสายพันธุ์เดียวกันที่เป็นผลมาจากอารมณ์ของสัตว์เอง

การผลิตโคเนื้อผู้ผลิตคาดหวังการให้ลูกอย่างน้อย 1 ตัวต่อปีเพื่อเพิ่มมูลค่าและผลกำไรจากลูกโคเพื่อต่อขยายการผลิตภายในฟาร์ม (Ceballos et al., 2021) อัตราการรอดชีวิตของลูกโคส่วนใหญ่เป็นผลมาจากพฤติกรรมการเลี้ยงลูกหลังคลอดของแม่โค (Hogan et al., 2022) ซึ่งพฤติกรรมการเลี้ยงลูกโคหลังคลอดจะมีลักษณะพฤติกรรมต่าง ๆ ที่แม่โคแสดงต่อลูกโคระหว่างการเลี้ยงลูก (Orihuela and Galina 2021) เช่น การเลีย การดม การให้นมลูก และการปกป้องลูก พฤติกรรมดังกล่าวคือการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างแม่และลูกหลังคลอด (Whalin et al., 2021) พฤติกรรมการเลี้ยงลูกของแม่โคได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ฮอร์โมน สายพันธุ์ อายุ การจัดการ และสภาวะอารมณ์ของโคที่แตกต่างกัน (Neave et al., 2020) อารมณ์ของโคที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่ามีอิทธิพลต่อลักษณะพฤติกรรมของแม่โคในการเลี้ยงลูกหลังคลอดส่งผลต่อการได้รับนม น้ำเหลือง สุขภาพ การเพิ่มน้ำหนัก รวมถึงอัตราการรอดของลูกโคหลังคลอดที่มีต่อระบบการผลิตปศุสัตว์ที่คำนึงถึงประสิทธิภาพในการผลิตเป็นสำคัญ (Rutherford et al., 2018)

อารมณ์ของแม่โคมีผลต่อพฤติกรรมการเลี้ยงลูกหลังคลอดที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของลูกโคแรกเกิด (Hogan et al., 2022) หลังคลอดแม่โคจะสร้างปฏิสัมพันธ์กับลูกโคทันทีโดยการแสดงพฤติกรรมการเลียและดมซึ่งการแสดงพฤติกรรมดังกล่าวถูกกระตุ้นด้วยน้ำคร่ำที่ตัวลูกโคและการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในร่างกาย การเลียและการดมลูกโคหลังคลอดเพื่อกระตุ้นการหายใจและลดการสูญเสียความร้อนของตัวลูกโค ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวนำไปสู่การได้รับนม น้ำเหลืองหลังคลอดได้เร็วยิ่งขึ้น ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของลูกโคหลังคลอดและน้ำหนักตัวลูกโคที่เพิ่มขึ้น (Wenker et al., 2020) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะศึกษาลักษณะของพฤติกรรมแม่โคและปัจจัยของอารมณ์ที่แตกต่างกันของโคที่ส่งผลต่อพฤติกรรมการเลี้ยงลูกของแม่โคที่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวของลูกโค 72 ชั่วโมงหลังคลอด

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การจัดการสัตว์ทดลอง

วางแผนการทดลองตามการจัดการผสมพันธุ์โคของสถานีวิจัยทับทวง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดพร้อมกันด้วยฮอร์โมน prostaglandin F2 alpha (PGF2 $\alpha$ ) และใช้เทคนิคการผสมเทียม (artificial insemination) ตามลำดับของโคที่เหนี่ยวนำ การทดลองใช้โคเพศเมียพันธุ์กำแพงแสน จำนวน 20 ตัว โคทุกตัวมีอายุ 3 ปีขึ้นไปและผ่านการมีลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว แม่โคแต่ละตัวมีน้ำหนักตัวมากกว่า 400 กิโลกรัมทุกตัวและมีคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายหลังคลอด (body condition score) 2.5-3 คะแนน (จากคะแนน 0-5) โคทุกตัวมีสุขภาพและกิบติผ่านการประเมินโดยวิธีการประเมินระดับการเคลื่อนไหวของโคหรือการประเมิน Locomotion score ทำการประเมินในขณะที่โคยืนและเดินร่วมกัน การทดลองนี้ได้รับอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ตามเอกสารอนุญาตเลขที่ UI-05314-2559 ผ่านการพิจารณาโดยฝ่ายมาตรฐานการวิจัยและศูนย์สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## การบันทึกข้อมูลอารมณ์และพฤติกรรมช่วงการจัดกลุ่มผสมพันธุ์ของโค

การบันทึกข้อมูลอารมณ์และพฤติกรรมแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ การบันทึกข้อมูลสภาวะอารมณ์ช่วงการจัดกลุ่มผสมพันธุ์ของโคและการบันทึกพฤติกรรมการเลี้ยงลูกของแม่โคหลังคลอด 72 ชั่วโมง การบันทึกข้อมูลการทดสอบอารมณ์ในชองบังคับและการประเมินความเร็วออกจากชองบังคับ เริ่มทำเมื่อโคถูกจัดเข้ากลุ่มผสมพันธุ์บันทึกข้อมูลของโคแต่ละตัวแบ่งออกเป็น 4 ครั้ง ครั้งที่ 1 บันทึกและเก็บข้อมูลก่อนเข้าโปรแกรมกระตุ้นการเป็นสัด ครั้งที่ 2 บันทึกและเก็บข้อมูลก่อนโคเข้ารับการผสมเทียม ครั้งที่ 3 บันทึกและเก็บข้อมูลก่อนตรวจการตั้งท้อง ครั้งที่ 4 บันทึกและเก็บข้อมูลหลังตรวจการตั้งท้อง

## การทดสอบอารมณ์ในชองบังคับ

การทดสอบอารมณ์ในชองบังคับใช้ 2 วิธีในการทดสอบ ได้แก่ การทดสอบอารมณ์ในชองบังคับ (Chute test) และการวัดความเร็วออกจากชองบังคับ (Exit velocity test) หลังการทดสอบอารมณ์ทั้ง 2 วิธี นำคะแนนอารมณ์และค่าความเร็วออกจากชองบังคับมาใช้ในการจัดกลุ่มอารมณ์ อ้างอิงรูปแบบและวิธีการจัดกลุ่มอารมณ์จากวิธีการของ Pomthep et al. (2022) แบ่งกลุ่มอารมณ์ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอารมณ์สงบ (calm cattle) และกลุ่มอารมณ์รุนแรง (ill-tempered cattle)

## ทดสอบอารมณ์ในชองบังคับ (Chute test)

การทดสอบอารมณ์ในชองบังคับ การทดสอบมีผู้ร่วมทดสอบ 3 คน ผู้ร่วมทดสอบคนที่ 1 ทำหน้าที่ในการบันทึกวิดีโอ ผู้ร่วมทดสอบคนที่ 2 เป็นผู้ควบคุมการปล่อยโคจากชองบังคับเข้าชองทดสอบอารมณ์และผู้ร่วมทดสอบคนที่ 3 ทำหน้าที่สังเกตพฤติกรรมโคระหว่างการทดสอบและทำหน้าที่ในการเปิดประตูชองทดสอบหลังการทดสอบเสร็จสิ้น เริ่มต้นการทดสอบโดยการนำโคเข้ามาในช่องทางเดินเพื่อพักโคก่อนเริ่มการทดสอบ 1 นาทีทุกตัว หลังพักโคในชองพักจะปล่อยโคเข้าชองทดสอบอารมณ์ซึ่งมีขนาด กว้าง 0.8 × ยาว 2.0 × สูง 1.6 เมตร หลังโคเข้าชองทดสอบจะปิดประตูด้านหลังและเริ่มการทดสอบโดยสังเกตพฤติกรรมแม่โคและเริ่มจับเวลาจนครบ 60 วินาที หลังครบ 60 วินาทีจะเปิดประตูเพื่อให้โคออกจากชองทดสอบ

ขณะที่โคอยู่ในชองทดสอบอารมณ์จะสังเกตลักษณะที่โคแสดงออกผ่านพฤติกรรมของโคด้วยตาเปล่า โดยให้คะแนนอารมณ์ที่โคแสดงออกผ่านพฤติกรรม เกณฑ์การให้คะแนน (Chute score, CS) แบ่งออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ ระดับที่ 1 ยืนนิ่งและเคลื่อนที่ช้า ระดับที่ 2 เคลื่อนที่บ่อย และจะไม่หยุดนิ่งนาน ระดับที่ 3 พยายามออกจากชองทดสอบหรือเดินไปเอาหัวชนประตูหน้า ระดับที่ 4 ไม่อยู่นิ่ง คืบ เคลื่อนที่เดินหน้าและถอยหลัง และส่งเสียงร้อง ระดับที่ 5 อารมณ์รุนแรง ส่งเสียงร้อง คืบ และพยายามออกจากชองทดสอบ คะแนนอารมณ์อิงตามคะแนนชองทดสอบทั้ง 5 ระดับ หลังการทดสอบอารมณ์ในชองบังคับจะนำคะแนนอารมณ์ทั้ง 4 ครั้งที่ได้จากการทดสอบของโคมาหาค่าเฉลี่ยคะแนนอารมณ์ของโคแต่ละตัว เพื่อนำค่าคะแนนอารมณ์ที่ได้มาเป็นเกณฑ์จัดกลุ่มโค ตามผลคะแนนอารมณ์จัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโคที่มีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับต่ำ 1-2 คะแนน และกลุ่มโคที่มีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับสูง 3-5 คะแนน

## การวัดความเร็วออกจากชองบังคับ (Exit velocity test)

การวัดค่าความเร็วออกจากชองบังคับ เริ่มทดสอบหลังจากการทดสอบอารมณ์ในชองบังคับทันที โดยจะติดตั้งกล้องเพื่อบันทึกวิดีโอขณะที่โคเคลื่อนที่ออกจากชองทดสอบอารมณ์ ผู้ทดสอบเปิดประตูให้โคเข้ามาในชองทดสอบขนาด กว้าง 1.2 × ยาว 2.9 × สูง 1.9 เมตร โดยระยะทางในการเดินออกจากชองทดสอบของโคเท่ากับ 2.9 เมตร ใช้วิธีการแบ่งระยะทางตามที่โคเดินผ่านซึ่งจะทำให้ความเร็วในการเดินออกเป็นเมตรต่อวินาที (m/s) ค่าความเร็วในการเดินผ่านของโคจะถูกจัดหมวดหมู่ช้าและเร็ว เนื่องจากความเร็วเริ่มต้นเท่ากับศูนย์จึงนำเวลาที่บันทึกได้จากการวัดความเร็วออกจากชองบังคับทั้งหมด 4 ครั้งมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยความเร็วออกจากชองบังคับ โดยระยะทางที่โคเคลื่อนที่หน่วยเป็นเมตร (m) หารด้วยระยะเวลาทั้งหมดที่โคเคลื่อนที่หน่วยเป็นวินาที (s) ค่าที่ได้จะออกมาเป็นค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของโค (EV) เพื่อแบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโคที่เดินออกช้า ค่าความเร็วเฉลี่ยอยู่ที่ 0.1-0.25 เมตรต่อวินาที และกลุ่มโคที่เดินออกเร็ว ค่าความเร็วเฉลี่ยอยู่ที่ 0.3 เมตรต่อวินาที ขึ้นไป การหาค่าความเร็วในการเดินออกของโคมีสูตรคำนวณดังนี้

$$EV = S/t$$

EV คือ อัตราเร็วหน่วยเป็นเมตรต่อวินาที (m/s)

S คือ ระยะทางที่วัตถุเคลื่อนที่หน่วยเป็นเมตร (m)

t คือ ระยะเวลาทั้งหมดที่วัตถุเคลื่อนที่หน่วยเป็นวินาที (s)

หลังทดสอบอารมณ์ของบังกัปและประเมินค่าความเร็วออกจากของบังกัปจะนำผลทดสอบที่ได้มาจัดกลุ่มโคโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มโคที่มีอารมณ์สงบ (Calm cattle) กลุ่มโคที่มีอารมณ์สงบ คือ กลุ่มโคที่มีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับต่ำ 1-2 คะแนน และมีลักษณะพฤติกรรมขณะทดสอบอารมณ์ขึ้นนิ่งและเคลื่อนที่ช้า และมีค่าเฉลี่ยความเร็วออกจากของบังกัปอยู่ที่ 0.1-0.25 เมตรต่อวินาที

กลุ่มโคที่มีอารมณ์รุนแรง (Ill-tempered cattle) คือกลุ่มโคที่มีคะแนนอารมณ์ 3-5 คะแนนและมีลักษณะพฤติกรรมพยายามออกจากของทดสอบ ไม่อยู่นิ่ง คิ้น ส่งเสียงร้อง อารมณ์รุนแรง และมีค่าเฉลี่ยความเร็วออกจากของบังกัปอยู่ที่ 0.3 เมตรต่อวินาทีขึ้นไป

วิเคราะห์คะแนนอารมณ์และค่าความเร็วออกจากของบังกัปที่ทดสอบทั้ง 4 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยของคะแนนอารมณ์และค่าเฉลี่ยความเร็วออกจากของบังกัป และนำมาใช้แบ่งกลุ่มคะแนนอารมณ์ ต่ำ และ สูง และความเร็วออกจากของบังกัป ช้า และ เร็ว วิเคราะห์โดยใช้ชุดคำสั่ง PROC MEANS วิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS 2014)

### การบันทึกพฤติกรรมช่วงการเลี้ยงลูกหลังคลอด

การบันทึกข้อมูลพฤติกรรมเลี้ยงลูกเป็นการบันทึกพฤติกรรมปฏิสัมพันธ์ระหว่างแม่โคและลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมง หลังคลอด เก็บข้อมูลตามลำดับการคลอด ลักษณะโรงเรือนแบบปล่อยอิสระในคอกระบายอากาศแบบธรรมชาติ จำนวน 3 โรงเรือน ขนาดของโรงเรือน 15 × 25 เมตร (กว้าง × ยาว) และภายในโรงเรือนถูกแบ่งเป็นคอกพักโคจำนวน 5 คอก ขนาด 3 × 5 เมตร (กว้าง × ยาว) แต่ละโรงเรือนมีรางอาหารหน้าคอกขนาด 1 × 25 เมตร (กว้าง × ยาว) แต่ละคอกมีภาชนะใส่น้ำสะอาดจำนวน 1 ภาชนะต่อ

1 คอก แขนวแร่ธาตุชนิดก้อนจำนวน 1 ก้อนต่อ 1 คอก โคได้รับอาหารข้นสำหรับโคตั้งท้องและเลี้ยงลูก (สูตรโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 14 ไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 2 เยื่อใยไม่เกินร้อยละ 13 ความชื้นไม่เกินร้อยละ 13) วันละ 1 ครั้ง ปริมาณ 1.5 กิโลกรัมต่อตัว มีหญ้าสดเพียงพอสำหรับโคและมีแสงสว่างเพียงพอให้โคได้มองเห็น

### การบันทึกข้อมูลพฤติกรรม 72 ชั่วโมง

บันทึกข้อมูลพฤติกรรมจากการติดตั้งกล้องวิดีโอ ระยะห่างระหว่างกล้องและโคอยู่ห่างกันไม่น้อยกว่าสองเมตร เพื่อให้ไม่ได้รับกวนพฤติกรรมตามธรรมชาติของโคช่วงเลี้ยงลูกหลังคลอด กล้องรุ่น Xiaomi Outdoor Camera AW300 White จำนวน 5 ตัว ตำแหน่งที่ติดตั้งติดตั้งบริเวณแนวหลังคาด้านหน้าคอกโดยปรับตำแหน่งให้เห็นการแสดงพฤติกรรมโค โดยกล้องจะถูกติดตั้งก่อนถึงวันกำหนดคลอดอย่างน้อย 5 วัน เพื่อบันทึกพฤติกรรมโคช่วงก่อนคลอดจนถึงหลังคลอดลูก 72 ชั่วโมง และบันทึกพฤติกรรมลูกโค หลังบันทึกพฤติกรรมครบ 72 ชั่วโมง ไฟล์วิดีโอบันทึกจะถูกนำมาวิเคราะห์พฤติกรรมจากภาพเคลื่อนไหวผ่านโน้ตบุ๊กคอมพิวเตอร์ แสดงดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 รวมถึงน้ำหนักลูกโคแรกคลอดและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 การบันทึกข้อมูลพฤติกรรมแม่โคหลังคลอด

พฤติกรรม	วิธีบันทึกพฤติกรรม
ระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอด (Calving to 1 <sup>st</sup> calf contact, CCC)	การเข้าหาลูกโคหลังคลอด สังเกตพฤติกรรมตั้งแต่แม่โคคลอดลูกโคจนถึงการเข้าหาลูกโคครั้งแรก โดยเริ่มสังเกตตั้งแต่ลูกโคคลอดออกมาจนกระทั่งแม่โคลุกขึ้นหรือหันมาสัมผัสลูกโคโดยการดมหรือเลีย บันทึกพฤติกรรมนับเป็นวินาที
การเลียกระตุ้นทำความสะอาดลูกโค (Calving to calf licking, CCL)	การเลียกระตุ้นทำความสะอาดลูกโค สังเกตพฤติกรรมตั้งแต่แม่โคเข้าหาลูกโคโดยการดมหรือสัมผัส ทำความสะอาดลูกโคจนถึงการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรก โดยบันทึกช่วงเวลาเป็นนาที
แม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (The cows approach the calves 72 hours, CAC72)	แม่โคเข้าหาลูกโค 72 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกพฤติกรรมตั้งแต่การเข้าหาลูกโคครั้งแรกหลังคลอดจนครบ 72 ชั่วโมง โดยเริ่มสังเกตตั้งแต่แม่โคเดินหรือหันตัวเข้าหาลูกโค การสัมผัสโดยการเลีย การดม หรือ การให้นม การเข้าหาลูกโค 1 ครั้ง นับเป็น 1 ครั้ง

ตารางที่ 2 การบันทึกพฤติกรรมลูกโคหลังคลอด

พฤติกรรม	วิธีการ
การลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (Time to 1 <sup>st</sup> stand, TFS)	การลุกขึ้นยืนของลูกโคเก็บข้อมูลตั้งแต่หลังคลอดจนถึงการขึ้นได้ครั้งแรกบันทึกช่วงเวลาเป็นนาที
ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (Time to 1 <sup>st</sup> suckling, TFSU)	ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก บันทึกข้อมูลพฤติกรรมตั้งแต่ช่วงลูกโคลุกขึ้นยืนครั้งแรกจนถึงปากลูกโคสัมผัสหัวนมแม่โคครั้งแรก บันทึกช่วงเวลาเป็นนาที
จำนวนครั้งการกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง (Suckling duration in 72 hours, SD72)	จำนวนครั้งการกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง บันทึกข้อมูลพฤติกรรมตั้งแต่ลูกโคกินนมครั้งแรกหลังคลอด โดยเริ่มนับจำนวนครั้งตั้งแต่ปากลูกโคสัมผัสหัวนมแม่โคจนปากลูกโคหลุดออกจากหัวนมแม่โค นับเป็น 1 ครั้ง
ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling duration, SD)	ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้ง บันทึกข้อมูลพฤติกรรมตั้งแต่ปากลูกโคสัมผัสหัวนมแม่โคและปากหลุดออกจากหัวนมแม่โคบันทึกเวลากินนมเป็นนาที
ระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling interval, SI)	ระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้ง บันทึกข้อมูลพฤติกรรมเริ่มจับเวลาตั้งแต่การกินนมครั้งที่ 1 จนถึงการเริ่มกินนมอีกครั้งของลูกโคในครั้งถัดไป บันทึกเวลาตามระยะห่างในการกินนมเป็นนาที

ตารางที่ 3 การบันทึกน้ำหนักลูกโคแรกคลอดและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง

น้ำหนักที่บันทึก	วิธีการ
น้ำหนักลูกโคแรกคลอด (Birth weight of calf, BWT)	น้ำหนักลูกโคแรกคลอด บันทึกน้ำหนักลูกโคหลังคลอด 2 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักเป็นกิโลกรัม
น้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง (Weight gain of calf in 72 hours, WGC72)	น้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักลูกโคอีกครั้งหลังครบ 72 ชั่วโมง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกโค นำน้ำหนักหลังคลอด 72 ชั่วโมงลบด้วยน้ำหนักแรกคลอด บันทึกน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็นกรัม

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

วิเคราะห์สหสัมพันธ์พฤติกรรมกรรมแม่โค พฤติกรรมลูกโค และน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมง เพื่อทดสอบสหสัมพันธ์ระหว่างค่าทดสอบดังกล่าว ข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ได้แก่ การเข้าหาลูกโคหลังคลอด การเลียกระตุ้นทำความสะอาดลูกโค แม่โคเข้าหาลูกโค 72 ชั่วโมง การลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรก ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก จำนวนครั้งการกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้ง ระยะเวลาของเวลาในการกินนมแต่ละครั้ง น้ำหนักลูกโคแรกคลอด น้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้ชุดคำสั่ง PROC COOR Linear Model Statistical Analysis System (SAS 2014)

วิเคราะห์ปัจจัยอิทธิพลของกลุ่มอารมณ์สงบและกลุ่มอารมณ์รุนแรงต่อพฤติกรรมกรรมแม่โค พฤติกรรมลูกโคและน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System มีโครงสร้างข้อมูลในการทดสอบทางสถิติดังสมการ (SAS 2014)

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$y_{ij}$  คือ ค่าสังเกตของพฤติกรรมที่ศึกษา ได้แก่ การเข้าหาลูกโคหลังคลอด การเลียกระตุ้นลูกโคทำความสะอาดลูกโค แม่โคเข้าหาลูกโค 72 ชั่วโมง การลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรก ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก จำนวนครั้งการกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง ระยะเวลาในการกินนม

ของลูกโคแต่ละครั้ง ระยะเวลาของเวลาในการกินนมแต่ละครั้ง น้ำหนักลูกโคแรกคลอด และน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง

$\mu$  = ค่าเฉลี่ยพฤติกรรม

$\tau_i$  = อิทธิพลของกลุ่มอารมณ์สงบและอารมณ์รุนแรง

$\varepsilon_{ij}$  = อิทธิพลอื่น ๆ ที่ไม่ได้พิจารณาในโมเดลทางสถิติมีการกระจายแบบ NID  $\sim (0, \sigma^2)$

**ผลการวิจัย**

การจัดกลุ่มอารมณ์ของโค 20 ตัวพบว่า มีโคที่มีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับต่ำ 1-2 คะแนน จำนวน 8 ตัว และโคที่มีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับสูง 3-5 คะแนน จำนวน 12 ตัว โคที่มีความเร็วออกจากชองบังคับอยู่ในระดับที่ช้า 0.1-0.25 เมตรต่อวินาที จำนวน 8 ตัว โคที่มีความเร็วออกจากชองบังคับอยู่ในระดับที่เร็ว 0.3 เมตรต่อวินาทีขึ้นไป จำนวน 12 ตัว โดยโคที่มีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับต่ำ 1-2 คะแนน จำนวน 8 ตัว และโคที่มีความเร็วออกจากชองบังคับ อยู่ในระดับที่ช้า 0.1-0.25 เมตรต่อวินาที จำนวน 8 ตัวคือโคตัวเดียวกัน รวมถึงโคมีคะแนนอารมณ์อยู่ในระดับสูง 3-5 คะแนน จำนวน 12 ตัวโคที่มีความเร็วออกจากชองบังคับอยู่ในระดับที่เร็ว 0.3 เมตรต่อวินาทีขึ้นไป จำนวน 12 ตัว คือโคตัวเดียวกัน ดังนั้นจากการแบ่งกลุ่มพบว่า โคที่มีอารมณ์สงบมีจำนวนโค 8 ตัวและโคที่มีอารมณ์รุนแรงมี จำนวน 12 ตัว แสดงดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคะแนนของบั้งคับ ความเร็วออกจากชองบั้งคับ และผลการจัดกลุ่มโคสงบและโคอารมณ์รุนแรง

	คะแนนของบั้งคับ	ความเร็วออกจากชองบั้งคับ (m/s)	จำนวนโค (ตัว)
กลุ่มอารมณ์สงบ	1.96 ± 0.41	0.23 ± 0.06	8
กลุ่มอารมณ์รุนแรง	3.58 ± 0.62	0.50 ± 0.17	12

**พฤติกรรมแม่โคและค่าเฉลี่ยโคกลุ่มอารมณ์สงบและโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง**

ผลการศึกษาพฤติกรรมแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบและกลุ่มอารมณ์รุนแรงพบว่าพฤติกรรมแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอด (CCC) โดยเฉลี่ยช้ากว่าโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $5.52 \pm 0.21$  และ  $3.20 \pm 0.18$  วินาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่าพฤติกรรมการเลียกระตุ้นลูกโคทำความสะอาดลูกโคตั้งแต่เริ่มจนถึงลูกโคสามารถลุกขึ้นยืนได้ครั้งแรก (CCL) ของแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีค่าเฉลี่ยเวลาในการเลียกระตุ้นนานกว่าโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $48.00 \pm 0.95$  และ  $38.53 \pm 0.78$  นาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพฤติกรรมแม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (CAC72) พบว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีจำนวนครั้งในการเข้าหาลูกโคน้อยกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $12.26 \pm 0.35$  และ  $19.18 \pm 0.30$  ครั้ง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงดังตารางที่ 5

**ค่าเฉลี่ยพฤติกรรมลูกโคของแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบและแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรง**

ค่าเฉลี่ยของพฤติกรรมลูกโคหลังคลอดการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (TFS) ในกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีค่าเฉลี่ยของเวลาในการลุกขึ้นยืนหลังคลอดช้ากว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรงเท่ากับ  $54.42 \pm 1.07$  และ  $47.11 \pm 0.94$  นาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ค่าเฉลี่ยระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (TFSU) ลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีค่าเฉลี่ยเวลาในการได้กินนมหลังคลอดช้ากว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $197.57 \pm 6.48$  และ  $121.22 \pm 5.71$  นาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ค่าเฉลี่ยการกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง (SD72) พบว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งในการกินนมหลังคลอด 72 ชั่วโมงมากกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $20.42 \pm 0.38$  และ  $17.11 \pm 0.34$  ครั้ง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ค่าเฉลี่ยระยะเวลาใน

**ตารางที่ 5** ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพฤติกรรมแม่ของโคที่อารมณ์สงบและแม่โคที่อารมณ์รุนแรง

พฤติกรรม	กลุ่มอารมณ์สงบ	กลุ่มอารมณ์รุนแรง	p-value
CCC	5.52 ± 0.21	3.20 ± 0.18	< 0.01
CCL	48.00 ± 0.95	38.53 ± 0.78	< 0.01
CAC72	12.26 ± 0.35	19.18 ± 0.30	< 0.01

**หมายเหตุ** ระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอด (Calving to 1<sup>st</sup> calf contact, CCC) การเลียกระตุ้นทำความสะอาดลูกโค (Calving to calf licking, CCL) แม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (The cows approach the calves 72 hours, CAC72)

การกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD) พบว่าลูกโคในกลุ่มโคอารมณ์สงบมีค่าเฉลี่ยเวลาในการกินนมแต่ละครั้งที่นานกว่าลูกโคในกลุ่มโคอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $26.00 \pm 0.71$  และ  $17.44 \pm 0.63$  นาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ค่าเฉลี่ยระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SI) พบว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีระยะห่างของการกินนมแต่ละครั้งโดยเฉลี่ยเร็วกว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $173.00 \pm 5.30$  และ  $216.33 \pm 4.68$  นาที ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงดังตารางที่ 6

### ค่าเฉลี่ยน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมงในกลุ่มโคกลุ่มอารมณ์สงบและโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง

น้ำหนักลูกโคแรกคลอด (BWT) โดยเฉลี่ยของลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีน้ำหนักแรกคลอดโดยเฉลี่ยน้อยกว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง เท่ากับ  $19.57 \pm 0.71$  และ  $21.00 \pm 0.62$  กิโลกรัม ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ค่าเฉลี่ยน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง (WGC72) ของลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมงมากกว่าลูกโคกลุ่มอารมณ์รุนแรงเท่ากับ  $814.28 \pm 30.06$  และ  $633.33 \pm 26.51$  กรัมตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 พฤติกรรมลูกโคในกลุ่มแม่โคที่สงบและกลุ่มแม่โคที่อารมณ์รุนแรง

พฤติกรรม	อารมณ์สงบ	อารมณ์รุนแรง	p-value
TFS	$54.42 \pm 1.07$	$47.11 \pm 0.94$	< 0.01
TFSU	$197.57 \pm 6.48$	$121.22 \pm 5.71$	< 0.01
SD72	$20.42 \pm 0.38$	$17.11 \pm 0.34$	< 0.01
SD	$26.00 \pm 0.71$	$17.44 \pm 0.63$	< 0.01
SI	$173.00 \pm 5.30$	$216.33 \pm 4.68$	< 0.01

หมายเหตุ การลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (Time to 1<sup>st</sup> stand, TFS) ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (Time to 1<sup>st</sup> suckling, TFSU) จำนวนครั้งการกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง (Suckling duration in 72 hours, SD72) ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้ง ในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling duration, SD) ระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling interval, SI)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมงของโคกลุ่มอารมณ์สงบและโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง

	กลุ่มอารมณ์สงบ	กลุ่มอารมณ์รุนแรง	p-value
BWT	$19.57 \pm 0.71$	$21.00 \pm 0.62$	< 0.01
WGC72	$814.28 \pm 30.06$	$633.33 \pm 26.51$	< 0.01

หมายเหตุ น้ำหนักลูกโคแรกคลอด (Birth weight of calf, BWT) ระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling interval, SI)

### สหสัมพันธ์ระหว่างพฤติกรรมแม่โค พฤติกรรมลูกโค และ น้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง

จากตารางที่ 8 พบว่า ระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอด (CCC) มีความสัมพันธ์กับการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (TFS) ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (TFSU) จำนวนครั้งที่ลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD72) ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD) และน้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง (WGC72) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) เท่ากับ 0.72, 0.86, 0.83, 0.83, 0.72 ตามลำดับ มีความสัมพันธ์เชิงแปรผกผันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$  และมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำกับระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SI) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.87 กล่าวคือ หากระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอดเร็วขึ้นทำให้ระยะเวลาในการกินนมแต่ละครั้งสั้นลง พฤติกรรมการเลียกระตุ้นลูกโคทำความสะอาดลูกโค (CCL) มีความสัมพันธ์กับการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (TFS) ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (TFSU) จำนวนครั้งที่ลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD72) ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD) และน้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง (WGC72) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ

0.74, 0.67, 0.63, 0.79, 0.69 ตามลำดับ มีความสัมพันธ์เชิงแปรผกผันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$  และมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำกับระยะห่างของเวลาการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SI) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.73 กล่าวคือ หากการเลียกระตุ้นลูกโคทำความสะอาดลูกโคหลังคลอดเกิดขึ้นเร็วทำให้ระยะห่างของเวลาการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดสั้นลงหรือหากการเลียกระตุ้นลูกโคทำความสะอาดลูกโคหลังคลอดเกิดขึ้นช้าทำให้ระยะห่างของเวลาการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดยาวนานขึ้น พฤติกรรมแม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (CAC72) มีความสัมพันธ์กับระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมง (SI) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.84 มีความสัมพันธ์เชิงแปรผกผันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$  และมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำกับการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (TFS) ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (TFSU) จำนวนครั้งที่ลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD72) ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (SD) และน้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง (WGC72) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.64, -0.89, -0.86, -0.85, -0.59 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$

ตารางที่ 8 สหสัมพันธ์ระหว่างพฤติกรรมแม่โค พฤติกรรมลูกโค และน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง

พฤติกรรม	TFS	TFSU	SD72	SD	SI	BWT	WGC72
CCC	0.72*	0.86*	0.83*	0.83*	-0.87*	-0.39 <sup>ns</sup>	0.72*
CCL	0.74*	0.67*	0.63*	0.79*	-0.73*	-0.36 <sup>ns</sup>	0.69*
CAC72	-0.64*	-0.89*	-0.86*	-0.85*	0.84*	0.40 <sup>ns</sup>	-0.59*

หมายเหตุ \*  $p < 0.01$ , ns = non-significant, ระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอด (Calving to 1<sup>st</sup> calf contact, CCC) การเลียกระตุ้นทำความสะอาดลูกโค (Calving to calf licking, CCL) แม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (The cows approach the calves 72 hours, CAC72) การลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด (Time to 1<sup>st</sup> stand, TFS) ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (Time to 1<sup>st</sup> suckling, TFSU) จำนวนครั้งที่การกินนมลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง (Suckling duration in 72 hours, SD72) ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้ง ในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling duration, SD) ระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling interval, SI) น้ำหนักลูกโคแรกคลอด (Birth weight of calf, BWT) ระยะห่างของเวลาในการกินนมแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด (Suckling interval, SI)

## อภิปรายผลการวิจัย

### พฤติกรรมแม่โคและค่าเฉลี่ยโคกลุ่มอารมณ์สงบและโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง

ผลการศึกษาพฤติกรรมแม่โคพบว่า แม่โคที่มีอารมณ์สงบมีระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอดช้ากว่าโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง ปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าหาลูกหลังคลอด เช่น ความเหนื่อยล้าจากการคลอดในกรณีที่ถูกโคมีขนาดตัวที่ใหญ่ ส่งผลต่อการคลอดที่อาจใช้ระยะเวลาานานจนทำให้แม่โคเข้าหาลูกโคช้าหลังคลอด (Perez et al., 2014) แต่จากผลการศึกษาไม่พบการคลอชากในแม่โคทั้งสองกลุ่ม แต่จะเป็นพฤติกรรมหยุดลุกนอนในแม่โค กลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบจะมีพฤติกรรมหยุดลุกนอนบ่อยกว่าแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรงซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ระยะเวลาในการคลอดล่าช้าและใช้เวลาในการคลอชากนานจนอาจทำให้แม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีความเหนื่อยล้าจากพฤติกรรมดังกล่าว เมื่อลูกโคคลอดออกมาจึงทำให้แม่โคที่มีอารมณ์สงบนอนพักก่อนและไม่ลุกขึ้นเพื่อเข้าหาลูกโคทันทีเหมือนกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง ซึ่งพฤติกรรมการเข้าหาลูกหลังคลอดมีผลต่อพฤติกรรมเลียกระตุ้นของแม่โค จากผลการศึกษาพบว่าแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีระยะเวลาในการเลียกระตุ้นลูกโคตั้งแต่หลังคลอดจนลูกโคขึ้นได้นานกว่าแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรงซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวเป็นการสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างแม่และลูก การเลียของแม่โคเป็นการช่วยกระตุ้นลูกโคให้หายใจและลดการสูญเสียความร้อนของลูกโค (Oribuela et al., 2021) พฤติกรรมดังกล่าวขึ้นอยู่กับความถี่ของการเข้าหาของแม่โคซึ่งแม่โคที่เข้าหาลูกโคบ่อยสามารถกระตุ้นให้ลูกโคลุกขึ้นเพื่อกินนมได้เร็วมากขึ้น (Nevard et al., 2023) จากตารางที่ 5 แสดงผลแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีจำนวนครั้งที่เข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดน้อยกว่าแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง พฤติกรรมเข้าหาลูกโคเกิดขึ้นบ่อยในช่วง 1 ชั่วโมงแรกหลังคลอด แม่โคที่เข้าหาลูกโคบ่อยจะช่วยกระตุ้นลูกโคจากการเลียและการสัมผัสจากแม่โคที่จะช่วยกระตุ้นให้ลูกโคยืนขึ้นหลังคลอดได้เร็วขึ้น (Meagher et al., 2019) การยืนของลูกโคหลังคลอดได้เร็วจะทำให้ลูกโคสามารถหาเต้านมและได้รับนม น้ำเหลืองหลังคลอดที่ทำให้ลูกโคมีอัตราการรอดสูงขึ้นจากการได้รับภูมิคุ้มกันจากนม น้ำเหลือง (Kour 2018)

### ค่าเฉลี่ยพฤติกรรมลูกโคของแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบและแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรง

จากผลการศึกษาพฤติกรรมลูกโคพบว่า ลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีระยะเวลาในการลุกขึ้นยืนครั้งแรกหลังคลอดช้ากว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรงซึ่งจากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรงมีพฤติกรรมการเลียกระตุ้นลูกโคตั้งแต่เริ่มจนถึงลูกโคลุกขึ้นได้ครั้งแรกเร็วกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบ รวมถึงพฤติกรรมการเข้าหาลูกโคของแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรงมีจำนวนครั้งมากกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบ ซึ่งทั้งสองพฤติกรรมที่แม่โคแสดงต่อลูกโคมีผลต่อการลุกขึ้นยืนและได้กินนมหลังคลอดของลูกโคหลังคลอด (Sims et al., 2023) ซึ่งพฤติกรรมการลุกขึ้นหลังคลอดของลูกโคจะมีผลต่อระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก (Oribuela et al., 2021) จากผลการศึกษาพบว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรกช้ากว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง ลูกโคที่ลุกขึ้นได้เร็วหลังคลอดสามารถกินนมได้เร็วกว่าลูกโคที่ลุกขึ้นช้ามีผลต่อการได้รับนม น้ำเหลืองมีผลต่อภูมิคุ้มกันลูกโคหลังคลอด (Turner et al., 2014) แต่ลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีระยะเวลาในการกินนมที่นานกว่าลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง รวมถึงระยะห่างในการกินนมแต่ละครั้งของลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบสั้นกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง ซึ่งระยะห่างในการกินนมแต่ละครั้งจะมีผลต่อจำนวนครั้งในการกินนมของลูกโคหลังคลอด (Wenker et al., 2020) ลูกโคกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบมีจำนวนครั้งในการกินนมหลังคลอด 72 ชั่วโมงมากกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง จำนวนครั้งในการกินนม ระยะเวลาในการกินนมแต่ละครั้ง และระยะห่างในการกินนมมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักลูกโคหลังคลอดซึ่งเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการเลียลูกของแม่โคหลังคลอด สอดคล้องกับการศึกษาของ Griffith and Williams (1996) ที่พบว่าลูกโคที่มีระยะเวลาในการกินนมที่นานจะมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังคลอดมากกว่าลูกโคที่มีระยะเวลาในการกินนมที่สั้นและอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะทำขึ้นให้ลูกโคกินนมที่มีผลต่อระยะเวลาในการกินนมแต่ละครั้ง (Fordyce et al., 2022) ลูกโคที่กินนมใน

ลักษณะทำขึ้นขนานข้างลำตัวแม่โคมีระยะเวลาในการกินนมที่นานกว่าลูกโคที่กินนมผ่านตรงกลางขาหลังแม่โค นอกจากนี้ Enriquez et al. (2011) รายงานว่าพฤติกรรมการเลียลูกของแม่โคมีผลต่อระยะเวลาในการกินนมที่มีผลต่อน้ำหนักลูกโคที่จะเพิ่มขึ้นหลังคลอดด้วย ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในระหว่างการคลอด มีความสำคัญต่อพฤติกรรมการเป็นแม่ การเลียลูก การปล่อยน้ำนม รวมถึงการสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างแม่โคและลูกโคหลังคลอด (Aitken 2011) ฮอร์โมนที่แสดงให้เห็นว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อพฤติกรรมการเลียลูกหลังคลอด เช่น ออกซิโทซิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนหลังของสมองมีผลต่อการหลั่งน้ำนม รวมถึงออกซิโทซินช่วยเพิ่มการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างแม่และลูกหลังคลอด (Fleming and Kraemer 2019) เช่น การแสดงพฤติกรรมการเป็นแม่การเลียลูกและการปล่อยน้ำนมที่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักของลูกโคหลังคลอด ซึ่งในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบถึงแม้จะมีจำนวนครั้งของการเข้าหาลูกหลังคลอด 72 ชั่วโมงน้อยกว่ากลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรงแต่มีช่วงระยะเวลาในการให้นมลูกโคแต่ละครั้งนานกว่าแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง ซึ่งส่งผลให้น้ำหนักลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบเพิ่มขึ้นมากกว่าในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง

### ค่าเฉลี่ยน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมงหลังคลอดในโคกลุ่มอารมณ์สงบและโคกลุ่มอารมณ์รุนแรง

จากผลการศึกษา น้ำหนักลูกโคแรกคลอดกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีน้ำหนักตัวแรกคลอดน้อยกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง Perez et al. (2014) กล่าวว่า สภาวะอารมณ์ที่แตกต่างกันของแม่โคไม่มีผลต่อน้ำหนักแรกคลอดของลูกโค แต่สายพันธุ์มีผลต่อขนาดตัวของลูกโคและมีผลต่อน้ำหนักแรกคลอด (Hoppe et al., 2010) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักโดยเฉลี่ย 72 ชั่วโมงหลังคลอดมากกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง สอดคล้องกับลักษณะพฤติกรรมของลูกโคในตารางที่ 5 ที่เกี่ยวข้องกับการเลียลูกที่แสดงให้เห็นว่าจำนวนครั้งในการกินนม ระยะเวลาในการกินนม และระยะห่างของการกินนมมีผลทำให้น้ำหนักตัวลูกโคเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดยจำนวนครั้ง

ในการกินนม ระยะเวลาในการกินนม รวมถึงระยะห่างในการกินนมของลูกโคเป็นผลมาจากพฤติกรรมการเลียลูกของแม่โค ดังผลในตารางที่ 5 แม่โคในกลุ่มอารมณ์สงบถึงแม้จะมีจำนวนครั้งในการเข้าลูกโคที่น้อยกว่าครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดแต่มีระยะเวลาในการเข้าหาแต่ละครั้งที่ประเมินได้จากระยะเวลาในการกินนมลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีระยะเวลาในการกินนมแต่ละครั้งนานกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้น้ำหนักลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์สงบเพิ่มขึ้นมากกว่าใน 72 ชั่วโมงหลังคลอด Homerosky et al. (2017) กล่าวว่าพฤติกรรมเลียลูกของแม่โคหลังคลอดมีผลต่ออัตราการเพิ่มของน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Johnsen et al. (2015) ที่พบว่าน้ำหนักลูกโคหลังคลอดที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากพฤติกรรมเลียลูกส่วนหนึ่ง อีกปัจจัยคือการผลิตน้ำนมของแม่โค แม่โคที่ให้นมสูงปริมาณน้ำนมที่เพียงพอต่อความต้องการของลูกโคมีผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด (Duve et al., 2012) และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rios et al. (2024) ที่รายงานว่าแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรงมีพฤติกรรมความเป็นแม่น้อยกว่าแม่โคที่มีอารมณ์สงบซึ่งมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักลูกโคหลังคลอด

### สหสัมพันธ์ระหว่างพฤติกรรมแม่โค พฤติกรรมลูกโค และน้ำหนักลูกโคที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมงหลังคลอด

สหสัมพันธ์ของระยะเวลาเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอดและการเลียกระตุ้นลูกโคของแม่โคมีความสัมพันธ์แปรผกผันกับการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก จำนวนครั้งลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด และน้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง ซึ่งพฤติกรรมการเข้าหาลูกโคและการเลียกระตุ้นลูกโคหลังคลอดมีผลต่อการสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างแม่โคและลูกโคหลังคลอด นอกเหนือจากการสร้างปฏิสัมพันธ์ยังมีผลต่อการลุกขึ้นยืนของลูกโคหลังคลอด ซึ่งแม่โคที่สามารถเลียกระตุ้นให้ลูกโคลุกขึ้นได้เร็วจะเพิ่มโอกาสให้ลูกโคได้รับนม น้ำเหลืองหลังคลอดเร็วเช่นกัน รวมถึงพฤติกรรมระยะเวลาเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอดและการเลียกระตุ้นลูกโคของแม่โคยังมีความสัมพันธ์

กับจำนวนครั้งลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด และระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด แต่การแสดงผลพฤติกรรมต่อลูกโคดังกล่าวขึ้นอยู่กับสภาวะอารมณ์ที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อระยะเวลาในการกินนมและจำนวนครั้งในการกินนมของลูกโค ซึ่งจำนวนครั้งในการกินและระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งจะมีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวของลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมง และพฤติกรรมระยะเวลาเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอดและการเลียกระตุ้นลูกโคของแม่โคมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือหากแม่โคมีพฤติกรรมระยะเวลาเข้าหาลูกครั้งแรกหลังคลอดช้าแต่อาจจะมีระยะห่างระหว่างการกินนมแต่ละครั้งสั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลในตารางที่ 6 ซึ่งพบว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีระยะเวลาเข้าหาลูกโคหลังคลอดช้ากว่าแม่โคในกลุ่มอารมณ์รุนแรงแต่มีระยะห่างของการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งสั้นกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคอารมณ์รุนแรง

สหสัมพันธ์พฤติกรรมแม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดมีความสัมพันธ์แปรผกผันกับระยะห่างของเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด จากค่าสหสัมพันธ์ดังกล่าวแม่โคที่มีจำนวนครั้งการเข้าหาลูกโคหลังคลอดมากจะทำให้ลูกโคมีโอกาสที่จะได้รับน้ำนมหลังคลอดเพิ่มขึ้นที่จะเกี่ยวข้องกับระยะห่างในการกินนมแต่ละครั้งสอดคล้องกับผลในตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าแม่โคในกลุ่มอารมณ์รุนแรงมีจำนวนครั้งในการเข้าหาลูกโคมากกว่ากลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบและมีระยะห่างระหว่างการกินนมแต่ละครั้งมากกว่าเช่นกัน ซึ่งระยะห่างของการกินนมของลูกโคที่มีช่วงเวลานานอาจทำให้ลูกโคได้รับน้ำนมไม่เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งการเข้าหาของแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรงที่บ่อยไม่ได้เป็นการให้นมลูกโคแต่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งเร้าและความต้องการจะปกป้องลูกโคจากอันตราย (Rogers 2023)

สหสัมพันธ์พฤติกรรมแม่โคเข้าหาลูกโคในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำกับการลุกขึ้นยืนของลูกโคครั้งแรกหลังคลอด ระยะเวลาจากลูกโคคลอดจนกินนมครั้งแรก จำนวนครั้งลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด และน้ำหนักลูกโคเพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมง จาก

ค่าสหสัมพันธ์สอดคล้องกับผลการศึกษาใน ตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6 แม่โคกลุ่มอารมณ์สงบมีจำนวนครั้งการเข้าหาลูกโคน้อยกว่าแม่โคกลุ่มอารมณ์รุนแรงแต่มีจำนวนครั้งลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดและระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดของลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมากกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักของลูกโคหลังคลอด 72 ชั่วโมงซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวหลังคลอดมากกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง ซึ่งจากตารางที่ 6 ค่าตารางสหสัมพันธ์ระหว่างพฤติกรรมแม่โคและลูกโค การเข้าหาลูกโคหลังคลอดจำนวนครั้งที่น้อยทำให้จำนวนครั้งลูกโคกินนมในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอด ระยะเวลาในการกินนมของลูกโคแต่ละครั้งในช่วง 72 ชั่วโมงหลังคลอดมากขึ้น เกี่ยวข้องกับลักษณะของอารมณ์ของแม่โคที่มีผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมดังกล่าวโดยตรง

## สรุป

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับอารมณ์กับพฤติกรรมการเลียลูกต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 72 ชั่วโมงหลังคลอดในลูกโคเนื้อกำแพงแสน พบว่า กลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีประสิทธิภาพในการเลียลูกหลังคลอด 72 ชั่วโมงมากกว่ากลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรง เนื่องจากแม่โคที่มีอารมณ์สงบมีลักษณะการแสดงออกของพฤติกรรมในลักษณะเชิงและไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าในลักษณะที่รุนแรงจนทำให้รบกวนพฤติกรรมการเลียลูก ในส่วนของกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรงถึงแม้จะมีลักษณะพฤติกรรมการเป็นแม่ที่ดีแต่ด้วยความที่แม่โคมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าเล็กน้อยตลอดเวลาซึ่งเป็นการแสดงพฤติกรรมปกป้องลูกตามธรรมชาติ การแสดงพฤติกรรมดังกล่าวจะทำให้รบกวนพฤติกรรมการเลียลูกแม่กระทั้งในช่วงที่ลูกโคกินนมซึ่งอาจทำให้ลูกโคได้รับน้ำนมไม่เพียงพอต่อความต้องการในช่วงเวลานั้น เป็นผลให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังคลอด 72 ชั่วโมงของลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์รุนแรงเพิ่มขึ้นน้อยกว่าลูกโคในกลุ่มแม่โคที่มีอารมณ์สงบ

## เอกสารอ้างอิง

- Acharya RY, Hemsworth PH, Coleman GJ, Kinder JE. The animal-human interface in farm animal production: animal fear, stress, reproduction, and welfare. *Animals*. 2022;12(4):487.
- Aitken B. Predicting maternal behaviour of beef cattle using temperament tests. Masters Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada; 2011.
- Brandão AP, Cooke RF. Effects of temperament on the reproduction of beef cattle. *Animals*. 2021;11(11):3325.
- Ceballos MC, Gois KCR, Sant'Anna AC, Wemelsfelder F, da Costa MP. Reliability of qualitative behavior assessment (QBA) versus methods with predefined behavioral categories to evaluate maternal protective behavior in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci*. 2021;236(1):105263.
- Da Silva WC, da Silva JAR, Martorano LG, da Silva ÉBR, Belo T.S, Neves KAL, et al. Characterization of the temperament and reactivity of Nelore cattle (*Bos indicus*) associated with behavior scores during corral management in the humid tropics. *Animals*. 2024;14(12):1769.
- Duve LR, Weary DM, Halekoh U, Jensen MB. The effects of social contact and milk allowance on responses to handling, play, and social behavior in young dairy calves. *J Dairy Sci*. 2012;95(11):6571-81.
- Enriquez D, Hotzel MJ, Ungerfeld R. Minimising the stress of weaning of beef. *Acta Vet Scand*. 2011;53(1):28-34.
- Finkemeier MA, Langbein J, Puppe B. Personality research in mammalian farm animals: concepts, measures, and relationship to welfare. *Front Vet Sci*. 2018;28(5):131.
- Fleming AS, Kraemer GW. Molecular and genetic bases of mammalian maternal behavior. *Genet Genome*. 2019;(3):1-14.
- Fordyce G, McCosker KD, Barnes TS, Perkins NR, O'Rourke PK, McGowan MR. Reproductive performance of northern Australia beef herds. 6. Risk factors associated with reproductive losses between confirmed pregnancy and weaning. *Anim Prod Sci*. 2022;63(4):365-77.
- Griffith MK, Williams GL. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biol Reprod*. 1996;54(4):761-8.
- Hogan LA, McGowan MR, Johnston SD, Lisle AT, Schooley K. Suckling behaviour of beef calves during the first five days postpartum. *Ruminants*. 2022;2(3):321-40.
- Hoppe S, Brandt HR, König S, Erhardt G, Gauly M. Temperament traits of beef calves measured under field conditions and their relationships to performance. *J Anim Sci*. 2010;88(6):1982-9.
- Homerovsky ER, Timsit E, Pajor EA, Kastelic JP, Windeyer MC. Predictors and impacts of colostrum consumption by 4 h after birth in newborn beef calves. *Vet J*. 2017;228:1-6.
- Johnsen JF, dePassille AM, Mejdell, CM, Boe KE, Grondahl AM, Beaver A, Rushen J, Weary DM. The effect of nursing on the cow-calf bond. *Appl Anim Behav Sci*. 2015;163:50-7.
- Kour H, Exploring the maternal behaviour of north Australian beef cattle using precision livestock management technologies. Ph.D. Thesis, Central Queensland University, Rockhampton, Australia; 2018.
- Marçal-Pedroza MG, Campos MM, Pereira LGR, Machado FS, Tomich TR, Paranhos da Costa MJR, et al. Consistency of temperament traits and their relationships with milk yield in lactating primiparous F1 Holstein-Gyr cows. *Appl Anim Behav Sci*. 2020;222(3):104881.

- Meagher RK, Beaver A, Weary DM, von Keyserlingk MA. Invited review: A systematic review of the effects of prolonged cow-calf contact on behavior, welfare, and productivity. *J Dairy Sci.* 2019;102(7):5765-83.
- Neave HW, Costa JHC, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Long-term consistency of personality traits of cattle. *R Soc Open Sci.* 2020;7(2):191849.
- Nevard RP, Pant SD, Broster JC, Norman ST, Stephen CP. Maternal behavior in beef cattle: The physiology, assessment and future directions-a review. *Vet Sci.* 2023;10(1):10.
- Orihuela A, Galina CS. The effect of maternal behavior around calving on reproduction and wellbeing of Zebu type cows and calves. *Animals.* 2021;11(11):3164.
- Perez L, Orihuela A, Corro M, Rubio I, Cohen A, Galina CS. Maternal protective behavior of zebu type cattle (*Bos indicus*) and its association with temperament. *J Dairy Sci.* 2014;92 (10):4694-700.
- Phonthep P, Jamroen T, Panwadee S. Measurement of temperament using chute test and exit velocity test in beef cattle. *KKU Vet J.* 2022;32(2):93-8.
- Rutherford W, Parish J, Smith T, Vann R, Strickland B. Effects of maternal behavior of crossbred beef cows at calving on adjusted 205-day calf weaning weights. *J Anim Sci.* 2018;96(3):106.
- Rios SLO, Lee C, Andrewartha SJ, Verdon M. Temperament of the dairy cow relates to her maternal behaviour in a pasture-based extended suckling system. *Appl Anim Behav Sci.* 2024;279:106400.
- SAS. University edition. SAS Institute Inc Cary NC; 2014.
- Sims M, Cauble RN, Powell J, Kegley B, Foote AP, Salak-Johnson JL, et al. Association of maternal temperament and offspring disposition on growth performance. *Transl anim sci.* 2023;7(1):1-9.
- Turner SP, Jack MC, Lawrence AB. Precalving temperament and maternal defensiveness are independent traits but precalving fear may impact calf growth. *J Anim Sci.* 2014;91(9):4417-25.
- Wenker ML, Bokkers EAM, Lecorps B, Keyserlingk VMAG, Reenen VCC, Verwer CM, et al. Effect of cow-calf contact on cow motivation to reunite with their calf. *Sci Rep.* 2020;10(1):14233.
- Whalin L, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Understanding behavioural development of calves in natural settings to inform calf management. *Animals.* 2021;11(8):2446.

# Comparative Analysis of Phytochemical, Proximate, and Vitamin Composition of Selected Nigerian Medicinal Leaves

Oluwaseyi Phebian Aluko\*, Patience Olusola Fakolade, Johana Oluseyi Omiwole, Gbenga Oyewole Atoyebi

Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Production and Management, Osun State University

\*Corresponding author, E-mail address: oluwaseyi.aluko@uniosun.edu.ng

Received: 30 September 2025; Revised: 2 December 2025; Accepted: 3 December 2025

## Abstract

This study provides a comprehensive comparative analysis of seven underutilized Nigerian medicinal leaves that can be explored as preservatives in health-oriented meat products. Medicinal leaves are mostly cherished for their antioxidant and antimicrobial properties in the medical sector; these properties potentially establish medicinal leaves as promising natural preservatives against microbial spoilage and lipid oxidation in meat products. Therefore, this study evaluated the phytochemical, proximate, and vitamin composition of seven Nigerian medicinal leaves harvested in Ejigbo, Osun State, namely: stonebreaker (SBL), guava (GL), scent (SL), moringa (ML), lemongrass (LG), hospital-too-far (HL), and miracle leaves (MIL). The leaves were washed with clean water, shade-dried at room temperature (24 °C) for 7 days, and ground into a powdery form for analysis. Phytochemical results show that flavonoids were high in SL (72.46 mg), MIL (72.64 mg), and ML (75.03 mg) with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. SL (98.55 mg) and MIL (98.78 mg) exhibited the highest phenols with no significant difference. The highest saponin was observed in ML (36.13 mg) and MIL (37.55 mg). Results for proximate analysis show that MIL (22.68%), SL (31.13%), and HL (21.78%) had the highest crude protein with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. The highest fat was found in MIL (5.61 mg), while HL had the least content of moisture (4.35%). Vitamin E was highest in SL (52.96 mg) and ML (56.45 mg) with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. The highest concentration of vitamin A was found in MIL (22.76 mg), GL exhibited highest vitamin B<sub>1</sub> (1.47 mg), while SBL was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in vitamin D (35.08 mg). Phytochemical, proximate, and vitamin contents varied among medicinal leaves. Among the seven leaves, scent, moringa, and miracle consistently showed the highest concentrations of key phytochemicals, proximate, and vitamin contents.

**Keywords:** Medicinal leaves, Phytochemicals, Proximate, Vitamins

## Introduction

Meat products warrant the use of preservatives to minimize early spoilage caused by lipid oxidation and microbial growth. Over the years, synthetic preservatives have often been employed for these protective roles in the meat industry, however, their residual, toxicological, and carcinogenic effects are of great concern to the health of consumers (Hussain et al., 2019). This has suggested a shift to the use of medicinal leaves, as natural or plant-based preservatives owing to their phytochemical properties. Miranda (2021) defined medicinal leaves as leaves that are directly used as a part of the preparation for medicine to treat a certain condition, and in food as an antibacterial and antioxidant agents. Most of these medicinal plants are outstanding sources of chemical nutrients (such as protein, fat, and carbohydrate), mineral contents (calcium, potassium, iron, and phosphorus), and vitamins (A, B, C, D, and E), which are extremely beneficial to human body (Contini et al., 2014). In addition, medicinal leaves consist of arrays of bioactive compounds known as phytochemicals such as phenols, alkaloids, flavonoids, tannins, and saponins, which possess antioxidant, antimicrobial, anticancer, and antimutagenic properties (Aminzare et al., 2019; Falowo et al., 2014). Interestingly, medicinal leaves have been explored in the treatment of diverse disease conditions by many traditional medical specialists in Nigeria (Aborisade et al., 2017), and in the pharmaceutical industry as part of the preparation of some medical pills due to their phytochemicals (Wu et al., 2011).

*Moringa (Moringa oleifera)*, a member of the Moringaceae family, has been traditionally used to cure wounds, pain, ulcers, liver disease, heart disease, cancer, and inflammation (Gopinath et al., 2017). Scent leaves (*Ocimum gratissimum*), a member of Lamiaceae family, have been used to treat a variety of conditions such as aches, fever, asthma, inflammation, anemia, diarrhea, fungal, and bacterial infections (Shedoeva et al., 2019). *Bryophyllum pinnatum* (miracle leaf), which belongs to the Crassulaceae family, has been used to treat ear infections,

ulcer, cancer, cough, dysentery, blennorrhoea, syphilis, jaundice, candidiasis, dysmenorrhoea, external ulcers, burns, and convulsions (Akinpelu 2000). Hospital-too-far leaf (*Jatropha tanjorensis*) belongs to the family Euphorbiaceae, and it is known to show hematological, anti-malarial, antimicrobial, hypoglycemic, hypolipidemic, and antihypertensive activities (Ijoma et al., 2023). Lemongrass leaf (*Cymbopogon citratus*), belongs to the Poaceae family (Kiani et al., 2022) and the “citratus” indicates that it is a rich source of citric and ascorbic acids (Shah et al., 2011); it is often used in weight management and to lower cholesterol. Stonebreaker leaf (*Phyllanthus niruri*), a member of Euphorbiaceae, helps inhibit the formation of kidney stones (Jiraungkoorskul 2022). It is also used in the treatment of liver and kidney diseases, fever, jaundice, prostate issues, menstrual and uterus problems (Origbemisoye et al., 2025). Guava leaf (*Psidium guajava*) which belongs to the *Myrtaceae* family, is utilized in treating diarrhea, diabetes, stomach aches, gastrointestinal, and respiratory issues (Sahal et al., 2025).

The contribution of these medicinal leaves to the health status of humans cannot be over emphasized (Aborisade et al., 2017). While the individual properties of some of these leaves are known, a direct comparative study of their properties as potential meat preservatives is lacking. Therefore, this research evaluated the phytochemical, proximate, and vitamin compositions of selected Nigerian medicinal leaves that can be used as natural preservatives.

## Materials and methods

### Study Site

This study was carried out at the Faculty Scientific Laboratory, Faculty of Agricultural Production and Management, Department of Animal Science, Osun State University, Nigeria. The experiment was conducted during the rainy season (March – June, 2025) to ensure that fresh leaves were harvested.

### Sample collection (Medicinal leaves)

100 g of each medicinal leaf: *Moringa oleifera* (moringa leaves – ML), *Bryophyllum pinnatum* (miracle leaves – MIL), *Phyllanthus niruri* (stonebreaker leaves – SBL), *Cymbopogon citratus* (lemongrass – LG), *Jatropha tanjorensis* (hospital-too-far leaves – HL), *Ocimum gratissimum* (scent leaves – SL), and *Psidium guajava* (guava leaves – GL) were sourced from in and around Ejigbo, Osun State, Nigeria, and the samples were collected on the 17<sup>th</sup> of March, 2025.

### Identification of leaves

Selected leaves were botanically identified and authenticated using [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org) and [www.worldfloraonline.org](http://www.worldfloraonline.org). Furthermore, the final verification of the selected leaves was done at the Department of Botany, Faculty of Science, Obafemi Awolowo University. The verified leaves were assigned identification numbers as follows: *B. pinnatum*: IFE – 18424, *C. citratus*: IFE – 18425, *J. tanjorensis*: IFE – 18426, *M. oleifera*: IFE - 18427, *O. gratissimum*: IFE – 18428, *P. niruri*: IFE – 18429, and *P. guajava*: IFE – 18430. The leaves were then deposited at IFE Herbarium, Department of Botany, Obafemi Awolowo University, Osun State, Nigeria.

### Sample preparation

The sourced medicinal leaves were thoroughly washed with clean water, shade-dried on a tarpaulin for 7 days at room temperature (24 °C), with the humidity of the room at 45%, and the medicinal leaves were turned on alternate days to prevent fungal growth. After drying, each leaf was blended with the aid of an electric blender (8000-watt Kenwood multifunction commercial grinder blender, made in Germany). The leaves were kept in clean, dry, air-tight containers, and labelled accordingly. Thereafter, they were stored at room temperature prior to analysis (Adeyemi et al., 2013).

### Phytochemical analysis

40 g of each powdered treatment was packaged into an air-tight container to determine the saponins, tannins, flavonoids, alkaloids, and polyphenols content on a dry weight basis, and this was done in triplicates (n = 3).

### Determination of polyphenols

This was determined according to the modification of Ayoola et al. (2008). Powdered sample (0.5 g) was dissolved in methanol (1 mg/ml). An aliquot of 0.5 g of each plant sample (1 mg/ml) was mixed with 5 ml of Folin-Ciocalteu reagent, which was previously diluted with distilled water (1:10 v/v). The mixture was slightly shaken and allowed to stand at 22 °C for 5 min. Then, 4 ml (75 g/l) of sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) was added, and tubes containing the mixtures were allowed to stand for 30 minutes at 40 °C to develop a colour. Absorbance was then read at 765 nm using a UV spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Results were expressed as Gallic acid equivalent in mg of dried sample (10-100 mg/ml). All samples were analyzed in triplicate.

### Determination of total flavonoids

The total flavonoid contents were determined using the Aluminum chloride colorimetric method (Ordonez et al., 2006). A volume of 0.5 ml of 2% aluminum trichloride ethanol solution was added to 0.5 g of sample solution. After one hour at room temperature, the absorbance was measured at 420 nm using a UV spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The appearance of a yellow colour indicated the presence of flavonoids. Total flavonoid content was calculated as quercetin equivalent (mg).

### Determination of total alkaloids

This was done according to the standard method described by Hassan et al. (2020). 200 ml of 10% acetic acid in ethanol was added to 5 g of each plant sample. The mixtures were covered and allowed to stand for 4 hours. The solutions

were decanted and filtered, and the extracts were further concentrated in a water bath until one-quarter of the original volume was obtained. Concentrated ammonium hydroxide was added dropwise to the concentrated mixture until the precipitation was complete. The precipitate was collected and washed with dilute ammonium hydroxide and then filtered. The residue was dried in an oven at 50 °C, until a constant weight is achieved. Thereafter, the residue was weighed (mg).

#### **Determination of total tannins**

50 ml of distilled water was added to 0.5 g of the powdered sample and shaken for 1 hour in a mechanical shaker. The obtained solution was filtered into a 50 ml volumetric flask and made up to the mark. Five milliliters of the filtrate was pipetted into a test tube and mixed with 2 ml of 0.1 M ferric chloride in 0.1 N hydrochloric acid and 0.008 M potassium ferrocyanide. The absorbance was measured at 220 nm within 10 min following the procedures and modifications of Ayoola et al. (2008).

#### **Determination of total saponins**

A total of 100 cm<sup>3</sup> of 20% aqueous ethanol was added to 20 g of each plant sample. The samples were heated at 55 °C for 4 hours with continuous stirring. The mixture was filtered and the residue re-extracted with 200 ml %20 ethanol. The combined extracts were reduced to 40 ml over a water bath at about 90 °C. 20 ml of diethyl ether was added to the concentrates and shaken vigorously. The aqueous layer recovered was further purified by adding 60 ml of n-butanol. The combined n-butanol extracts were washed twice with 10 ml of %5 aqueous sodium chloride and heated in a water bath. After evaporation, the samples were dried in the oven to a constant weight and the saponin content was calculated thus: ) where: WCS: Weight of crude saponin; WPM: Weight of plant material (Obadoni and Ochuko 2002).

#### **Proximate evaluation**

A total of 20 g of each sample was evaluated for crude protein, ash, fat, crude fiber, and moisture content according to AOAC (2015).

Crude protein was determined from total organic nitrogen using the macro-Kjeldhal method. Fat content was determined by extracting 2 g of each sample with petroleum ether for 12 hours. The extract was reduced to half by evaporation and dried at 105 °C until a constant weight was obtained. For the crude fiber, 1 g of the extract of each sample was added to 3 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> followed by addition of 17 mL of hot 1.25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was boiled for 30 minutes, allowed to cool, and filtered through filter paper under gravity. Insoluble residue was washed with hot water to remove the acid. A total of 3 mL of 0.313 M NaOH was added to the residue followed by addition of 17 mL of hot 0.313 M NaOH. The mixture was shaken for 30 minutes and passed through filter paper under gravity. The residue was washed with 1% HCl followed by washing with boiling water until no residual acid was present in the final filtrate. The residue was washed with ethanol and ether before drying at 100 °C. Fiber content was calculated by dividing the loss in weight of the sample by the weight of the sample. For the ash, 2 g of the sample was weighed into a porcelain crucible. This was transferred into the muffle furnace set at 550 °C and left for about 4 hours, until it turned to white ash. The crucible and its content were cooled to about 100 °C in air, then to room temperature in a desiccator and weighed. Moisture content was determined by drying 2 g of each sample in pre-weighed crucible at 105 °C for 24 hours.

#### **Vitamin determination**

A total of 20 g of each sample of medicinal leaf was assessed for vitamin compositions. Vitamin A was done according to the method of Onyesife et al. (2014). Briefly, 1 g of each leaf was macerated with 20 mL of petroleum ether. The solution was

incubated for 2 hours, filtered, and evaporated to dryness, and 0.2 mL of chloroform-acetic anhydride (1:1 v/v) was added to the residue. Thereafter, 2 mL of 30% TCA chloroform was added to the mixture and absorbance was measured at 620 nm using a UV-3000PC spectrophotometer. Retinol standard was prepared in similar fashion. The concentration of vitamin A in the sample was estimated from the standard curve using the equation:  $Y = 0.001x + 0.0008$ ,  $R^2 = 0.9969$ , and expressed as mg/100 g DW.

Vitamin B<sub>1</sub> was evaluated according to the method highlighted by Okwu and Josiah (2006). A total of 5 g of each sample was homogenized with ethanolic sodium hydroxide (50 ml). It was filtered into a 100 ml flask. 10 ml of the filtrate was pipette and the colour developed by addition of 10 ml of potassium dichromate and read at 360 nm. A blank sample was prepared and the colour was also developed and read at the same wavelength.

Vitamin D was carried in accordance with the procedure of Ayyash et al. (2016). 2.5 IU/gm Ergocalciferol was dissolved in ethanol, and filtered through (0.45µm) Whatman filter paper, then passed through a Millipore Syringe filter 0.22 µm for HPLC analysis. (20 µl, 2.5 IU/gm) standard material of pure vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) was injected and measured at reference conditions to set and fix the real retention time (RT), then 20 µl of extracted plant sample was injected and measured at the same conditions. Separation Conditions were; Acetonitrile: Methanol (25 :75 ml) as an isocratic mobile phase, column C18-ODS (25 cm x 4.6 mm x 5 µm) with 20 µl injection volume, and 1 ml/min flow rate at 30 °C through 265 nm wave length UV detector spectrophotometer

Vitamin E was estimated using the procedure of Njoku et al. (2015). A known weight, 1 g of each sample was macerated with 20 mL of ethanol. The solution was added to 100 µL of 0.2% ferric chloride in ethanol and 1.0 mL of 0.5% to make the solution up to 5 mL. Absorbance was measured at 520 nm using a UV-3000PC spectrophotometer. The concentrations of the

standard solutions ranged from 10 to 100 µg/mL. The concentration of vitamin E in the samples was estimated from the standard curve using the equation:  $Y = 0.0086x - 0.0216$ ,  $R^2 = 0.9985$ . The vitamin E content in the samples was expressed as mg/100 g DW.

### Statistical analysis

A completely randomized design (CRD) was used in this study. All data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) at the  $p < 0.05$  level of significance. Means were compared using Duncan Multiple Range. The SPSS computer software (IBM, SPSS statistics, Chicago, U. S. A.) was used for all statistical analysis.

## Results

A total of seven medicinal leaves, namely: stonebreaker leaves (SBL), guava leaves (GL), scent leaves (SL), moringa leaves (ML), lemongrass leaves (LG), Hospital-too-far leaves (HL), and miracle leaves (MIL) were selected for phytochemical analysis. Flavonoids, saponin, alkaloid, steroid, phenols, and tannin were assessed. The result show that SL, ML, and MIL had the highest proportion of flavonoids with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. The least proportion of flavonoids was observed in SBL. SL (98.55 mg) and MIL (98.78 mg) exhibited the highest concentration of phenols, followed by GL and ML, with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. ML (36.13 mg) and MIL (37.55 mg) revealed the highest values of saponin with no significant ( $p > 0.05$ ) difference, followed by SL, while the least values were recorded in SBL. The highest concentration of steroid was observed in GL (49.06 mg) and SL (52.16 mg) with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. SBL (24.13) and ML (28.33) were observed to perform as the second best in concentration, with no significant difference. The highest value for alkaloid was discovered in ML (8.04 mg). The proportion of alkaloids in the selected medicinal

leaves followed this trend: ML > SL > MIL > SBL > GL > HL > LG. GL had the highest amount of tannin, while SBL had the least proportion.

For proximate composition, crude protein, ash, fat, crude fiber, and moisture content of the selected medicinal leaves were evaluated. The highest values for crude protein were obtained in SL (21.13%), HL (21.78%), and MIL (22.68%) with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. The least crude protein was observed in LG (7.33%). The highest amount of ash was noted in HL, and the least value were recorded in SL and ML, with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. The least fat content and crude fiber were observed in GL. MIL had the highest fat content, while

the least moisture content was observed in HL; however, there is no significant ( $p > 0.05$ ) difference observed between SBL and GL. The result for the vitamin A composition shows that MIL (22.76 mg) is significantly ( $p < 0.05$ ) higher, followed by ML (20.51 mg) while the least was recorded in SBL (14.28 mg). Vitamin B<sub>1</sub> content ranged from 0.38–1.47 mg, with the highest recorded in GL and the lowest in SBL; however, SBL displayed the highest vitamin D, followed by ML and MIL. Vitamin E content ranged from 12.69–56.45 mg, with SL and ML higher, with no significant ( $p > 0.05$ ) differences. SBL and MIL had the second largest proportion of vitamin E, with no significant ( $p > 0.05$ ) differences.

**Table 1.** Phytochemical, proximate, and vitamin composition of selected Nigerian medicinal leaves.

PARAMETER	SBL	GL	SL	ML	LG	HL	MIL	SEM
Flavonoids (mg)	28.39 <sup>c</sup>	40.12 <sup>b</sup>	72.46 <sup>a</sup>	75.03 <sup>a</sup>	31.39 <sup>c</sup>	36.39 <sup>b</sup>	72.64 <sup>a</sup>	3.78
Polyphenol (mg)	56.77 <sup>d</sup>	79.30 <sup>b</sup>	98.55 <sup>a</sup>	82.12 <sup>b</sup>	62.20 <sup>c</sup>	51.66 <sup>d</sup>	98.78 <sup>a</sup>	3.99
Saponin (mg)	15.16 <sup>c</sup>	20.14 <sup>c</sup>	28.77 <sup>b</sup>	36.13 <sup>a</sup>	17.95 <sup>d</sup>	17.95 <sup>d</sup>	37.55 <sup>a</sup>	1.92
Steroid (mg)	24.13 <sup>b</sup>	49.06 <sup>a</sup>	52.16 <sup>a</sup>	28.33 <sup>b</sup>	16.27 <sup>d</sup>	21.79 <sup>c</sup>	15.07 <sup>d</sup>	3.13
Alkaloid (mg)	6.32 <sup>d</sup>	5.68 <sup>c</sup>	7.75 <sup>b</sup>	8.04 <sup>a</sup>	4.88 <sup>e</sup>	5.37 <sup>f</sup>	7.55 <sup>c</sup>	0.26
Tannin (mg)	9.54 <sup>f</sup>	96.93 <sup>a</sup>	72.36 <sup>b</sup>	42.60 <sup>d</sup>	35.68 <sup>c</sup>	50.09 <sup>c</sup>	72.65 <sup>b</sup>	5.97
CP (%)	15.21 <sup>c</sup>	10.18 <sup>c</sup>	21.13 <sup>a</sup>	18.09 <sup>b</sup>	7.33 <sup>d</sup>	21.78 <sup>a</sup>	22.68 <sup>a</sup>	1.33
Ash (%)	9.02 <sup>b</sup>	4.80 <sup>e</sup>	2.19 <sup>f</sup>	2.64 <sup>f</sup>	6.05 <sup>d</sup>	11.86 <sup>a</sup>	8.42 <sup>c</sup>	0.73
Fat (%)	4.30 <sup>b</sup>	0.89 <sup>e</sup>	3.00 <sup>c</sup>	1.65 <sup>d</sup>	2.99 <sup>c</sup>	3.92 <sup>b</sup>	5.61 <sup>a</sup>	0.34
CF (%)	13.01 <sup>a</sup>	3.83 <sup>f</sup>	8.51 <sup>b</sup>	2.16 <sup>e</sup>	4.45 <sup>e</sup>	8.03 <sup>c</sup>	7.14 <sup>d</sup>	0.75
MC (%)	6.35 <sup>c</sup>	6.37 <sup>c</sup>	6.00 <sup>d</sup>	4.97 <sup>e</sup>	6.94 <sup>b</sup>	4.35 <sup>f</sup>	7.91 <sup>a</sup>	0.25
Vitamin A (mg)	14.28 <sup>f</sup>	16.28 <sup>d</sup>	18.75 <sup>c</sup>	20.51 <sup>b</sup>	12.73 <sup>e</sup>	15.21 <sup>e</sup>	22.76 <sup>a</sup>	0.75
Vitamin B <sub>1</sub> (mg)	0.38 <sup>e</sup>	1.47 <sup>a</sup>	1.29 <sup>b</sup>	0.96 <sup>d</sup>	0.86 <sup>d</sup>	1.09 <sup>c</sup>	1.14 <sup>c</sup>	0.07
Vitamin D (mg)	35.08 <sup>a</sup>	18.71 <sup>c</sup>	21.80 <sup>d</sup>	24.81 <sup>b</sup>	18.17 <sup>c</sup>	15.21 <sup>f</sup>	22.76 <sup>c</sup>	1.34
Vitamin E (mg)	48.65 <sup>b</sup>	34.59 <sup>c</sup>	52.96 <sup>a</sup>	56.45 <sup>a</sup>	12.69 <sup>d</sup>	32.19 <sup>c</sup>	44.21 <sup>b</sup>	4.26

**Note:** Means with different superscripts (a, b, c, d, e, f) in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Abbreviations:** SBL – stonebreaker leaves, GL – Guava leaves, SL – Scent leaves, ML – Moringa leaves, LG – Lemongrass leaves, HL – Hospital too far leaves, MIL – Miracle leaves, SEM – Standard error of means, CP – crude protein, CF – crude fiber, and MC – moisture content.

## Discussion

Phytochemicals are non-nutritive plant chemicals that are believed to reduce the risk of several diseases or exert protective actions (Kiani et al., 2022). Phytochemical properties such as tannins, saponins, steroids, polyphenols, and flavonoids were evaluated in this study. The findings revealed that SL, ML, and MIL were significantly higher in flavonoids with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. Flavonoids are majorly known for their antioxidant action, and their outstanding presence in SL, ML, and MIL indicates that these leaves have the potential to reduce lipid oxidation in meat products (Lawal et al., 2021). The antioxidative role of flavonoid is exerted by scavenging free radicals, chelating metal ions, or inhibiting enzyme systems that produce free radicals (Pizzino et al., 2017). This indicates that meat products fortified with SL, ML, and MIL are likely to have an extended shelf life by retarding oxidation. Also, the incorporation of these leaves into meat products can preserve and improve the health of consumers by lowering cholesterol, blood pressure, and heart disease (Le Marchand 2002; Daniel et al., 2020). Flavonoids also exhibit antimicrobial effect by disrupting cell membranes and interfering with enzyme systems (Yu et al., 2021). The combined antioxidant and antimicrobial actions of flavonoids present in SL, ML, and MIL make these leaves recommendable as natural preservatives in meat products.

Both flavonoids and phenols have similar antioxidative functions, and they are the most abundant compounds in the medicinal leaves evaluated in this study, which corresponds with the finding of Dreosti (2000). Yu et al. (2021) stated that phenols are recognized as the most important bioactive compounds in plant-based food preservatives. SL and MIL were outstanding sources of phenols with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. As a result of their phenolic content, SL and MIL have the potential to trap and eliminates free radical and inhibit cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes, which are the main causes of rancidity

in meat products (Embuscado 2015). ML and GL ranked as the second-best in phenol content, which signals the antioxidative potential of moringa and guava leaves. Beyond preservative role of phenols in SL, MIL, ML, and GL, they are likely to play a vital role in the colour, flavour, and taste (astringency) of meat products (Swanson 2003). SL is often used as spices because of its distinct flavour, enhancing its culinary usefulness (Edo et al., 2023).

ML and MIL have been proven to be the richest sources of saponin, while SL ranked as the second-best. According to Ali et al. (2011), saponin is a key bioactive compound responsible for the reduction of cholesterol and inhibition of microbial growth. Incorporation of ML, MIL, and SL into meat products has the latent quality of reducing its cholesterol content and microbial load. These leaves can disrupt microbial membranes and inhibit enzymatic actions (Sheriff et al., 2019). Likewise, steroids are also known for their ability to lower cholesterol, although it is often under-discussed, their contribution to functional quality of food cannot be jettisoned (Sultan and Rauf-Raza 2015). This research revealed, GL and SL as outstanding sources of steroids. The presence of phytosterol in plants like GL and SL enabled them to lower cholesterol content in meat products (Marwat et al., 2005).

Tannins are bioactive compounds that enhance antimicrobial and antioxidant activities (Mazid et al., 2011). GL has an excellent amount of tannin, while SL and MIL ranked second in tannin concentration. Daniel et al. (2020), Ayoola et al. (2020), and Okonwu et al. (2020) respectively obtained lower values of 4.98 mg/g, 12.07 mg, and 6.110 mg as tannin content in ML. This could be attributed to differences in developmental stage, geographical location, season of harvest, and method of extraction of bioactive compounds (Gopalakrishnan et al., 2016). Moreover, variation in phytochemical contents is a major concern as there is no standard value for any of the bioactive compounds in medicinal leaves (Yu et al., 2021). Aside from the antioxidant

and antimicrobial activity of tannin in GL, its ability to lower blood pressure is a focal point in health-focused meat products. However, Chung et al. (1998) reported that high tannin in food products can flocculate protein, resulting in lower nutritional value, which may be further validated when GL is incorporated into meat products. Plants that contain alkaloids and their derivatives are gaining attention in health and meat industry. According to Othman et al. (2019), alkaloid is a useful ingredient in meat industry because of its antibacterial activity, and the ability of alkaloids to interact with microbial DNA has been highlighted as a key mechanism for its antimicrobial action. ML is a promising antimicrobial plant due to its high content of alkaloids. Also, SL is likely to offer an effective antimicrobial role because it ranked second in its content of alkaloids.

Antioxidants and antimicrobial actions of these medicinal leaves make them promising candidates in food preservation, especially in meat industry (Teshome et al., 2022). The use of these medicinal leaves, especially SL, ML, MIL, and GL as preservatives represents a viable and suitable domestic approach (Ferreira et al., 2022) for salvaging losses in meat industry, as most of these natural plants are easily found in residential areas. This suggests that, natural preservatives are cheap substitutes to synthetic preservative or lab-created counterpart. Awad et al. (2022) added that the use of natural preservatives is an exploration of green, non-toxic, non-costly, sustainable, economical, eco-friendly, and healthy additives in meat products, which aligns with the current trend of “clean label” in meat industry, that is, meat products that are void of artificial additives (Cegiela 2020).

These medicinal plants could also be a source of protein, and in combination with animal protein such as meat, may result in an increase of nutritional value of the meat products (Ayoola et al., 2020). The highest crude protein was detected in HL, SL, and MIL with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. There is a possibility of increased protein content when HL, SL, and MIL

are used as natural preservative in meat products. ML ranked second in its content of crude protein, which supports the documentation of Gopalakrishnan et al. (2016) that moringa is a storehouse of macro and micronutrients. The authors obtained 27.1% as protein content in leaf powder, 29.4% in dry leaf, and 6.7% in fresh moringa leaf, which implies that the state of medicinal leaves can affect their nutritional components. According to Contini et al. (2014), most medicinal leaves are outstanding sources of chemical nutrients such as protein, carbohydrate, and fat. Fat content in medicinal leaves determines the quality of oil that they produce, which plays an important role in nutrition (Karaca and Aytac 2007). The highest fat content was observed in MIL followed by SBL and HL with no significant differences. This indicates that MIL, SBL, and HL are likely to produce quality oils, and these oils offer antioxidant and antimicrobial properties (Wang et al., 2017), which are helpful in building arsenal against meat spoilage. Also, when MIL, SBL, and HL are included in meat products, their fat contents is likely to increase palatability by absorbing and retaining flavour (Anita et al., 2006).

Ash content reflects the amount of mineral content present in a leaf (Aborisade et al., 2017), and it can be used to judge the purity and quality of plants. Young leaves tend to have low ash content, while older leaves usually have a higher amount (Liu 2019). The highest ash content was observed in HL, while the least ash contents were detected in ML and SL with no significant difference. The value obtained for ash content in SL aligns with 2.24% obtained by Essen et al. (2025). Previous researchers noted that fiber in medicinal leaves improves the quality characteristics of meat products (Han et al., 2020). Crude fiber peaked in SBL, which signals that incorporation of SBL in meat products will likely increase its quality by improving texture, water holding capacity, and juiciness. Also, inclusion of medicinal leaves that are high in fiber into meat products makes them a source of dietary fibers, which lowers serum cholesterol, heart

disease, hypertension, diabetes, breast cancer, and most importantly constipation (Ishida et al., 2000). SL (8.51%) ranked second in its fiber contents, and the value obtained in this study is highly consistent with 8.51% obtained by Olufayo et al. (2021) and 8.93% reported by Adedoyin et al. (2023). Hence, SL can be said to be hypocholesteremic because of its rich fiber content, which is further supported by its rich content of saponin and steroid, which are also hypocholesteremia in nature.

High moisture content in leaves accelerates microbial proliferation, indicating that the life span of such leaf will be short (Aborisade et al., 2017). The least moisture content was observed in HL, which emphasizes long shelf life and low microbial activity in the leaf, which is an advantage when added into meat formulation. There is no significant ( $p > 0.05$ ) difference observed in the moisture content of GL and SBL. The value obtained in this research aligns with the work of Origbemisoye et al. (2025), who reported 6.03% as moisture content in SBL. SL displayed a moderate amount of moisture content, which is lower than the values of 8.12% and 13.36% obtained by Essen et al. (2025) and Adedoyin et al. (2023). This variation could result from geographical location, climatic conditions, variety of scent leaves used, method of extraction, and developmental phase.

According to Han et al. (2020), natural or medicinal leaves possess excellent antimicrobial and antioxidant function due to organic acids, pigments, and vitamins they contain (Catarino et al., 2017). Vitamins derived from plants are of great interest because their impact on human health cannot be undermined, since vitamins cannot be synthesized in the body (Asensi-Fabado and Munne-Bosch 2010). Plant vitamins contain molecules with a low reduction potential that can donate electrons or hydrogen atoms, thereby preventing the oxidation of other molecules (Alum et al., 2023). Medicinal plants contain arrays of vitamins with strong antioxidant potential, which includes both the water-soluble (B) and fat-soluble (A, E, and D) compounds (Asensi-Fabado and Munne-Bosch 2010). From this

study, medicinal leaves are rich sources of vitamin E, as the values obtained ranged from 12.69 - 56.45 mg. The highest vitamin E was observed in SL and ML with no significant ( $p > 0.05$ ) difference. This was also observed by Nwankwo et al. (2014), who reported that SL is a rich source of vitamin E, although, they obtained a lower value of 31.46 mg. Since vitamin E is an antioxidant vitamin, it is likely to synergize with the phytochemical components (flavonoids and phenols) of the leaves to retard rancidity in meat products, especially when SL and ML are used. MIL and SBL had the second largest amounts of vitamin E with no significant ( $p > 0.05$ ) differences. This shows that SL, ML, MIL, and SBL have the capacity to protect meat products from harmful free radicals which are responsible for oxidation (Su and Chen 2020).

It was noted by Moyo et al. (2011) that vitamin E helps to increase the storage of vitamin A in the body. Vitamin A is also an antioxidant vitamin, and its precursor carotenoids can also act as an antioxidant (Asensi-Fabado and Munne-Bosch 2010), which supplies a protective layer against oxidation processes. MIL exhibited the largest concentration of vitamin A, indicating that fortifying meat products with MIL would guard against lipid oxidation. Also, vitamin A helps improve sight (Blaner 2020). It can therefore be deduced that MIL will likely play a dual role when incorporated into meat products; it will preserve the products and probably improve the health of the consumer. ML ranked second in vitamin A concentration, and it was reported by Moyo et al. (2011) that ML is a rich source of vitamin A, especially when it is in powdery form. Koul and Chase (2015) established that, ML contained 10 times the amount of vitamin A in carrot.

GL was identified as an outstanding source of vitamin B<sub>1</sub>, while SL performed as the second-best. Addition of medicinal leaves, especially GL and SL into meat products, will probably enhance their vitamin B<sub>1</sub> content (Nwachukwu 2018). For vitamin D, SBL outranked other leaves, while ML had the second largest

concentration, and MIL was the third-best. Intake of vitamin D from these sources (SBL, ML, and MIL) is vital to maintain adequate intake because there are very few foods that naturally contain vitamin D (Mahapatra et al., 2024). Furthermore, vitamin D is responsible for calcium and phosphorus homeostasis in the human body (Mahapatra et al., 2024). Although, further research is needed to evaluate the actual preservative efficacy and to also determine the impacts of medicinal leaves on chemical and sensory properties of meat products.

### Conclusion

Medicinal leaves are increasingly becoming the solution to health, nutritional challenges, and losses of meat products due to their phytochemical and chemical components. This study successfully characterized the phytochemical, proximate, and vitamin profiles of seven Nigerian medicinal leaves, identifying scent, moringa, and miracle leaves as the most promising candidates for use as natural meat preservatives. Their high content of bioactive compounds suggests they could be valuable ingredients for the meat industry, although further research is required to validate their actual efficacy, safety, and impact on sensory properties in meat products.

### Acknowledgements

The authors acknowledged the contributions of the Department of Botany, OAU and Faculty Scientific Laboratory, Faculty of Agricultural Production and Management, Osun State University for their supports in identification and analysis of the selected medicinal leaves.

### References

- Aborisode AB, Adetutu A, Owoade AO. Phytochemical and proximate analysis of some medicinal leaves. *Clinical Med Res.* 2017;6(6):209-14.
- Adedoyin AA, Akindele WO, Onifade AO, Bankole SO. Potentials of scent leaves (*O. gratissimum*) as feed additives on performance, selected blood biochemicals and helminthiasis in weaner Pigs. *J Livest Pol.* 2023;2(1):28-43.
- Adeyemi KO, Ahmed El-imam AM, Dosunmu OO, Lawal OK. Effects of *Moringa oleifera* marinade on microbial stability of smoked dried catfish (*Clarias gariepinus*). *Ethiopian J Environ Stud Manage.* 2013;6(1):104-8.
- Akinpelu DA. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia.* 2000;71:193-4.
- Ali N, Shah SW, Shah I, Ahmed G, Ghias M, Khan, I. Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea Wilhelmsii* C. Koch and *Teucrium Stocksianum* boiss. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11(1):106.
- Alum EU, Aja W, Ugwu OPC, Obeagu EI, Okon MB. Assessment of vitamin composition of ethanol leaf and seed extracts of datura stramonium. *Avicenna J Med Biochem.* 2023;11(1):92-7.
- Aminzare M, Hashemi M, Ansarian E. Using natural antioxidants in meat and meat products as preservatives: A review. *Adv Anim Vet Sci.* 2019;7(5):417-26.
- Anita BS, Akpan EJ, Okon PA, Umoren IU. Nutritive and anti-nutritive evaluation of sweet potatoes (*Ipomea batatas*) leaves. *Pakistan J Nutr.* 2006;5:166-8.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Association of analyst chemist. 19<sup>th</sup> ed. Washington DC: AOAC International, Inc.; 2015.
- Asensi-Fabado MA, Munne-Bosch S. Vitamins in plants: Occurrence, biosynthesis and antioxidants function. *Trends Plant Sci.* 2010;15(10):582-92.

- Awad AM, Kumar P, Ismail-Fitry MR, Jusoh S, Ab Aziz MF, Sazili AQ. Overview of plant extracts as natural preservatives in meat. *J Food Process Preserv.* 2022;16796.
- Ayoola GA, Folawewo AD, Adesegun SA, Abioro OO, Adepoju-Bello AA, Coker HA. Phytochemical and antioxidant screening of some plants of Apocynaceae from South West Nigeria. *Afri J Plant Sci.* 2008;2(10):124-8.
- Ayoola PB, Odeniyi MA, Onawumi OOE. Comparative study on the medicinal and food values of *Ocimum gratissimum* (scent leaf), *Vernonia amygdalina* (bitter leaf), and *Telfaria occidentalis* (ugu leaf). *Afr J Food Sci.* 2020;3(3):29-37.
- Ayyash MA, Ewadh MJ, Mohammed NJ. Detection and estimation of vitamin D2 in *Catharanthus roseus* by HPCL and other molecular spectra instruments as a source of vitamin D3. *Med J Babylon.* 2016;13(2):468-80.
- Blaner WS. Vitamin A and Provitamin A carotenoids. In: Marriott, BP, Birt DF, Stallings VA, Yates AA, editors. *Present Knowledge in Nutrition.* 11<sup>th</sup> ed. Cambridge, Massachusetts: Wiley - Blackwell; 2020. p. 73-91.
- Catarino MD, Alves-Silva JM, Fernandes RP, Goncalves MJ, Salgueiro LR, Henriques MF, et al. Development and performance of whey protein active coatings with *Origanum virens* essential oils in the quality and shelf life improvement of processed meat products. *Food Control.* 2017;80:273-80.
- Cegiłka A. "Clean label" as one of the leading trends in the meat industry in the world and in Poland- A review. *Rocz Państwowego Zakładu Hig.* 2020;71(1).
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1998;38:421-64.
- Contini C, Alvarez R, O'Sullivan M, Dowling DP, Gargan, SO, Monahan FJ. Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. *Meat Sci.* 2014;96:1171-6.
- Daniel IE, Akpan EI, Utam EC. Phytochemical evaluation, antioxidant and antimicrobial activities of various extracts from leaves and stems of *Bryophyllum pinnatum*. *Nepal J Biotech.* 2020;8(1):17-28.
- Dreosti IE. Recommended dietary intake levels for phytochemicals: Feasible or fanciful?. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2000;9:S119-22.
- Edo GI, Samuel PO, Ossai S, Nwachukwu SC, Okolie MC, Oghenogweke O, et al. Phytochemistry and pharmacological compounds present in scent leaf: A Review. *Food Chem Adv.* 2023;3:100300.
- Embuscado ME. Spices and Herbs: Natural sources of antioxidants-a mini review. *J Funct Foods.* 2015;18:811-9.
- Essen PO, Njoke GN, Onya GU, Zachary BN, Anuonye A, Sunday-Joshua HA. Effects of scent leaf (*Ocimum gratissimum*) extract on growth performance and serum biochemistry indices of broiler chickens. *Anim Res Int.* 2025;22(1):5961-74.
- Falowo AB, Fayemi PO, Muchenje V. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res Int.* 2014;64:171-81.
- Ferreira FS, de Oliveira VS, Chavez DWH, Chaves DS, Riger CJ., Sawaya ACHF, et al. Bioactive compounds of parsley (*Petroselinum crispum*), chives (*Allium schoenoprasum* L) and their mixture (Brazilian *cheiro-verde*) as promising antioxidant and anti-cholesterol oxidation agents in a food system. *Food Res Int.* 2022;151:110864.
- Gopalakrishnan L, Doriya K, Kumar DS. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Sci Hum Well.* 2016;5(2):49-56.
- Gopinath LR, Jeevitha S, Gokiladevi T, Archaya S. Isolation and identification of therapeutic compounds from *Moringa oleifera* and its antimicrobial activity. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2017;12:1-10.

- Han YF, Zhang WW, Zhang Y N, Su L, Duan Y. Antioxidative regulation mechanism of tannin and its application in meat products. *Meat Research*. 2020;34(7):91-6.
- Hassan A, Akmal Z, Khan N. The phytochemical screening and antioxidants potential of *Schoenoplectus triqueteter* L. palla. *J Chem*. 2020;(1):1-8.
- Hussain G, Huang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Maqbool J. Putative roles of plant-derived tannins in neurodegenerative and neuropsychiatry disorders: An updated review. *Molecules*. 2019;24(12):2213
- Ijoma KI, Egbulefu AVI, Odinma SC. The organic extracts from the leaves of *Ficus thonningii* blume, *Jatropha tanjorensis* J. L Ellis and Saroja and *Justica carnea* Lindley as potential nutraceutical antioxidant and functional foods. *Trends phytochem Res*. 2023;7(1):76-85.
- Ishida K, Kato T, Murakami M, Watanabe M, Watanabe MF. Microginins, zinc metalloproteases inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*. 2000;56(44):8643-56.
- Jiraungkoorskul W. Stonebreaker activity review of seed-under-leaf, *Phyllanthus niruri*. *J Med Glob*. 2022;1(1):59-65.
- Karaca E, Aytac S. The factors affecting on fatty acid composition of oil crops. *OMU J Agric Fac J*. 2007;22(1):123-31.
- Kiani HS, Ali A, Zahra S, Hassan ZU, Kubra KT, Azam M, et al. Phytochemical composition and pharmacological potential of lemongrass (*Cymbogon*) and impact on gut microbiota. *AppliedChem*. 2022;2(4):229-46.
- Koul B, Chase N. *Moringa oleifera* Lam.: Panacea to several maladies. *J Chem Pharm Res*. 2015;7(6):687-707.
- Lawal RA, Ogundijo DA, Balogun MO. Quality improvement of beef sausages with miracle leaf. *Niger Food J*. 2021;39: 1-10.
- Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(6):296-301.
- Liu K. Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. *Algal Res*. 2019;40:101486.
- Mahapatra D, Das M, Beniwal A, Baro J, Goswani S. Plants as source of vitamin D: A brief review. *Agric Assoc Tex Chem Crit Rev J*. 2024;325-31.
- Marwat GA, Hussain AKI, Kalsoom S. A review on naturally occurring steroids. *J Chem Soc Pakis*. 2005;27(4):443-50.
- Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Bio Med*. 2011;3(2): 232-49.
- Miranda JJ. Medicinal Plants and traditional uses in different locations. San Diego, CA, USA: Agric Bio Sci Academic Press; 2021.
- Moyo B, Masika PJ, Hugo A, Muchenje V. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(60):12925-33.
- Njoku NE, Ubbaonu CN, Alagbaoso SO, Eluchie CN, Umelo MC. Amino acid profile and oxidizable vitamin content of *Synsepalum dulcificum* berry (miracle fruit) pulp. *Food Sci Nutr*. 2015;3(3):252-6.
- Nwachukwu CN. Nutrient, phytochemical and anti-nutrient evaluation of *Jatropha tanjorensis* leaf (hospital too far). *J Agric Food Sci*. 2018;16(2):36-46.
- Nwankwo CS, Ebenezer IA, Ikpeama AI, Asuzu FO. The nutritional and anti-nutritional values of two culinary herb-uziza leaf (*Piper guineense*) and scent leaf (*Ocimum gratissium*) popularly used in Nigeria. *Int J Sci Eng Res*. 2014;5(12):1160-3.
- Obadoni BO, Ochuko PO. Phytochemical studies and comparative efficacy of the crude extracts of some haemostatic plants in Edo and Delta States of Nigeria. *Glob J Pure Applied Sci*. 2002;8(2):203-8.

- Okonwu K, Ikechi-Nwogu C, Ivanhoe M. Proximate analysis, phytochemical properties and antifungal activity of miracle plant, *Bryophyllum pinnatum* (lam.) oken. *Nepal J Biotech.* 2020;33(2):129-50.
- Okwu DE, Josiah C. Evaluation of the chemical composition of the two Nigerian medicinal plants. *Afri J Biotechnol.* 2006;5(4):357-61.
- Olufayo OO, Tayo GO, Olumide MD, Akintunde AO. Assessment of the nutritive value of *Phyllanthus niruri* Linn. (stonebreaker) leaves. *Nigerian J Anim Sci.* 2021;23(3):108-15.
- Onyesife CO, Ogugua VN, Anaduaka EG. Investigations of some important phytochemicals, vitamins and mineral constituents of ethanol leaves extract of *Piper nigrum*. *Ann Biol Res.* 2014;5:20-5.
- Ordonez AA, Gomez JD, Vattuone MA. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.* 2006;97(3):452-8.
- Origbemiso BA, Malomo SA, Ifesan BO. Impact of Processing and Extraction Methods on the Phytochemical Composition of Garcinia Kola Stem Bark and Stone Breaker Leaves. *Asian Food Sci J.* 2025;24(1):1-15.
- Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Front Microbiol.* 2019;10:911.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci A V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017(1):1-13.
- Sahal A, Chaudhary S, Hussain A, Arora S, Dobhal A, Ahmad W, et al. A comprehensive review on the nutritional composition, bioactive potential, encapsulation techniques, and food system applications of guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Grain Oil Sci Technol.* 2025;8(1):64-74.
- Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(1):3-8.
- Shedoeva A, Leavesley D, Upton Z, Fan C. Wound healing and the use of medicinal plants. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019;2019(1):1-30.
- Sheriff UI, Awwal YA, Rahmatallah AA, Ifeanyi OC, Mary OB, Moshood AO, et al. Phytochemical compositions and biochemical effect of *Phyllanthus amarus* in albino rat. *GSC Biol Pharm Sci.* 2019;8(1):128-33.
- Su B, Chen X. Current status and potential of *Moringa oleifera* leaf as an alternative protein source for animal feeds. *Front Vet Sci.* 2020;7:53.
- Sultan A, Rauf-Raza A. Steroids: A diverse class of secondary metabolites. *Med Chem.* 2015;5(7):310-7.
- Swanson BG. Tannins and Polyphenols. *Encycl Food Sci Nutr.* 2003;2003:5729-33.
- Teshome E, Forsido SF, Rupasinghe HV, Olika Keyata E. Potentials of natural preservatives to enhance food safety and shelf-life: A Review. *Sci World J.* 2022;(1):9901018.
- Wang Y, Gao Y, Ding H, Liu S, Han X, Gui J et al. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.* 2017;218:152-8.
- Wu YY, Li W, Xu Y, Jin EH, Tu YY. Evaluation of the antioxidant effects of four man theaflavin derivative through chemiluminescence and DNA damage analyses. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011;12(9):744-51.
- Yu HH, Chin YW, Paik HD. Application of natural preservatives for meat and meat products against food – borne pathogens and spoilage bacteria: A review. *Foods.* 2021;10(10):2418.

# Diagnostic Performance of Lateral Flow Immunoassay for Detecting Brucellosis Antibodies in Goats

Phitcha Pongphitcha<sup>1</sup>, Kanticha Wongsittigorn<sup>1,2</sup>, Nuttakarn Meedeche<sup>2</sup>, Phornnipha Charoenwisedsin<sup>2</sup>,  
Teewara Charoensakdi<sup>2</sup>, Pattranit Boonserm<sup>2,3</sup>, Suporn Thongyuan<sup>4</sup>, Niorn Ratanapob<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Kasetsart University Veterinary Teaching Hospital Kamphaeng Saen, Kasetsart University,  
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900 Thailand

<sup>3</sup>Phuket International Petcare Center, Thalang, Phuket, 83110 Thailand

<sup>4</sup>Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,  
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

<sup>5</sup>Department of Large Animal and Wildlife Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,  
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

\*Corresponding author, E-mail address: fvetnor@ku.ac.th

Received: 30 September 2025; Revised: 4 December 2025; Accepted: 10 December 2025

## Abstract

Recently, lateral flow immunochromatographic assay (LFIA)-based brucellosis test kits have been imported into Thailand. These kits offer simplicity and rapid results, making them potentially valuable tools for facilitating goat trade while preventing disease transmission. However, their diagnostic performance has not yet been evaluated. This study assessed the sensitivity, specificity, and diagnostic agreement of a commercial LFIA-based test kit for brucellosis detection in goats by comparing the results with those obtained from validated laboratory diagnostic methods, which served as the reference standard. A total of 275 goat serum samples were analyzed using a commercial LFIA-based test kit. The results from the Rose Bengal test and microtiter plate agglutination test previously performed at the Kamphaeng Saen Veterinary Diagnostic Center, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, served as references to evaluate the performance of the test kit. Based on the analysis of the commercial LFIA-based test kit, its sensitivity and specificity were 86.10% and 90.91%, respectively. In addition, its Cohen's kappa coefficient of 0.731 indicated a substantial level of agreement with the laboratory test results. Therefore, the commercial LFIA-based test kit could be recommended as a screening tool for brucellosis in goats, particularly in situations where immediate results are required.

**Keywords:** Brucellosis, Lateral flow immunochromatography, Antibody detection, Goat

# ประสิทธิภาพของชุดตรวจอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดไหลในแนวราบ ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ

พิชชา พงศ์พิชชา<sup>1</sup>, กัญติชา วงศ์สิทธิกรณ<sup>1,2</sup>, ญัฐกาญจน์ มีเดช<sup>2</sup>, พรนิภา เจริญวิเศษศิลป์<sup>2</sup>,  
ธีร์วรา เจริญศักดิ์<sup>2</sup>, ภัทรานิษฐ์ บุญเสริม<sup>2,3</sup>, ศุภกร ทองยวน<sup>4</sup>, นีอร รัตนภ<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 ประเทศไทย

<sup>2</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900 ประเทศไทย

<sup>3</sup>ภูเก็ต อินเทอร์เน็ต เนชั่นแนล เพ็ทแคร์ เซ็นเตอร์ อ.ถลาง จ.ภูเก็ต 83110 ประเทศไทย

<sup>4</sup>ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน  
จ.นครปฐม 73140 ประเทศไทย

<sup>5</sup>ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 ประเทศไทย

\*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: fvetnor@ku.ac.th

Received: 30 September 2025; Revised: 4 December 2025; Accepted: 10 December 2025

## บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีผู้นำเข้าสู่ชุดตรวจโรค布鲁เซลโลซิสที่อาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดไหลในแนวราบมาในประเทศไทย ชุดทดสอบดังกล่าวมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากและทราบผลได้รวดเร็ว จึงอาจเป็นเครื่องมือที่เอื้อประโยชน์ในการซื้อ-ขายแพะ โดยไม่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายโรค อย่างไรก็ตามชุดทดสอบดังกล่าวยังไม่ถูกประเมินประสิทธิภาพในการวินิจฉัย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินค่าความไว ความจำเพาะ และความสอดคล้องในการวินิจฉัยของชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ที่ใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ โดยเปรียบเทียบกับผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการที่เป็นวิธีมาตรฐาน การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมของแพะจำนวน 275 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดไหลในแนวราบเชิงพาณิชย์และใช้ผลการตรวจด้วยวิธี Rose Bengal test ร่วมกับ microtiter plate agglutination test จากศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นวิธีอ้างอิง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ผลการวิเคราะห์พบว่าชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ดังกล่าวมีค่าความไวและค่าความจำเพาะอยู่ที่ร้อยละ 86.10 และร้อยละ 90.91 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปาอยู่ที่ 0.731 ซึ่งถือว่าชุดตรวจให้ผลสอดคล้องอย่างมากกับผลทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นชุดทดสอบเชิงพาณิชย์นี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองเบื้องต้นสำหรับการตรวจหาโรค布鲁เซลโลซิสในแพะได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานการณ์ที่จำเป็นต้องทราบผลอย่างเร่งด่วน

คำสำคัญ: โรค布鲁เซล โลซิส อิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดไหลในแนวราบ การตรวจหาแอนติบอดี แพะ

## Introduction

Brucellosis is a significant infectious disease in the livestock industry and a serious zoonotic illness caused by various species of the *Brucella* genus (Khan and Zahoor 2018). It affects a wide range of animal hosts, including goats, sheep, cattle, and dogs (Qureshi et al., 2023). In animals, brucellosis primarily impairs reproductive function, potentially resulting in abortion or reproductive failure. In humans, it manifests as a severe and debilitating illness (Pal et al., 2020). The disease contributes to significant impacts on the economy and on veterinary and human healthcare systems globally, particularly in developing countries (Pal et al., 2020; Khurana et al., 2021; Khoshnood et al., 2022). Therefore, investigating the epidemiological distribution of brucellosis is essential for developing evidence-based measures to control and prevent disease spread (Smits et al., 2003; Irmak et al., 2004; Zhang et al., 2018; Ghanbari et al., 2020; Dadar et al., 2021).

Effective control of brucellosis requires a well-defined strategy in which reliable diagnostic methods constitute a fundamental component (Khurana et al., 2021; Qureshi et al., 2023). Although bacterial culture remains the gold standard for diagnosis due to its high accuracy, it is labor-intensive, time-consuming, and costly (Abdoel et al., 2008; Poester et al., 2010; Quintero et al., 2018; Qureshi et al., 2023). Serological tests, including the Rose Bengal test (RBT) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA), are extensively used due to their convenience, reliability, and high sensitivity in detecting brucellosis (Poester et al., 2010; Serić-Haračić et al., 2022). These methods detect antibodies produced in response to *Brucella* spp. infection. Following infection, animals produce antibodies against the pathogen within 5–14 days (Poester et al., 2010). In the absence of a vaccination program against this disease for goats in Thailand, antibody detection serves as a practical indicator of

natural exposure or ongoing infection. However, all of these serological methods require well-equipped laboratory facilities and skilled personnel. In addition, some are also time-consuming, which may limit their feasibility under actual field conditions and impede timely disease control efforts.

Recently, lateral flow immunochromatographic assay (LFIA)-based test kits have been developed and used as an animal-side test to detect various animal diseases (Di Nardo et al., 2021), including brucellosis. LFIA platforms rely on capillary flow to drive interactions between sample constituents and assay reagents (Koczula and Gallotta 2016). As brucellosis diagnosis is predominantly serological, these assays are typically designed for antibody detection. A positive signal is generated when the anti-*Brucella* antibodies in the sample form an antibody–antigen complex that is subsequently captured by the immobilized components on the test strip. This method is a convenient and rapid diagnostic tool that does not require specialized technicians or laboratory facilities (Poester et al., 2010). Therefore, it can serve as an additional option for brucellosis screening and support control strategies.

However, user confidence in selecting these tests may be undermined by the limited number and variability of study results on the sensitivity, specificity, and accuracy of brucellosis antibody LFIA-based test kits (Abdoel et al., 2008; Ahmed et al., 2016; Gusi et al., 2019). A study with a larger sample size would provide more reliable results. Therefore, the objective of the present study was to evaluate a commercial LFIA-based kit from Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., Ltd. (China) for detecting *Brucella* antibodies in goats. This particular kit was selected based on its availability in Thailand, preliminary validation results, and suitability for use under field conditions, without any commercial bias. The study aimed to assess the sensitivity, specificity, and accuracy of the LFIA-based test kit in goats, compared with laboratory test results.

## Materials and methods

### Sample size determination

The required sample size was calculated based on the estimated sensitivity and specificity of 85.7% and 94%, respectively, from a preliminary study of 25 samples with known positive and negative status confirmed by RBT and microtiter plate agglutination test (MPAT) (unpublished data). Using a formula for estimating proportions with 95% confidence and 5% precision, a total of 275 samples were included, comprising 187 positive and 88 negative samples for this study. The experimental protocol was approved by the Animal Care and Use for Scientific Research Committee, Kasetsart University (ACKU65-VET-079).

### Sample characterization and reference testing

Goat serum samples were selected from those submitted since 2017 for brucellosis testing at the Kamphaeng Saen Veterinary Diagnostic Centre, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand. RBT (IDEXX Laboratories; Pourquier Rose Bengal Ag; France) was used as the initial screening method in the laboratory. Serum was mixed with an equal volume of antigen on a glass slide and gently stirred for 4 minutes at room temperature. A positive result was determined by the visual presence of agglutination (WOAH 2016). If the result was negative, the sample was considered negative for brucellosis based on the high sensitivity of RBT. However, if the result was positive, confirmation was performed using the MPAT. Serum was serially diluted two-fold from 1:10 to 1:1280. Then, *Brucella abortus* antigen was added to each well and incubated at 37 °C for 48 hours. Positivity was defined by the presence of agglutination at MPAT titers  $\geq$  1:40 (Bunleupongphan et al., 2014). Positive and negative controls were performed whenever a new batch of antigen was introduced.

All samples had been stored at -20 °C. Samples were classified as hemolyzed or non-hemolyzed based on the visual

comparison of serum color to a reference chart; those exhibiting pink-to-red discoloration were classified as hemolyzed, while clear-to-pale-yellow samples were classified as non-hemolyzed.

### Lateral flow immunochromatographic assay

The selected serum samples were used in a blind test using a commercial brucellosis LFIA-based test kit (Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., Ltd.; China), strictly following the manufacturer's instructions. Two independent readers performed the visual assessment under adequate lighting conditions within 15 minutes of running the test. Positive results were further classified as either strong or weak positives based on the intensity of the red strip on the test line (T-line), as determined by visual observation. A bright red line was defined as a strong positive, whereas a faint or lighter line, still distinguishable from a negative result, was considered a weak positive. In cases of disagreement, a third, senior reader adjudicated the final result.

### Statistical analysis

The commercial brucellosis test kit was compared to the laboratory results based on calculations of sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). Cohen's kappa coefficient was computed to assess the reliability of the two tests. The Cohen's kappa coefficient was interpreted using the criteria proposed by Landis and Koch (1977). The association between hemolysis and the occurrence of false-positive and false-negative results was analyzed using Fisher's exact test. The relationship between the intensity of positive samples and their status compared to the laboratory results was also evaluated using the same method. All statistical analyses were performed using Stata (version 14; StataCorp LP; College Station, TX, USA) with a 95% confidence level.

## Results

The test kit yielded false-positive and false-negative results in 8 and 26 samples, respectively, when compared to the reference laboratory methods. Of the 27 weakly positive samples, 22 were positive based on laboratory results, while 5 were laboratory-negative (Table 1). The performance of the test kit, compared to the laboratory RBT and MPAT results, is shown in Table 2. The Cohen's kappa coefficient of 0.731 (95% CI [0.647, 0.814]) indicated substantial agreement with the laboratory test results (Landis and Koch 1977).

There were 53 hemolyzed samples out of the 275 total samples (Table 1). Fisher's exact test revealed that hemolysis was not significantly associated with either false-positive results ( $p = 0.185$ ) or false-negative results ( $p = 0.795$ ). However, weak positive results were significantly associated with the occurrence of false positives ( $p = 0.003$ ).

## Discussion

The LFIA-based brucellosis test kit provided positive results in eight laboratory-negative samples. These false-positive results may be associated with bacterial infections, particularly those caused by bacteria containing O-polysaccharides such as *Escherichia coli* and *Yersinia* spp., (Weynants et al., 1996; Chenais et al., 2012; Ahmed et al., 2016; Bodenham et al., 2021; Yin et al., 2021). Cross-reactions may occur between antibodies from these infections and the cell wall of *Brucella* spp., particularly when lipopolysaccharides are used as antigens in the test kit. Therefore, it is essential to carefully rule out other Gram-negative bacteria when a positive result is obtained. These findings underscore the need for the development of more specific antigens that can differentiate *Brucella* spp. from other Gram-negative bacteria, thereby reducing cross-reactivity and improving diagnostic accuracy.

Inappropriate samples, such as hemolyzed serum, may result in false-positive outcomes (Gusi et al., 2019). In the present study, three hemolyzed samples gave false-positive results. However, the test kit manual did not mention excluding

**Table 1.** Diagnostic results from the lateral flow immunoassay (LFIA)-based brucellosis test kit and laboratory tests.

Type of sample	Commercial LFIA test kit	Laboratory test (sample)		Total (sample)
		Positive	Negative	
Non-hemolyzed	Positive	129	5	134
	- Strong	109	1	110
	- Weak	20	4	24
	Negative	22	66	88
Hemolyzed	Positive	32	3	35
	- Strong	30	2	32
	- Weak	2	1	3
	Negative	4	14	18
<b>Total</b>		<b>187</b>	<b>88</b>	<b>275</b>

hemolyzed samples. This aligns with our findings, as Fisher's exact test showed no significant association between hemolysis and false positives. However, to minimize hemolysis during blood collection, it is crucial to avoid using needles that are too small and to withdraw blood gently. Collection tubes containing blood samples require gentle handling. Additionally, prompt sample processing is essential, as prolonged time at room temperature significantly increases red blood cell breakdown (Heireman et al., 2017).

Interestingly, most false-positive samples (5 out of 8) showed weak positive results. The statistical analysis revealed a significant association between false-positive results and weakly positive reactions. Therefore, samples yielding ambiguous positive outcomes should be classified as inconclusive or suspect, necessitating re-testing. Ideally, confirmatory testing with a highly specific method should be performed. To address the inherent subjectivity in visual reading, establishing a rigorous color intensity cutoff or a reader device is essential for consistent and reproducible reading of faint lines (Di Nardo et al., 2021). However, the practical application of such a standard remains inherently challenging.

Antibodies against *Brucella spp.* can be degraded through stratification, dehydration, and proteolysis when samples are frozen at -20 °C. This degradation may impair the ability to detect antibodies in serological tests (Hussein and Ammar 2004). Some serum samples in the present study were stored at -20 °C for up to 5 years, while a few may have been exposed to repeated freeze-thaw conditions. Additionally, bacterial contamination in serum can accelerate antibody degradation (Hussein and Ammar 2004). The degradation of antibodies in stored serum samples may partly explain the false-negative results observed in the present study, thereby reducing the overall sensitivity. To avoid preservation-related issues, samples should be sterilized using filtration, aliquoted into multiple tubes, and stored in a temperature-controlled freezer to prevent repeated freezing and

thawing (Hussein and Ammar 2004). However, the use of fresh samples may reduce the risk of antibody degradation and contamination associated with frozen samples and repeated freeze-thaw cycles during prolonged storage, providing a more accurate reflection of the evaluated LFIA's performance. Human error may contribute to false readings (Kim and Park 2004; Wang et al., 2020; Colombo et al., 2023). For example, weak positive results may be misread when interpreted visually, particularly under poor lighting conditions. To reduce this risk, test results should be examined in a well-lit environment.

With a PPV of 95.27% and a specificity of 90.91%, a positive test result is highly reliable for confirming an infection, supporting the immediate implementation of disease control measures. The high proportion of positive samples in this study (187/275, 68%) likely contributed to the elevated PPV observed. PPV reflects the probability that a positive test result correctly identifies an individual who is infected. Generally, as the proportion of positive cases in a population increases, the PPV also increases, assuming constant test sensitivity and specificity. Therefore, it is essential to consider the specific population when interpreting test results.

On the contrary, a negative result may not be entirely reliable due to the NPV of 75% and the sensitivity of 86%. This indicates that some infected animals may test negative. Specifically, among animals with a negative test result, approximately 75% are truly not infected. Conversely, the remaining are infected, representing false negative cases. These missed diagnoses pose a major risk of continued disease transmission, threatening the health of both the animals and humans. Therefore, when this kit is used for screening, additional testing is recommended for negative results to improve overall diagnostic accuracy, particularly in animals with a high-risk history. Such supplementary testing is essential for preventing false negatives, which is crucial for effective disease control within the herd. Routine monitoring of the herd is also advised.

**Table 2.** Performance of lateral flow immunoassay-based brucellosis test kits.

Diagnostic test	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	PPV (%)	NPV (%)	Cohen's kappa coefficient	Reference method
LFIA (Present study) with 95% CI	86.10 (81.14, 91.06)	90.91 (84.90, 96.92)	87.64 (83.15, 91.28)	95.27 (92.07, 98.47)	75.47 (67.28, 83.66)	0.731 (0.647, 0.814)	RBT+MPAT
LFIA (Shome et al., 2018)	80.77	98.53	96.97	84.00	98.17	0.80	RBT

**Note:** PPV = Positive predictive value; NPV = Negative predictive value; RBT = Rose Bengal test; MPAT = Microtiter plate agglutination test.

A comparison of the performance of another commercial LFIA-based brucellosis test kit, reported by Shome et al. (2018), revealed that the test kit used in the present study had higher sensitivity but lower specificity and a lower Cohen's kappa coefficient (Table 2). However, drawing direct comparisons is limited by considerable differences in the reference standards between the studies. The previous study used only RBT, whereas the present study applied a combination of RBT and MPAT as reference methods, with positive RBT results confirmed using MPAT. This change resulted in different sensitivity and specificity values for the reference methods themselves. Furthermore, the two studies used different commercial kits and the type of antigen used in the test kits can significantly influence their performance and contribute to the observed discrepancies (Souza et al., 2024).

The test kit used in the present study is applicable to both serum and whole blood samples. For on-site screening, whole blood is more convenient. However, it was not possible to use whole blood samples in the present study. Therefore, further research may be necessary to evaluate the efficacy of the test kit with whole blood samples. Although the cost of the test kit is higher than that of laboratory tests, it is more suitable for field use, where equipment, specialized personnel, and laboratory

facilities are not available. Additionally, using the test kit on-site eliminates the need to send samples to a laboratory, thereby reducing delays caused by transportation time. Furthermore, the test kit is easy to use and provides results more quickly than laboratory tests, making it a practical option for disease screening. Early detection enables rapid decisions to stop and control the spread of the disease.

## Conclusion

The sensitivity and specificity of the commercial test kit were 86.10% and 90.91%, respectively. Cohen's kappa coefficient of 0.731 indicated substantial agreement with the laboratory test results, based on RBT and MPAT. Therefore, the test kit could be used as an effective screening tool for brucellosis in goats in conjunction with other confirmatory diagnostic methods.

## Acknowledgements

We express our sincere gratitude to the Zoonotic Diseases Laboratory, Kamphaeng Saen Veterinary Diagnostic Center, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,

for supplying the samples and technical support. The authors would also like to thank Mr. Paween Asawasuebsakul and Ms. Apaporn Limlohakul for kindly providing the diagnostic kits used in this investigation. Furthermore, we gratefully acknowledge the funding from the Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

## References

- Abdoel T, Dias IT, Cardoso R, Smits HL. Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. *Vet Microbiol.* 2008;130:312-9.
- Ahmed WA, Majeed SA, Ameer AHA, Mahmmud ND, Saeed NI, Hanaa LY. Sensitivity and specificity of various serological tests for detection of *Brucella* spp. infection in goat and sheep males. *Adv Microbiol.* 2016;6:98-103.
- Bodenham RF, Mazeri S, Cleaveland S, Crump JA, Fasina FO, De Glanville WA, et al. Latent class evaluation of the performance of serological tests for exposure to *Brucella* spp. in cattle, sheep, and goats in Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(8):e0009630.
- Bunleupongphan S, Pinyopummin A, Kornkaewrat K, Phavaphutanon J, Chumsing A, Leartsang W, et al. Evaluation of 2 mercaptoethanol-microtiter plate agglutination test (2ME-MPAT) for the diagnosis of brucellosis in ruminants (in Thai). *Proceeding of the 52<sup>nd</sup> Kasetsart University Annual Conference: Animal, Veterinary Medicine.* Bangkok: Kasetsart University; 2014. p. 327-31.
- Chenais E, Bagge E, Thisted Lambert S, Artursson K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. *Infect Ecol Epidemiol.* 2012;2(1):19027.
- Colombo M, Bezinge L, Tapi AR, Shih CJ, de Mello AJ, Richards DA. Real-time, smartphone-based processing of lateral flow assays for early failure detection and rapid testing workflows. *Sens Diagn.* 2023;2(1):100-10.
- Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. *Vet Q.* 2021;41(1):137-51.
- Di Nardo F, Chiarello M, Cavalera S, Baggiani C, Anfossi L. Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. *Sensors.* 2021;21(15):5185.
- Ghanbari MK, Gorji HA, Behzadifar M, Sane N, Mehedi N, Bragazzi NL. One health approach to tackle brucellosis: a systematic review. *Trop Med Health.* 2020;48:1-10.
- Gusi AM, Bertu WJ, Jesús de Miguel M, Dieste-Pérez L, Smits HL, Ocholi RA, et al. Comparative performance of lateral flow immunochromatography, iELISA and Rose Bengal tests for the diagnosis of cattle, sheep, goat and swine brucellosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(6):e0007509.
- Heireman L, Van Geel P, Musger L, Heylen E, Uyttenbroeck W, Mahieu B. Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. *Clin Biochem.* 2017;50(18):1317-22.
- Hussein AE, Ammar KM. The effect of serum storage factors influencing the reactivity of antibodies in serodiagnostic tests. *Kafrelsheikh Vet Med.* 2004;2(2):29-42.
- Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, et al. Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(6):688-94.
- Khan MZ, Zahoor M. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. *Trop Med Infect Dis.* 2018;3(2):65.

- Khoshnood S, Pakzad R, Koupaei M, Shirani M, Araghi A, Irani GM, et al. Prevalence, diagnosis, and manifestations of brucellosis: A systematic review and meta-analysis. *Front Vet Sci.* 2022;9:976215.
- Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, et al. Bovine brucellosis—a comprehensive review. *Vet Q.* 2021;41(1):61-88.
- Kim S, Park JK. Development of a test strip reader for a lateral flow membrane-based immunochromatographic assay. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2004;9:127-31.
- Koczula KM, Gallotta A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* 2016;60(1):111-20.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
- Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. Diagnosis of brucellosis. *Open Vet Sci J.* 2010;4(1):46-60.
- Pal M, Kerorsa GB, Desalegn C, Kandi V. Human and animal brucellosis: a comprehensive review of biology, pathogenesis, epidemiology, risk factors, clinical signs, laboratory diagnosis, public health significance, economic importance, prevention and control. *Am J Infect Dis.* 2020;8(4):118-26.
- Quintero AF, Herrera DFD, Alfonso DM, Santana YC, Torres RB, Tamayo LM. Evaluation of two rapid immunochromatographic tests for diagnosis of brucellosis infection in cattle. *Open Vet J.* 2018;8(3):236-42.
- Qureshi KA, Parvez A, Fahmy NA, Abdel Hady BH, Kumar S, Ganguly A, et al. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment—a comprehensive review. *Ann Med.* 2023;55(2):2295398.
- Šerić-Haracić S, Velić L, Šaljić E, Čengiđ B, Tandir F, Hadžimusić N. Agreement among Rose Bengal, complement fixation test, and iELISA in diagnostic discrimination of sheep and goat brucellosis (*Brucella melitensis*). *Acta Vet Eurasia.* 2022;48(1):30-4.
- Shome R, Kalleshmurthy T, Shome BR, Sahay S, Natesan K, Bambal RG, et al. Lateral flow assay for brucellosis testing in multiple livestock species. *J Microbiol Methods.* 2018;148:93-6.
- Smits HL, Abdoel T, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1141-6.
- Souza PG, Lima PA, Soares Filho PM, Etges RN, Nicolino RR, Viana AG, et al. Analytical performance evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of bovine brucellosis based on a recombinant BP26 protein. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2024;76(5):e13158.
- Wang Q, Long M, Lv C, Xin S, Han X, Jiang W. Lanthanide-labeled fluorescent-nanoparticle immunochromatographic strips enable rapid and quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Food Control.* 2020;109:106894.
- Weynants V, Tibor A, Denoel PA, Saegerman C, Godfroid J, Thiange P, et al. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9, a cause of false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet Microbiol.* 1996;48(1-2):101-12.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). Chapter 3.1.4. - Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) [Internet]. WOA. 2022 [cited 2025 Jan 21]. Available from: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELLOSIS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf).
- Yin D, Ba Q, Wu X, Li H, Shao J, Sun M, et al. A multi-epitope fusion protein-based p-ELISA method for diagnosing bovine and goat brucellosis. *Front Vet Sci.* 2021;8:708008.
- Zhang N, Huang D, Wu W, Liu J, Liang F, Zhou B, et al. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: a systematic review of experiences and lessons learned. *Prev Vet Med.* 2018;160:105-15.

# Delayed Hypocalcemia Post-Parathyroidectomy in a Dog with Parathyroid Carcinoma

Alisa Saelee<sup>1\*</sup>, Sukanya Manee-in<sup>1</sup>, Wichayaporn Athikanon<sup>2</sup>, Rungrote Osathanon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Phuttamonthon 4 Rd., Salaya, Nakhon Pathom, 73170, Thailand

<sup>2</sup>Talingchan Animal Hospital, Soi Boromratchonnanee 61, Boromratchonnanee Rd., Chim Phli Subdistrict, Taling Chan District, Bangkok, 10170, Thailand

\*Corresponding author, E-mail address: [alisa.saelee@hotmail.com](mailto:alisa.saelee@hotmail.com)

Received: 31 October 2025; Revised: 30 December 2025; Accepted: 6 January 2026

## Abstract

Hypocalcemia is considered a common electrolyte abnormality in dogs after parathyroidectomy and usually occurs within the first 2-4 days postoperatively. The authors describe a case involving an 11-year-old spayed female Chow Chow dog that presented with decreased appetite and ongoing hypercalcaemia, with an ionized calcium (iCa) level of 2.08 mmol/L. Computed tomography (CT) revealed enlargement of the left external cranial pole and right internal caudal pole of the parathyroid glands. Abdominal ultrasound identified multiple small hyperechoic mineralizations in both renal diverticula. These findings were consistent with primary hyperparathyroidism. Left cranial and right caudal parathyroidectomies were performed. Histopathological examination revealed proliferation of neoplastic neuroendocrine cells, highly suggestive of parathyroid carcinoma. iCa levels were monitored daily for 5 days, and no hypocalcemia was detected. However, on the 12<sup>th</sup> postoperative day, the dog developed signs of hypocalcemia, including muscle twitching and tetany, and the iCa concentration dropped from 2.08 mmol/L to 0.6 mmol/L. The patient was treated with 10% calcium gluconate intravenously (1 ml/kg) for 3 consecutive days, followed by oral calcitriol (0.01 µg/kg twice daily) for 7 days. Clinical signs resolved, and ionized calcium levels increased to the normal range (1.45 mmol/L) within 4 days after initial oral calcitriol treatment. Subsequently, the calcitriol dose was tapered to once daily for 7 days, then every other day for the next 14 days, and ultimately discontinued after a total treatment duration of 4 weeks. Two weeks after discontinuation of calcitriol, the ionized calcium level remained within normal limits (1.26 mmol/L), and no signs of hypocalcemia were observed.

**Keywords:** Hypercalcaemia, Hypocalcemia, Parathyroidectomy, Parathyroid carcinoma

# ภาวะแคลเซียมต่ำที่เกิดขึ้นล่าช้าหลังการผ่าตัดต่อมพาราไทรอยด์ในสุนัข ที่เป็นมะเร็งต่อมพาราไทรอยด์

อลิสสา แซ่ลี<sup>\*</sup>, สุกัญญา มณีอินทร์<sup>1</sup>, วิชญาพร อธิกานนท์<sup>2</sup>, รุ่งโรจน์ โอสถานนท์<sup>1</sup>

<sup>1</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพหลโยธินซอย 4 ศาลายา นครปฐม 73170 ประเทศไทย

<sup>2</sup>โรงพยาบาลสัตว์ตลิ่งชัน ซอยบรมราชชนนี 61 ถนนบรมราชชนนี แขวงฉิมพลี เขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร 10170 ประเทศไทย

\*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: alisa.saelee@hotmail.com

Received: 31 October 2025; Revised: 30 December 2025; Accepted: 6 January 2026

## บทคัดย่อ

ภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ (hypocalcemia) เป็นความผิดปกติของอิเล็กโทรไลต์ที่พบได้บ่อยในสุนัขภายหลังจากการผ่าตัดต่อมพาราไทรอยด์ออก (parathyroidectomy) ซึ่งมักพบภายในระยะเวลา 2 ถึง 4 วันภายหลังจากการผ่าตัด รายงานสัตว์ป่วยฉบับนี้ นำเสนอสุนัขพันธุ์เซาเซา เพศเมีย ทำหมันแล้ว อายุ 11 ปี ที่เข้ารับการวินิจฉัยหาสาเหตุของภาวะเบื่ออาหารและตรวจพบภาวะแคลเซียมในเลือดสูงแบบต่อเนื่อง โดยมีระดับแคลเซียมอิสระในเลือด (Ionized calcium) เท่ากับ 2.08 มิลลิโมลต่อลิตร การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) พบการขยายขนาดของต่อมพาราไทรอยด์บริเวณขั้วบนภายนอกฝักซ้ายและขั้วล่างภายในฝักขวา ผลอัลตราซาวนด์ช่องท้องพบแร่ธาตุสะสมขนาดเล็กหลายตำแหน่งในไตทั้งสองข้าง โดยความผิดปกติเหล่านี้สอดคล้องกับภาวะต่อมพาราไทรอยด์ทำงานเกินแบบปฐมภูมิ (primary hyperparathyroidism) จึงได้ทำการผ่าตัดนำต่อมพาราไทรอยด์บริเวณขั้วบนภายนอกฝักซ้ายและขั้วล่างภายในฝักขวาออก ผลการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ประสาทต่อมไร้ท่อที่มีลักษณะนิวเคลียสไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเป็นลักษณะของมะเร็งของต่อมพาราไทรอยด์ (parathyroid carcinoma) การติดตามระดับแคลเซียมอิสระในเลือดในซีรัมต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วันหลังผ่าตัด ไม่พบภาวะแคลเซียมต่ำ แต่ในวันที่ 12 หลังผ่าตัด ระดับแคลเซียมอิสระในเลือดลดลงจาก 2.08 มิลลิโมลต่อลิตร เหลือ 0.6 มิลลิโมลต่อลิตร โดยสุนัขแสดงอาการทางคลินิกของภาวะแคลเซียมต่ำ ได้แก่ ก่อล้ามเนื้อกระดูกและชักเกร็ง จึงทำการรักษาด้วยแคลเซียมกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 10 ทางหลอดเลือดดำ ขนาดยา 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อเนื่อง 3 วัน จากนั้นให้แคลซิไตรอลทางการกิน ขนาดยา 0.01 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 7 วัน ภายใน 4 วันหลังการรักษาด้วยแคลซิไตรอล ไม่พบอาการผิดปกติทางคลินิก และระดับแคลเซียมอิสระในเลือดเพิ่มขึ้นสู่ระดับปกติ (1.45 มิลลิโมลต่อลิตร) จึงทำการปรับลดขนาดยาแคลซิไตรอล ลงเป็นวันละครั้ง 7 วัน และ วันเว้นวันอีก 14 วัน และหยุดยารวมระยะเวลาในการรักษาด้วยยาแคลซิไตรอลทั้งหมดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังหยุดการรักษา 2 สัปดาห์ ระดับแคลเซียมอิสระในเลือดยังคงอยู่ในช่วงปกติ (1.26 มิลลิโมลต่อลิตร) และไม่พบอาการของภาวะแคลเซียมต่ำ

คำสำคัญ: ภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ ภาวะแคลเซียมในเลือดสูง การตัดต่อมพาราไทรอยด์ มะเร็งของต่อมพาราไทรอยด์

## Introduction

Hypercalcemia is a clinically important metabolic abnormality in dogs, most commonly associated with neoplasia, hypoadrenocorticism, chronic kidney disease, or primary hyperparathyroidism (PHPT) (Coady et al., 2019). Among these, PHPT is considered an uncommon cause of persistent hypercalcemia, but it should not be overlooked. PHPT results from excessive secretion of parathyroid hormone (PTH) by functional neoplastic or hyperplastic parathyroid tissue, leading to sustained elevations in ionized calcium (Berger and Feldman 1987).

Persistent hypercalcemia contributes to multisystemic complications, including polyuria and polydipsia, neuromuscular weakness, and gastrointestinal upset (Strumpf et al., 2023). Severe hypercalcemia can lead to cardiac arrhythmias, including conduction disturbances such as third-degree heart block, and may contribute to sudden death in rare cases (Wilson et al., 1974; Dear et al., 2017). Hypercalcemia in dogs can cause widespread soft tissue mineralization (Hilbe et al., 2000). These changes can be confirmed by gross and histopathological examination, both of which significantly worsen prognosis and highlight the importance of early detection and management. The outcome of dogs with hypercalcemia is largely dependent on the underlying cause. Dogs with neoplasia-associated hypercalcemia, particularly lymphoma, apocrine gland anal sac adenocarcinoma (AGASACA) (Repasy et al., 2022), and mammary gland tumors (Russo et al., 2021), generally carry a poor prognosis due to the aggressive biological behavior of these tumors and the limited long-term treatment success (Zandvliet 2016; Kohart et al., 2017). Conversely, dogs with PHPT generally have a favorable prognosis after surgical treatment with long-term normocalcemia achieved in most cases (Jores and Kessler 2011; Young and Degner 2023). Human population data indicate that PHPT patients with a maximum serum calcium concentration  $\geq 10.8$  mg/dL have

increased mortality and that parathyroidectomy significantly improves survival in this high-calcium subgroup (Wermers et al., 2021); however, comparable data defining calcium thresholds or demonstrating a survival benefit of parathyroidectomy at specific serum calcium concentrations are lacking in dogs. Nevertheless, untreated or poorly managed hypercalcemia in PHPT can still result in irreversible renal damage, reducing overall survival (Cortadellas et al., 2010; Assadipour et al., 2019).

Although rare, PHPT is a potentially curable disease, and dogs that undergo successful surgical removal of the affected parathyroid gland (s) generally have an excellent prognosis (Young and Degner 2023). Nonetheless, severe postoperative hypocalcemia is a recognized and common complication (Erickson et al., 2021; Travail et al., 2025).

Hypocalcemia is a clinically significant electrolyte disturbance in dogs and can arise from a variety of underlying conditions. It is most commonly associated with critical illness, acute kidney injury, eclampsia, certain toxicities, protein-losing enteropathy, and hypoparathyroidism (either primary or secondary to parathyroidectomy) (Holowaychuk et al., 2012; Coady et al., 2019; Gagliardo et al., 2020). Importantly, hypocalcemia can also occur following parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism. In such cases, chronic suppression of normal parathyroid tissue due to persistently elevated circulating PTH concentrations may impair the ability of the remaining glands to restore normocalcemia postoperatively (Mu et al., 2023; Xu et al., 2024).

This report describes the clinical presentation, diagnostic workup, surgical management, and postoperative complications, especially hypocalcemia, of a dog with persistent hypercalcemia caused by parathyroid carcinoma. This case highlights the importance of accurate diagnosis, appropriate postoperative management, and the recognition of delayed hypocalcemia following parathyroidectomy in achieving a favorable outcome in a dog with parathyroid carcinoma.

## Case description

An 11-year-old spayed female Chow Chow was presented to a private veterinary clinic with a history of decreased appetite and mild depression. A complete blood count (CBC) and serum biochemistry revealed mild azotemia with a creatinine concentration of 1.6 mg/dL (reference interval [RI]: 0.3–1.4 mg/dL) and markedly elevated total serum calcium at 16 mg/dL (RI: 8.6–11.8 mg/dL), a low serum phosphorous concentration of 2.3 mg/dL (RI: 2.9–6.66 mg/dL), and a PTH level of 2.4 pg/mL (RI: 10–65 pg/mL), measured by a human laboratory assay that is not validated for animals. Thoracic radiography demonstrated a normal cardiac silhouette and unremarkable pulmonary parenchyma. Abdominal ultrasonography revealed multiple small hyperechoic mineralizations within the renal diverticula without evidence of renal pelvis dilation. Bilateral adrenal gland enlargement was also identified. The left adrenal gland measured 2.34 cm at the cranial pole and 1.74 cm at the caudal pole, with three hyperechoic nodules in the cranial pole parenchyma. The right adrenal gland measured 0.7 cm at the cranial pole and 1.6 cm at the caudal pole, with a hyperechoic nodular lesion (0.4 × 0.5 cm) at the caudal pole. Fluid therapy was initiated to correct dehydration, and reassessment was performed one week later. Azotemia had improved; however, hypercalcemia persisted (16 mg/dL). Ionized calcium (iCa) was also elevated at 2.08 mmol/L (RI: 1.1–1.4 mmol/L).

The dog was referred to Prasu Arthon Animal Hospital (Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Thailand) for further investigation of persistent hypercalcemia. On examination, the dog was alert, responsive, 5% dehydrated, and exhibited mild hindlimb lameness. Total calcium remained elevated at 18 mg/dL (Biosystem BA400), and iCa was 2.0 mmol/L (Siemens, RAPIDLab®348EX). Based on the differential diagnoses of primary hyperparathyroidism versus paraneoplastic hypercalcemia, a computed tomography (CT) scan (helical

contrast-enhanced CT scan, 1.25 mm and 0.625 mm slice thickness) was performed. CT findings included enlargement of the left external cranial parathyroid gland (0.6 × 0.5 × 0.5 cm) and the right internal caudal parathyroid gland (0.5 × 0.3 × 0.3 cm) (Figure 1). These findings supported differential diagnoses of functional parathyroid adenoma, adenocarcinoma, or hyperplasia. Bilateral adrenomegaly with a left adrenal mass (2.7 × 1.7 cm) was also observed.

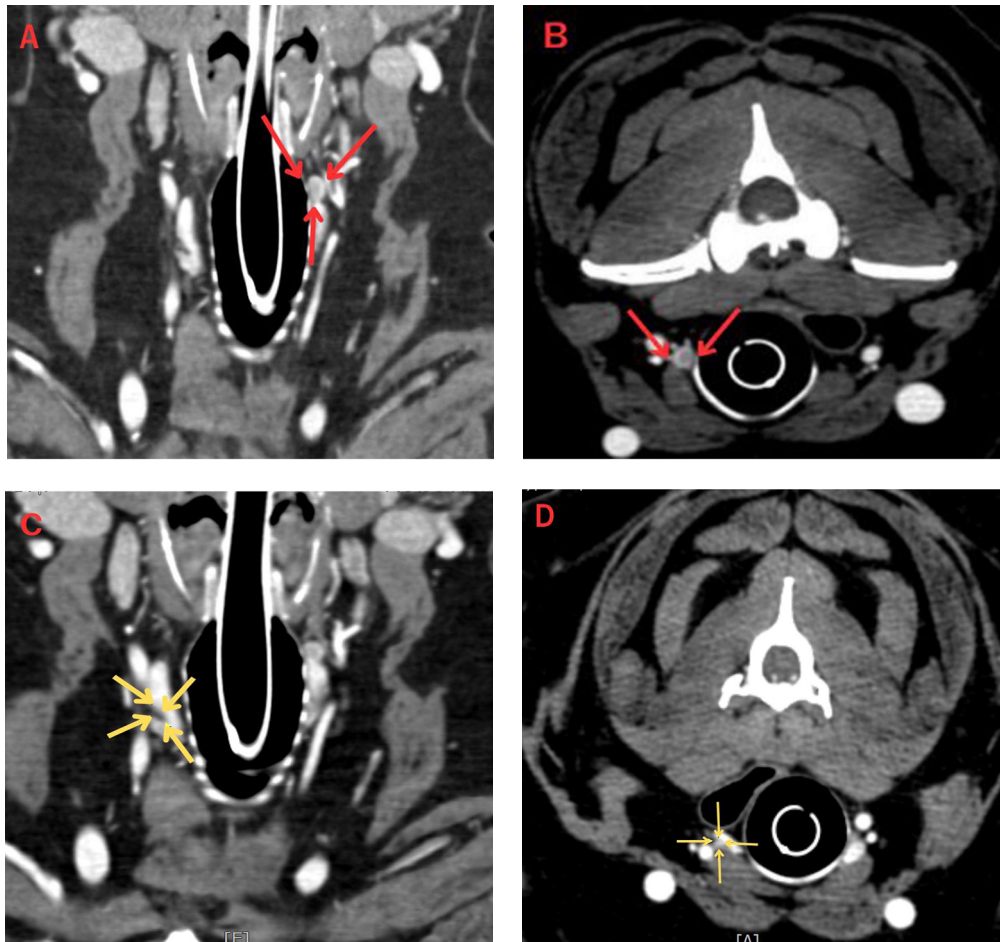
Surgical intervention was undertaken via a ventral cervical approach. A left cranial parathyroidectomy and partial right thyroidectomy with caudal parathyroidectomy were performed, and tissue samples were collected for histopathological evaluation (Figure 2). Histopathology revealed a proliferation of neoplastic neuroendocrine cells arranged in short columnar patterns, with moderate amounts of eosinophilic cytoplasm. Nuclei were round, finely stippled to vesiculated, and contained 1–2 nucleoli, with one mitotic figure observed, finding highly suggestive of parathyroid carcinoma (Figure 3).

The dog was hospitalized for postoperative monitoring. During the immediate postoperative period (postoperatively days 1–5), iCa concentrations normalized (RI: 1.12–1.40 mmol/L), vital parameters remained stable, and no surgical complications were observed. The patient was discharged in good condition.

On postoperative day 9, iCa had decreased to 0.8 mmol/L, but the dog remained asymptomatic. The dog was closely monitored, with iCa measurements performed every other day, and the owner was instructed to observe for signs of hypocalcemia. By day 12, iCa had dropped to 0.6 mmol/L, accompanied by clinical signs of hypocalcemia, including muscle twitching and tetany. Emergency management consisted of intravenous administration of 10% calcium gluconate at 100 mg/kg administered over 30 minutes, followed by a continuous rate infusion at 100 mg/kg/h over 6 hours once daily for 3 consecutive days. Thereafter, oral calcitriol was administered at 0.01 µg/kg twice daily for 7 days. Serum iCa normalized to 1.45

mmol/L within 4 days of initiation of oral calcitriol treatment. The calcitriol dosage was gradually tapered to 0.01 µg/kg once daily for 7 days, then every other day for 14 days, and ultimately discontinued after a total treatment duration of 4 weeks. Two

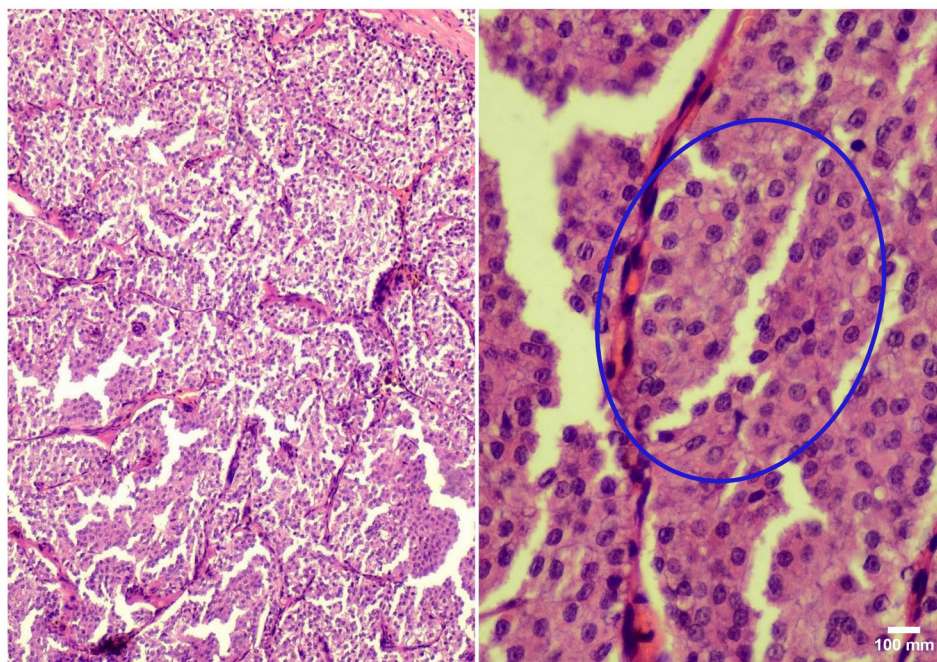
weeks after cessation of calcitriol, iCa remained stable at 1.26 mmol/L (Table 1), and the dog remained clinically normal.



**Figure 1.** Computed tomography (CT) images of the parathyroid glands. (A) Dorsal and (B) transverse planes of the left external cranial pole parathyroid gland (red arrows). (C) Dorsal and (D) transverse planes of the right internal caudal pole parathyroid gland (yellow arrows).



**Figure 2.** Parathyroidectomy, the grey arrow indicates the left external cranial parathyroid gland to be excised.



**Figure 3.** Histopathologic section of an ovoid parathyroid mass with soft to firm consistency, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The blue circle indicates infiltrative proliferation of neoplastic neuroendocrine cells. The neoplastic cells are predominantly arranged in dense sheets separated by delicate collagenous stroma. The cells are short columnar with moderate eosinophilic cytoplasm. The nuclei are round with mild anisokaryosis.

**Table 1.** Summary of ionized and total calcium concentrations in the pre- and postoperative periods.

Day	Ionized calcium (1.12-1.4 mmol/L)	Total calcium (8-11.8 mg/dL)
Initial diagnosis	2.08	16
Parathyroidectomy	-	-
Postoperative day 1 (12 hours)	1.4	13.7
Postoperative day 1 (24 hours)	1.3	-
Postoperative day 2	1.1	-
Postoperative day 3	1.23	9.3
Postoperative day 4	1.4	-
Postoperative day 5	1.1	8.9
Postoperative day 9	0.8	-
Postoperative day 12	0.6	-
3 days after initial 10% calcium gluconate 2 ml/kg	0.8	7.6
4 days after initial oral calcitriol 0.01 µg/kg (BID)	1.45	-
7 days after oral calcitriol 0.01 µg/kg (BID)	1.4	-
7 days after oral calcitriol 0.01 µg/kg (SID)	1.5	11.6
14 days after oral calcitriol 0.01 µg/kg (QOD)	1.3	-
14 days after cessation of oral calcitriol	1.26	-

## Discussion

Primary hyperparathyroidism (PHPT) is an uncommon endocrine disorder in dogs, most often caused by a functional parathyroid adenoma, and less frequently by hyperplasia or adenocarcinoma (Jores and Kessler 2011; Cordella et al., 2022). The concurrent adrenal masses observed in this dog, in the absence of clinical signs of hyperadrenocorticism, were considered likely incidental findings and most consistent with non-functional adrenal enlargement. Similar cases of adrenal gland enlargement without clinical manifestations have been reported in dogs (Baum et al., 2016). In this case, PTH measurement was performed at a private veterinary clinic; however, the results could not be interpreted because the assay used was designed for humans and is

not validated for canine samples. Nevertheless, the combination of persistent hypercalcemia and CT evidence of bilateral parathyroid enlargement strongly supported a tentative diagnosis of primary hyperparathyroidism and informed surgical planning.

The microscopic description of this dog revealed an infiltrative proliferation of neoplastic neuroendocrine cells arranged in dense sheets, nests, and acini/tubules, characterized by short columnar cells with moderate eosinophilic cytoplasm. The nuclei were round with mild anisokaryosis. These features are consistent with the general appearance of neuroendocrine carcinoma, including that of the parathyroid gland (Kuwata et al., 2010; Champion et al., 2025), reflecting its neuroendocrine origin and infiltrative behavior, with a pathophysiology linked to PTH overproduction leading to bone resorption and hypercalcemia.

Parathyroidectomy remains the treatment of choice for parathyroid carcinoma (PTC) in dogs and is generally associated with favorable long-term outcomes. A large multicenter retrospective study of 100 dogs with PTC demonstrated that normocalcemia was restored in 89 of 96 cases within 7 days of surgery, and survival rates were also encouraging, with 1-, 2-, and 3-year survival rates of 84%, 65%, and 51%, respectively, and a median survival time of approximately 2 years (Erickson et al., 2021). In the present case, the dog remained alive and clinically stable for 16 months (1.4 years) following parathyroidectomy. Intensive monitoring of overall health, ionized calcium concentration, and adrenal mass size was performed monthly for the first 3 months postoperatively, during which all parameters remained within normal limits. Once stability was confirmed, the monitoring interval was extended to every 3 months. Throughout follow-up, ionized calcium levels remained within the reference range, the adrenal mass did not increase in size, and no clinical abnormalities were noted.

Although parathyroid carcinoma in dogs has the potential for local invasion, as well as regional nodal or distant metastasis, such findings have not been consistently documented (Sawyer et al., 2012). Recurrence of functional parathyroid carcinoma has been reported more than 6 months after surgical excision in some dogs (Capen 2002), highlighting the importance of long-term monitoring. In the current case, no evidence of recurrence or metastatic disease was detected during the 16-month follow-up period.

These findings highlight that PTC is a curable disease with a good prognosis when accurately diagnosed and appropriately managed. Despite these positive outcomes, postoperative hypocalcemia is one of the most common complications after parathyroidectomy. Approximately 36% of dogs undergoing surgery for PTC or PHPT experience hypocalcemia within the first 2–4 days postoperatively (Dear et al., 2017; Burkhardt et al., 2021; Travail et al., 2025). However,

the prediction of postoperative hypocalcemia in dogs with primary hyperparathyroidism that underwent parathyroidectomy is difficult and depends on multiple factors. Dogs with higher preoperative calcium concentrations are more likely to develop hypocalcemia postoperatively, possibly due to negative feedback from high circulating levels of PTH, which suppresses function in the remaining parathyroid glands (Mu et al., 2023; Xu et al., 2024).

Importantly, the onset of hypocalcemia can be delayed, with reports documenting such cases. Twelve dogs developed hypocalcemia within a median of 34 hours after surgery, and some dogs developed clinical signs of hypocalcemia as late as 7 days after surgery (Arbaugh et al., 2012; Milovancev and Schmiedt 2013; Erickson et al., 2021).

In the present case, the dog remained normocalcemic for the first 5 postoperative days but developed severe hypocalcemia on days 9 and 12, with iCa levels dropping to 0.8 and 0.6 mmol/L, respectively. Clinical signs of hypocalcemia were evident, including muscle twitching and tetany. This delayed presentation emphasizes the importance of vigilant postoperative monitoring extending beyond the immediate recovery period. Intravenous calcium gluconate (at dosages of 0.5–1.5 mL/kg) remains the first-line therapy for acute symptomatic hypocalcemia, while calcitriol therapy (at a dose of 0.02–0.03 µg/kg for 3–4 days for induction, then 0.005–0.015 µg/kg for maintenance) is titrated to the desired serum calcium concentration. Intravenous calcium gluconate provided rapid correction of extracellular hypocalcemia, whereas calcitriol supported recovery by enhancing intestinal calcium absorption and maintaining serum calcium as parenteral supplementation was tapered (Groman 2012). In this case, this combination addressed both the acute calcium deficit and facilitated restoration of calcium homeostasis during postoperative recovery.

Importantly, dogs that underwent surgery before the development of severe renal disease had significantly better

outcomes. One retrospective study of 29 dogs with PHPT found that those without renal failure at the time of parathyroidectomy had better long-term survival times, ranging from 6 months to over 3.5 years after surgical treatment, with most patients maintaining normocalcemia following resolution of postoperative complications, while dogs with pre-existing or developing renal failure had poorer outcomes (Gear et al., 2005). These findings, combined with the present case, demonstrate the value of early, accurate diagnosis, timely surgery, and aggressive management of hypocalcemia following parathyroidectomy, not only resolving life-threatening hypercalcemia but also providing an excellent long-term prognosis.

In primary hyperparathyroidism, chronically elevated PTH concentrations result in increased bone resorption and high bone turnover. Following parathyroidectomy, circulating PTH concentrations decrease abruptly, and the previously high-turnover bone shifts from net mineral release to rapid mineral uptake. This process leads to a decline in blood ionized calcium (iCa) concentrations over hours to days and is commonly referred to as the “hungry bone” phenomenon (Graham et al., 2012; Travail et al., 2025).

In dogs, hypocalcemia after parathyroidectomy typically develops between 12 hours and 7 days postoperatively, most commonly between postoperative days 2 and 6 (Burkhardt et al., 2021; Travail et al., 2025). This delayed onset supports a bone-mediated mechanism rather than an immediate perioperative loss of calcium (Graham et al., 2012). Older dogs and those with prolonged or severe hypercalcemia are likely to have more extensive skeletal remodeling and, consequently, may experience more pronounced postoperative calcium uptake and hypocalcemia (Milovancev and Schmiedt 2013).

Although direct canine comparative data are limited, human and veterinary evidence suggest that parathyroid carcinoma is more genetically aggressive and functionally autonomous than adenoma (Li et al., 2024). This likely causes more profound chronic suppression and atrophy of the remaining

parathyroid tissue, helping explain prolonged postoperative hypoparathyroidism and unusually severe hypocalcemia in affected dogs (Erickson et al., 2021).

Pre-existing nephrocalcinosis in this dog may substantially impair PTH-mediated tubular calcium reabsorption and calcitriol synthesis, limiting both renal conservation and intestinal uptake of calcium. This provides a plausible mechanistic link to unusually severe, prolonged postoperative hypocalcemia after parathyroid surgery.

In dogs with naturally occurring hypercortisolism with bilateral adrenomegaly, total and ionized calcium concentrations are typically within the reference range, although increased phosphate concentrations, increased urinary calcium excretion, and secondary elevations in parathyroid hormone have been reported (Mooney et al., 2020; Corsini et al., 2021). Overt hypocalcemia is uncommon in this setting. Therefore, while adrenal enlargement may indirectly influence calcium balance and endocrine regulation, it is unlikely to have been a primary contributor to hypocalcemia in this case.

A limitation of this case was the absence of a species-validated PTH assay. Only a human-based laboratory test was available, which is not validated for canine use and therefore uninterpretable. Consequently, the diagnosis could not be fully supported by PTH measurement. In this case, parathyroid carcinoma was diagnosed; however, the histologic evidence supporting malignancy was limited to mild anisokaryosis, and immunohistochemical confirmation would have strengthened the diagnosis. Unfortunately, immunohistochemistry could not be performed because of the owner’s financial constraints.

In conclusion, this case highlights several important points for the clinical diagnosis of persistent hypercalcemia with parathyroid enlargement and management of canine PTC. First, although rare, PTC should be considered in dogs with persistent hypercalcemia, and diagnosis requires integration of iCa measurement, PTH assays, and advanced imaging. Second, parathyroidectomy is the gold standard treatment, offering

a high likelihood of cure and favorable survival outcomes. Finally, clinicians should extend postoperative monitoring to detect delayed hypocalcemia, the most common postoperative complication, which may persist for at least several days, as rare cases may present later and should be prepared to manage it with calcium gluconate and vitamin D supplementation. With accurate diagnosis, appropriate surgical intervention, and diligent postoperative care, parathyroid carcinoma in dogs is a rare but highly treatable disease with a good long-term prognosis.

### Acknowledgements

The authors are grateful to the dog's owner, Assoc.Prof. Dr. Somkiat Huaijantug, and Dr. Adsada Langputeh for providing imaging information, as well as the staff of Prasu-Arthon Animal Hospital and Talingchan Animal Hospital for their assistance in providing patient information.

### References

- Arbaugh M, Smeak D, Monnet E. Evaluation of preoperative serum concentrations of ionized calcium and parathyroid hormone as predictors of hypocalcemia following parathyroidectomy in dogs with primary hyperparathyroidism: 17 cases (2001–2009). *J Am Vet Med Assoc.* 2012;241(2):233-6.
- Assadipour Y, Zhou H, Kuo E, Haigh P, Adams A, Yeh M. End-organ effects of primary hyperparathyroidism: A population-based study. *Surgery.* 2019;165:99-105.
- Baum J, Boston S, Case J. Prevalence of adrenal gland masses as incidental findings during abdominal computed tomography in dogs: 270 cases (2013–2014). *J Am Vet Med Assoc.* 2016;249(10):1165-9.
- Berger B, Feldman EC. Primary hyperparathyroidism in dogs: 21 cases (1976–1986). *J Am Vet Med Assoc.* 1987;191(3):350-6.
- Burkhardt S, Sumner J, Mann S. Ambidirectional cohort study on the agreement of ultrasonography and surgery in the identification of parathyroid pathology, and predictors of postoperative hypocalcemia in 47 dogs undergoing parathyroidectomy due to primary hyperparathyroidism. *Vet Surg.* 2021;50:1379-88.
- Capen C. Tumors and nonneoplastic cysts of the parathyroid gland. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in domestic animals.* 4<sup>th</sup> ed. Ames, IA: Iowa State Press; 2002. p. 665-9.
- Champion C, Miller A, Parry S, Demeter E. Immunohistochemical and histomorphologic characterization of canine neoplasms of the disseminated neuroendocrine system. *Vet Pathol.* 2025;62:490-501.
- Coady M, Fletcher D, Goggs R. Severity of ionized hypercalcemia and hypocalcemia is associated with etiology in dogs and cats. *Front Vet Sci.* 2019;6:276.
- Cordella A, Bertaccini J, Rondena M, Zoia A, Bertolini G. Multidetector-row CT findings in dogs with different primary parathyroid gland diseases. *Vet Sci.* 2022;9(6):273.
- Corsini A, Dondi F, Serio D, Zamagni S, Golinelli S, Fernandez M, et al. Calcium and phosphate homeostasis in dogs with newly diagnosed naturally occurring hypercortisolism. *J Vet Intern Med.* 2021;35:1265-73.
- Cortadellas O, Del Palacio M, Talavera J, Bayón A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. *J Vet Intern Med.* 2010;24(1):73-9.
- Dear J, Kass P, Della Maggiore A, Feldman E. Association of hypercalcemia before treatment with hypocalcemia after treatment in dogs with primary hyperparathyroidism. *J Vet Intern Med.* 2017;31:349-54.
- Erickson AK, Regier PJ, Watt MM, Ham KM, Marvel SJ, Wallace ML, et al. Incidence, survival time, and surgical treatment of parathyroid carcinomas in dogs: 100 cases (2010–2019). *J Am Vet Med Assoc.* 2021;259(11):1309-17.

- Gagliardo T, Ruggeri R, Di Paola A, Baroni M, Cherubini G, Gallucci A, et al. Clinical features of muscle cramp in 14 dogs. *J Vet Intern Med.* 2020;35(2):372-7.
- Gear R, Neiger R, Skelly BJ, Herrtage M. Primary hyperparathyroidism in 29 dogs: diagnosis, treatment, outcome and associated renal failure. *J Small Anim Pract.* 2005;46(1):10-6.
- Graham K, Wilkinson M, Ja C, Dhand N, Churcher R. Intraoperative parathyroid hormone concentration to confirm removal of hypersecretory parathyroid tissue and time to postoperative normocalcaemia in nine dogs with primary hyperparathyroidism. *Aust Vet J.* 2012;90(6):203-9.
- Groman RP. Acute management of calcium disorders. *Top Companion Anim Med.* 2012;27(4):167-71.
- Hilbe M, Sydler T, Fischer L, Naegeli H. Metastatic calcification in a dog attributable to ingestion of a tacalcitol ointment. *Vet Pathol.* 2000;37:490-2.
- Holowaychuk M, Birkenheuer A, Li J, Marr H, Boll A, Nordone S. Hypocalcemia and hypovitaminosis D in dogs with induced endotoxemia. *J Vet Intern Med.* 2012;26(2):244-51.
- Jores K, Kessler M. Primary hyperparathyroidism in the dog: diagnosis, therapy and postoperative management in 19 dogs. *Tierarztl Prax K.* 2011;39(6):389-96.
- Kohart NA, Elshafae SM, Breitbach JT, Rosol TJ. Animal models of cancer-associated hypercalcemia. *Vet Sci.* 2017;4(2):21.
- Kuwata K, Shibutani M, Kemmochi Y, Taniai E, Morita R, Ogawa BI, et al. A neuroendocrine carcinoma of undetermined origin in a dog. *J Toxicol Pathol.* 2010;23:151-5.
- Li Y, Simonds WF, Chen H. A Comparative Genomic Analysis of Parathyroid Adenomas and Carcinomas Harboring Heterozygous Germline CDC73 Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2025;110(2):429-40.
- Milovancev M, Schmiedt CW. Preoperative factors associated with postoperative hypocalcemia in dogs with primary hyperparathyroidism that underwent parathyroidectomy: 62 cases (2004–2009). *J Am Vet Med Assoc.* 2013;242(4):507-15.
- Mooney CT, Shiel RE, Sekiya M, Dunning M, Gunn E. A Preliminary Study of the Effect of Hyperadrenocorticism on Calcium and Phosphate Concentrations, Parathyroid Hormone and Markers of Bone Turnover in Dogs. *Front Vet Sci.* 2020;7:311.
- Mu Y, Zhao Y, Zhao J, Zhao Q, Zhang Y, Li Y, et al. Factors influencing serum calcium levels and the incidence of hypocalcemia after parathyroidectomy in primary hyperparathyroidism patients. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1276992.
- Repasy A, Selmic L, Kisseberth W. Canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma: A review. *Top Companion Anim Med.* 2022;47:100682.
- Russo C, Simonelli S, Luz M, Moreno I, Carrera A, Bracarense A. Hypercalcemia in bitches with malignant mammary neoplasms. *Pubvet.* 2021;15(8):1-8.
- Sawyer E, Northrup N, Schmiedt C, Culp W, Rassnick K, Garrett L, et al. Outcome of 19 dogs with parathyroid carcinoma after surgical excision. *Vet Comp Oncol.* 2012;10(1):57-64.
- Strumpf A, Selmic L, Husbands B. Evaluation of the clinical outcome of hypercalcemia of malignancy and concurrent azotemia in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2023;38:308-15.
- Travail V, Motta C, Lea C, Salas-Garcia A, Clarke K, Lombardo S, et al. Plasma parathyroid hormone concentration as a predictor of postoperative hypocalcemia in dogs diagnosed with primary hyperparathyroidism and treated with parathyroidectomy. *J Vet Intern Med.* 2025;39(2):e70016.

- Wermers RA, Griebeler ML, Thapa P, Hathcock MA, Kearns AE. Survival in primary hyperparathyroidism over five decades (1965–2010): a population-based retrospective study. *Bone*. 2021;152:116099.
- Wilson JW, Harris SG, Moore WD, Leipold HW. Primary hyperparathyroidism in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1974;164(9):942-6.
- Xu J, Kong N, Bai N, Zhang Z, Cui A, Tan S, et al. Identification of novel risk factors for postoperative severe hypocalcemia in patients with primary hyperparathyroidism undergoing parathyroidectomy. *BMC Endocr Disord*. 2024;24(1):88.
- Young KM, Degner DA. Surgical description and outcome of ultrasound-guided minimally invasive parathyroidectomy in 50 dogs with primary hyperparathyroidism. *Vet Surg*. 2023;52(1):18-25.
- Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. *Vet Q*. 2016;36:104-76.

# Retrospective Study of the Incidence of Spontaneous Nonneoplastic Lesions in Wistar Rats (Mlac:WR) from 90-Day Oral Gavage Studies

Chinnadit Ngamwongronnchai\*, Nuntalak Keawsa-Ard, Ganyawee Rittisorntanoo

Laboratory Analysis Unit, Division of Academic Service, National Laboratory Animal Center,  
Mahidol University, Nakhon Pathom, 73170 Thailand

\*Corresponding author, E-mail address: chinnadit.nga@mahidol.ac.th

Received: 6 November 2025; Revised: 30 December 2025; Accepted: 8 January 2026

## Abstract

Historical control data (HCD) of background lesions provide useful information on the range and incidence of spontaneous lesions in a specific animal model. The microscopic examination data were collected from 84 male and 86 female Wistar rats (Mlac:WR) used in 90-day oral gavage studies conducted at the National Laboratory Animal Center, Mahidol University (NLAC-MU), from 2023 to 2025. We retrospectively evaluated spontaneous nonneoplastic findings in the vital organs for toxicity assessment. This study reported the organ weights, numbers, incidence, and severity of the spontaneous nonneoplastic findings in the Wistar rat, aiming to establish a contemporaneous three-year database on the incidence of background lesions, as part of microscopic alterations, and to aid in the future evaluation of 90-day oral toxicity studies. The most common spontaneous findings observed in both sexes were minimal to moderate multifocal hemorrhage in the thymus (32.14% males, 22.09% females), minimal to moderate hemorrhage in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) (23.81% males, 17.44% females), ectopic adrenocortical tissue in the adrenal cortex (21.43% males, 19.77% females), and minimal to moderate dilation of gastric glands in the stomach (23.81% males, 12.79% females). We also reported sex-related spontaneous lesions, including hyaline casts in the renal cortex (23.81% males, 1.16% females), tubular basophilia in the renal cortex (9.52% males, 1.16% females), and ectopic thymus tissue in the thyroid gland (9.52% males, 0% females). In summary, HCD of background lesions in Wistar rats from 90-day oral gavage studies is essential for accurate histopathological interpretation in 90-day oral toxicity studies.

**Keywords:** Wistar rat, Spontaneous lesions, Nonneoplastic, 90-day oral toxicity studies

# การศึกษาแบบย้อนหลังของอุบัติการณ์รอยโรคที่เกิดขึ้นเองชนิดไม่ใช่เนื้องอก ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Mlac:WR) จากการทดสอบการได้รับสาร ทางปาก 90 วัน

จินนิต งามวงศ์รัชชัย\*, นันทลักษณ์ แก้วสอาด, กัญญาวีร์ ฤทธิศรธนู

หน่วยตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ งานบริการวิชาการ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล  
จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

\*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: chinnadit.nga@mahidol.ac.th

Received: 6 November 2025; Revised: 30 December 2025; Accepted: 8 January 2026

## บทคัดย่อ

การบันทึกข้อมูลรอยโรคที่เกิดขึ้นเองสามารถทำให้ทราบถึงขอบเขตและอุบัติการณ์ของรอยโรคลักษณะต่างๆ ในสัตว์ทดลองต้นแบบที่ใช้ในการศึกษา โดยการศึกษาย้อนหลังรอยโรคชนิดที่เกิดขึ้นเองซึ่งไม่ใช่โรคเนื้องอกในครั้งนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Mlac:WR) เพศผู้จำนวน 84 ตัว และเพศเมียจำนวน 86 ตัว จากโครงการทดสอบการได้รับสารทางปากเป็นระยะเวลา 90 วัน ภายใต้ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างปี พ.ศ. 2566 ถึง 2568 โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะภายในที่สำคัญเพื่อใช้ในการประเมินความเป็นพิษในการศึกษาทางพิษวิทยา การศึกษานี้ได้รายงานน้ำหนักของอวัยวะ จำนวนสัตว์ที่พบรอยโรค อุบัติการณ์ และระดับความรุนแรงของรอยโรคชนิดที่ไม่ใช่เนื้องอกซึ่งพบได้บ่อยในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำฐานข้อมูลอ้างอิงของรอยโรคที่เกิดขึ้นเองในช่วงระยะเวลา 3 ปี และเพื่อใช้ประกอบการประเมินการตอบสนองของเนื้อเยื่อในการศึกษาความเป็นพิษจากการได้รับสารทางปากเป็นเวลา 90 วัน จากผลการศึกษาพบว่ารอยโรคที่พบได้บ่อยในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ได้แก่ 1. การพบจุดเลือดออกที่ต่อมไทมัส (ร้อยละ 32.14 ในเพศผู้และร้อยละ 22.09 ในเพศเมีย) 2. การพบเลือดออกที่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองข้างเคียงหลอดลม (BALT) (ร้อยละ 23.81 ในเพศผู้และร้อยละ 17.44 ในเพศเมีย) 3. การเจริญผิดที่ของเนื้อเยื่อต่อมหมวกไต (ร้อยละ 21.43 ในเพศผู้และร้อยละ 19.77 ในเพศเมีย) และ 4. การขยายขนาดของต่อมในกระเพาะอาหาร (ร้อยละ 23.81 ในเพศผู้และร้อยละ 12.79 ในเพศเมีย) นอกจากนี้ยังพบรอยโรคที่มีความสัมพันธ์กับเพศได้แก่ การพบ hyaline cast ในเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (ร้อยละ 23.81 ในเพศผู้และร้อยละ 1.16 ในเพศเมีย) การพบ tubular basophilia ในเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (ร้อยละ 9.52 ในเพศผู้และร้อยละ 1.16 ในเพศเมีย) และการเจริญผิดที่ของเนื้อเยื่อต่อมไทมัสที่ต่อมไทรอยด์ (ร้อยละ 9.52 ในเพศผู้และไม่พบในเพศเมีย) ด้วยเหตุนี้ การมีข้อมูลรอยโรคชนิดที่เกิดขึ้นเองในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ที่ได้รับสารทางปากเป็นเวลา 90 วัน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาอย่างถูกต้องในการทดสอบความเป็นพิษทางปากเป็นเวลา 90 วัน

คำสำคัญ: หนูแรทสายพันธุ์ Wistar รอยโรคเกิดขึ้นเอง ไม่ใช่เนื้องอก การทดสอบความเป็นพิษทางปาก 90 วัน

## Introduction

Historical control data (HCD) on background lesions in relevant animal models are considered one of the most important tools for interpreting and evaluating safety data in nonclinical toxicity studies, particularly in pharmaceutical and Contract Research Organization (CRO) settings conducted under the Organisation for Economic Co-operation and Development Good Laboratory Practice (OECD-GLP) toxicity testing guidelines. It is generally believed that HCD from concurrent control groups provides an equivocal comparison and interpretation for the treated groups (Keenan et al., 2009). However, a potential limitation of using HCD is the variability and drift over time in animal- and study-related factors such as animal genetics, experimental environment, and macroscopic and microscopic pathological interpretation (Wolf and Mann 2005). Numerous references have reported the incidence of spontaneous lesions in rats; however, most of these studies have used the Sprague-Dawley (SD) rat as the animal model (Nakazawa et al., 2001; Bockenstedt et al., 2025). The present study provides this information for the establishment of a contemporaneous three-year database from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University (NLAC-MU) for a specific animal model, the Wistar (WR) rat, which is the strain most commonly used in Thailand due to its greater longevity and lower incidence of certain tumors (Taylor and Mowat 2020).

Recording organ weight, severity, morphology, and distribution of background (incidental) lesions provides important insight into the underlying pathogenesis. This information is valuable for classifying the spontaneous changes as congenital or hereditary (Thoolen et al., 2010; Brändli-Baiocco et al., 2018), normal variations unique to the histology of a given species (Long and Hardisty 2012), procedure- or trauma-related (Ibrahim et al., 2025), age-related (McInnes and Scudamore 2014), and physiologic/hormonal changes, such as the estrus cycle in female rats (Dixon et al., 2014). In addition, it offers useful data on the

range and incidence of spontaneous background findings in the species and strain of test animals used across different types of toxicity testing, including those of varying duration, test item/article delivery methods, and animal models (Bockenstedt et al., 2022).

According to OECD-GLP Guideline Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, the vital organs for evaluating general toxicity include the heart, lungs, liver, spleen, kidneys, stomach, small and large intestines, thymus, thyroid and parathyroid glands, adrenal glands, pituitary gland, testes, epididymides, male accessory sex glands (prostate gland and seminal vesicles), ovaries, uterus, cervix, and vagina. Safety evaluation of these organs provides essential toxicological data for test item/article registration in Thailand, including the identification of target organ(s) of toxicity, determination of the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL), establishment of a safety factor to progress the compound toward clinical development, and the assessment of reversibility of test item/article-related changes (Black et al., 2013). The International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND), established by the Society of Toxicologic Pathology (STP), has published standardized terms and glossaries for the diagnosis of lesions in various organ systems, fully covering all tissue types examined in the present study.

In this study, HCD on nonneoplastic histopathological findings – including organ weight, number, incidence, and severity of naturally occurring lesions – were collected from 170 Wistar rats (84 males and 86 females) used in 90-day oral gavage studies at the NLAC-MU. Neoplastic lesions were not included in this analysis. The objectives of this investigation were to establish a contemporaneous three-year database of the incidence of background lesions, as part of microscopic and morphologic alterations observed in Wistar rats subjected to 90-day oral gavage, and to support the future evaluation of 90-day oral toxicity studies.

## Materials and methods

### Animal condition

Nonneoplastic lesions data were collected from 84 male and 86 female Wistar rats (Mlac:WR) in 90-day oral gavage studies. All animals received sterile water, a common vehicle in oral toxicity studies, once daily for 90 days (13 weeks) at the animal facility of the National Laboratory Animal Center, Mahidol University (NLAC-MU) from 2023 to 2025. Sterile water is a universally accepted ideal vehicle for oral dosing, having no chemical, biochemical, immunological, or pharmacological effects on the test item/article or the host (Singh et al., 2012). The animals were bred by the Division of Animal Production, NLAC-MU. Upon receipt, the animals were 5 weeks of age. After a 1-week quarantine and acclimatization period, oral gavage with sterile water began at 6 weeks of age. Inclusion criteria required animals to have comparable body weight (within  $\pm 20\%$  of the mean body weight), be healthy, free of observable congenital anomalies, and free of major infectious pathogens (as determined by the routine health monitoring program). Animals were housed two per plastic cage with a solid bottom, in a low-barrier HVAC (Heating, Ventilation, and Air Conditioning) system. Room temperature was maintained at  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , relative humidity at 30–70%, and animal rooms were kept under positive pressure. A 12-hour light/dark cycle was maintained using standard fluorescent lighting. Rats had free access to reverse osmosis (RO) water containing 5–7 ppm chlorine and a standard diet (082: Perfect Companion Group CO., Ltd.). Corn cob and dried water hyacinth (rod form) were provided as animals' bedding, while dried water hyacinth (ribbon form) was used for environmental enrichment.

### Ethical statement

Animal care and use followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8<sup>th</sup> edition, in an AAALAC

International-accredited program. All procedures were approved by the NLAC Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

### Oral gavage, sample collection, and organ weight

Oral gavage was performed by highly experienced personnel to minimize the risk of aspiration into the respiratory tract. A feeding needle was used for sterile water administration, passing through the esophagus into the stomach. After 90 days of dosing (19 weeks of age), all animals were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation, and complete necropsies were performed. Tissues, including the liver, kidneys, heart, spleen, lungs, stomach, small and large intestines, thymus, thyroid and parathyroid glands, pituitary gland, adrenal glands, testes, epididymides, male accessory sex glands (prostate gland and seminal vesicles), ovaries, uterus, cervix, and vagina, were collected and trimmed. The aforementioned organs, except for the lungs, stomach, small and large intestines, cervix, and vagina, were weighed using an electronic balance with 5 digits (XSE205 DU, Mettler Toledo, Switzerland). All collected organs were preserved in 10% neutral buffered formalin (NBF).

### Slide preparation and examination

H&E-stained tissue slides were prepared from preserved organs using routine histological techniques, including tissue trimming, processing, embedding, sectioning, staining, and mounting. Informed (non-blinded) microscopic examinations were performed by a single study pathologist using a light microscope (Leica DM2000 LED, Germany), and the images were captured using a 0.55x mount with a digital camera (Leica MC170 HD, Switzerland), using the Leica Application Suite software (version 4.9.0). For microscopic examinations, diagnostic terms and glossaries followed the International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND), developed by the Societies of Toxicologic Pathology

from Europe (ESTP), Great Britain (BSTP), Japan (JSTP), and North America (STP). Lesion grading, with the exception of previously reported congenital lesions, was performed semi-quantitatively using a five-point scale, assigned as minimal (+1),

mild (+2), moderate (+3), severe (+4), and massive (+5). The scales were applied in direct proportion to the number of foci or the affected lesion areas (Table 1).

**Table 1.** Grading scheme for the evaluation of nonneoplastic lesions (modified from Thoolen et al., 2010; Schafer et al., 2018).

Grade	Severity	Proportion of tissue affected	Quantifiable finding
+1	Minimal	Very small amount (<5% of tissue affected)	1–2 foci
+2	Mild	Small amount (5–20% of tissue affected)	3–6 foci
+3	Moderate	Medium amount (20–40% of tissue affected)	7–12 foci
+4	Severe	Large amount (40–60% of tissue affected)	>12 foci
+5	Massive	Very large amount (>60% of tissue affected)	Diffuse

### Data analysis

All absolute organ weights of both male and female rats were converted to relative organ weights, calculated as the organ-to-body weight ratio per 100 g of body weight. Meanwhile, the mean severity scores of the most common lesions were calculated using the grades from the established grading scheme (score 1–5; Table 1). Data were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD), with the coefficient of variation (CV) reported for average relative organ weights, and as mean  $\pm$  SD for average severity scores.

The occurrence and incidence of each background lesion in male and female rats were recorded and categorized by organ system and sex. The descriptive analysis of incidence was calculated as a percentage using the following formula: Incidence (%) = (number of animals with the lesions/total number of animals examined)  $\times$  100.

### Statistical methods

Statistical analyses were conducted to compare the incidence of lesions between male and female rats. A Fisher's exact test was performed using PASW Statistics (version 18) to analyze the incidence of nonneoplastic lesions (Table 3). For all tests, a  $P$ -value  $\leq$  0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Organ weight

Relative organ weight data (per 100 g body weight) at scheduled euthanasia (19 weeks of age) were presented in Table 2. Overall, the results demonstrated general consistency of relative organ weights. In male rats, the coefficients of variation (CVs) were less than 10% for most organs examined, with the exception

of the right and left testis, left epididymis, thymus, and male accessory sex glands (prostate gland with seminal vesicles), which showed CVs of 10.72%, 11.30%, 11.73%, 19.35%, and 57.15% respectively. In contrast, female rats exhibited CVs greater than 10% for the left thyroid and parathyroid gland (11.26%), thymus (14.11%), and CVs greater than 20% for the right ovary (21.69%), left ovary (21.02%), and uterus (28.53%). The remaining organs in female rats showed CVs of less than 10%.

**Table 2.** Averages of the relative organ weight (g) per 100 g of body weight.

Organs	Males (n = 84)		Females (n = 86)	
	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV
Liver	2.6604 ± 0.15	5.74%	2.5840 ± 0.21	8.08%
Right kidney	0.2623 ± 0.02	7.61%	0.2913 ± 0.02	6.73%
Left kidney	0.2528 ± 0.02	6.89%	0.2783 ± 0.02	6.47%
Heart	0.3039 ± 0.01	5.08%	0.3580 ± 0.02	5.39%
Spleen	0.1745 ± 0.01	8.26%	0.2304 ± 0.02	8.33%
Pituitary gland	0.0022 ± 0.00	4.91%	0.0049 ± 0.00	8.68%
Right thyroid and parathyroid gland	0.0021 ± 0.00	9.73%	0.0031 ± 0.00	8.15%
Left thyroid and parathyroid gland	0.0020 ± 0.00	6.63%	0.0028 ± 0.00	11.26%
Right adrenal gland	0.0074 ± 0.00	5.82%	0.0170 ± 0.00	5.15%
Left adrenal gland	0.0083 ± 0.00	6.10%	0.0183 ± 0.00	3.36%
Thymus	0.0622 ± 0.01	19.35%	0.0927 ± 0.01	14.11%
Right testis	0.3741 ± 0.04	10.72%	-	-
Left testis	0.3778 ± 0.04	11.30%	-	-
Right epididymis	0.1170 ± 0.01	9.34%	-	-
Left epididymis	0.1173 ± 0.01	11.73%	-	-
Male accessory sex gland (prostate/seminal vesicle)	0.3817 ± 0.22	57.15%	-	-
Right ovary	-	-	0.0210 ± 0.00	21.69%
Left ovary	-	-	0.0210 ± 0.00	21.02%
Uterus	-	-	0.1821 ± 0.05	28.53%

### Microscopic finding

Microscopic examinations under the present experimental conditions revealed the most commonly observed nonneoplastic lesions in both male and female Wistar rats (Mlac:WR). These included minimal to moderate multifocal hemorrhage in the thymus (32.14% incidence with a mean severity score of  $1.74 \pm 0.75$  in males and 22.09% incidence with a mean severity score of  $1.79 \pm 0.61$  in females) (Figure 1A and 1B); minimal to moderate hemorrhage in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) (23.81% incidence with a mean severity score of  $1.25 \pm 0.62$  in males and 17.44% incidence with a mean severity score of  $1.20 \pm 0.54$  in females) (Figure 1C); minimal to moderate dilation of gastric glands in the glandular stomach (23.81% incidence with a mean severity score of  $1.35 \pm 0.48$  in males and 12.79% incidence with a mean severity score of  $1.09 \pm 0.29$  in females) (Figure 1E and 1F); and ectopic adrenocortical tissue in the adrenal cortex (21.43% in males and 19.77% in females) (Figure 1D).

In the histopathological examination of the kidneys, a high incidence of minimal to mild, focal to multifocal hyaline casts in the renal cortex (Figure 2A and 2B) was more commonly observed in males (23.81%), than in females (1.16%), with a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between sexes. Similarly, minimal tubular basophilia in the renal cortex (Figure 2D) occurred more frequently in males (9.52%) than in females (1.16%), with a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between sexes. In contrast, minimal focal intratubular mineralization in the renal medulla (Figure 2C) was identified as a background lesion with no significant difference in incidence between females (11.63%) and males (5.95%).

An ultimobranchial cyst within the thyroid tissues was observed at a similar incidence in males (11.90%) and females (11.63%) (Figure 2E and 2F). In contrast, ectopic thymus tissue in the thyroid gland was observed only in males (9.52%), with a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between sexes when

compared to the incidence of females (0%). Regarding dynamic changes in the female reproductive tract and grossly observed clear fluid retention at necropsy (29 female rats), histopathological examinations of the uterus and vagina indicated that proestrus was the most common finding (75.86%), followed by diestrus (13.79%) and estrus (10.35%). However, no females were observed in metestrus.

Other less common nonneoplastic findings included minimal infiltration of mononuclear inflammatory cells in the hepatic tissue (2.38% males, 3.49% females); hepatodiaphragmatic nodule in the liver (1.19% males, 1.16% females) (Figure 3A and 3B); minimal macrovesicular/microvesicular fatty change in the liver (1.19% males, 1.16% females); minimal hepatic congestion (0% males, 1.16% females); mild glycogen accumulation in the liver (0% males, 1.16% females); minimal focal biliary cyst in liver (0% males, 1.16% females); minimal focal hepatic fibrosis (0% males, 1.16% females); accessory spleen (0% males, 1.16% females); paraovarian cyst (oviduct) (1.16% females); severe diffuse germinal epithelium atrophy of the testis (1.19% males); minimal to mild, focal to multifocal infiltration of mononuclear inflammatory cells in the interstitial areas of the prostate gland (3.57% males); minimal aggregation of alveolar macrophages in the alveolar spaces (2.38% males, 0% females) (Figure 3C and 3D); minimal to mild, focal infiltration of inflammatory cells in the alveolar spaces (3.57% males, 3.49% females); minimal focal cystic degeneration of the adrenal cortex (0% males, 2.32% females); cyst at the pars distalis of the pituitary gland (1.19% males, 1.16% females); minimal infiltration of inflammatory cells in the cardiomyocardium (1.19% males, 0% females); minimal focal basal cell hyperplasia in the nonglandular stomach (1.19% males, 0% females). All the microscopic nonneoplastic background lesions were summarized in Table 3.

**Table 3.** Microscopic nonneoplastic background lesions in Wistar rats (Mlac:WR) from 90-day oral gavage studies (2023-2025; 84 males and 86 females).

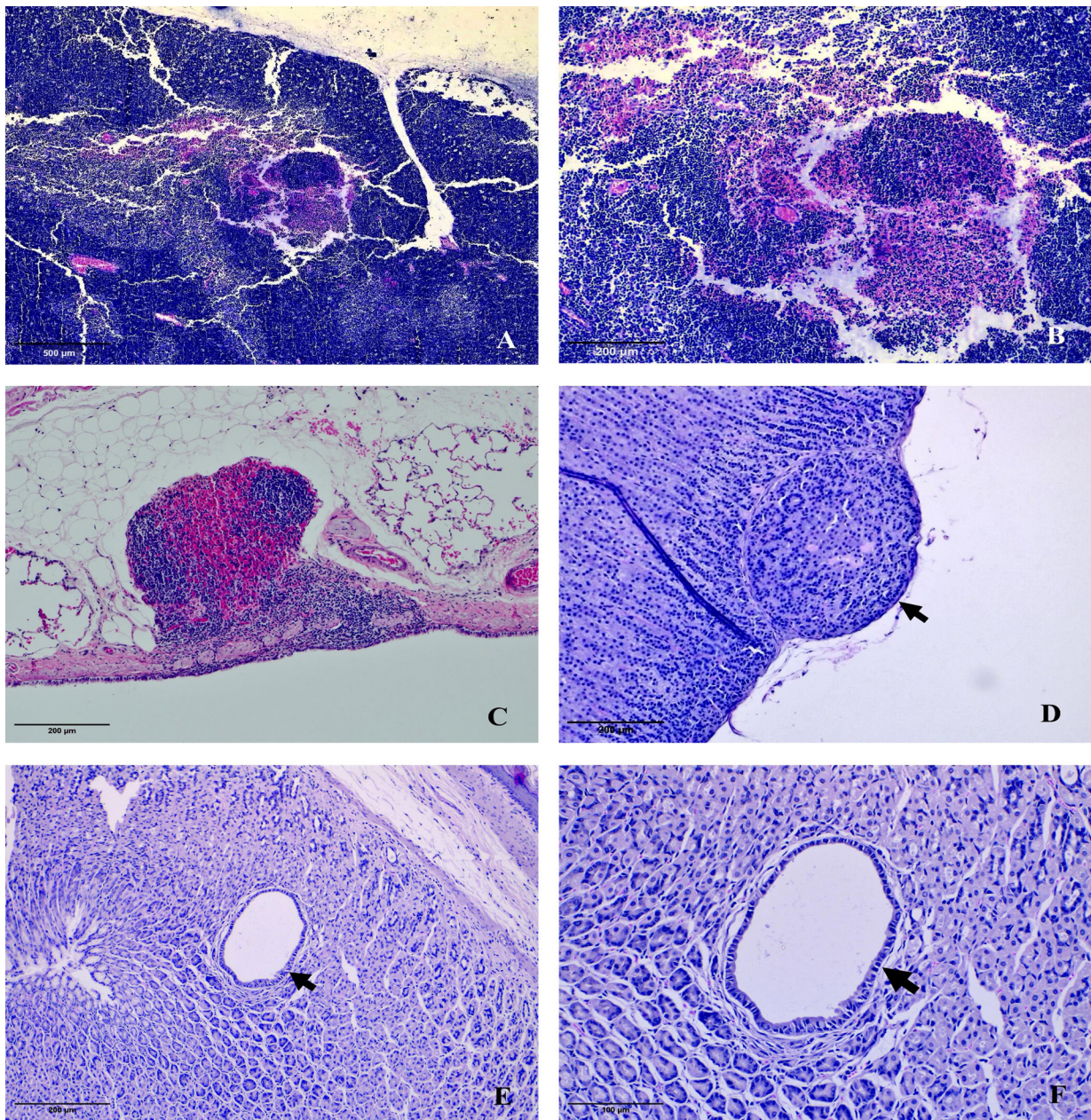
Microscopic findings	Males		Females	
	Occurrence/number of examined animals	Incidence (%)	Occurrence/number of examined animals	Incidence (%)
<b>Hematolymphoid System</b>				
• Hemorrhage, thymus, multifocal, minimal to moderate	27/84	32.14	19/86	22.09
• Accessory spleen	0/84	0	1/86	1.16
<b>Respiratory System (Lung)</b>				
• Hemorrhage, bronchus-associated lymphoid tissue (BALT), minimal to moderate	20/84	23.81	15/86	17.44
• Infiltrate, inflammatory cell, alveolar space, focal, minimal to mild	3/84	3.57	3/86	3.49
• Aggregation, alveolar macrophage, minimal	2/84	2.38	0/86	0
<b>Endocrine System</b>				
• Ectopic tissue, adrenocortical (adrenal gland)	18/84	21.43	17/86	19.77
• Degeneration, cystic, cortical, focal, minimal (adrenal gland)	0/84	0	2/86	2.32
• Ultimobranchial cyst (thyroid gland)	10/84	11.90	10/86	11.63
• Ectopic tissue, thymus (thyroid gland)*	8/84	9.52	0/86	0
• Cyst, pars distalis (pituitary gland)	1/84	1.19	1/86	1.16
<b>Digestive System</b>				
• Dilation, gastric gland, minimal to moderate (glandular stomach)	20/84	23.81	11/86	12.79
• Hyperplasia, basal cell, focal, minimal (nonglandular stomach)	1/84	1.19	0/86	0
<b>Urinary System (Kidney)</b>				
• Cast, hyaline, focal to multifocal, minimal to mild*	20/84	23.81	1/86	1.16

**Note:** A Fisher's exact test was performed on raw data to test the hypothesis: there is no difference of incidence between males and females. \**P*-value < 0.05, the hypothesis is rejected.

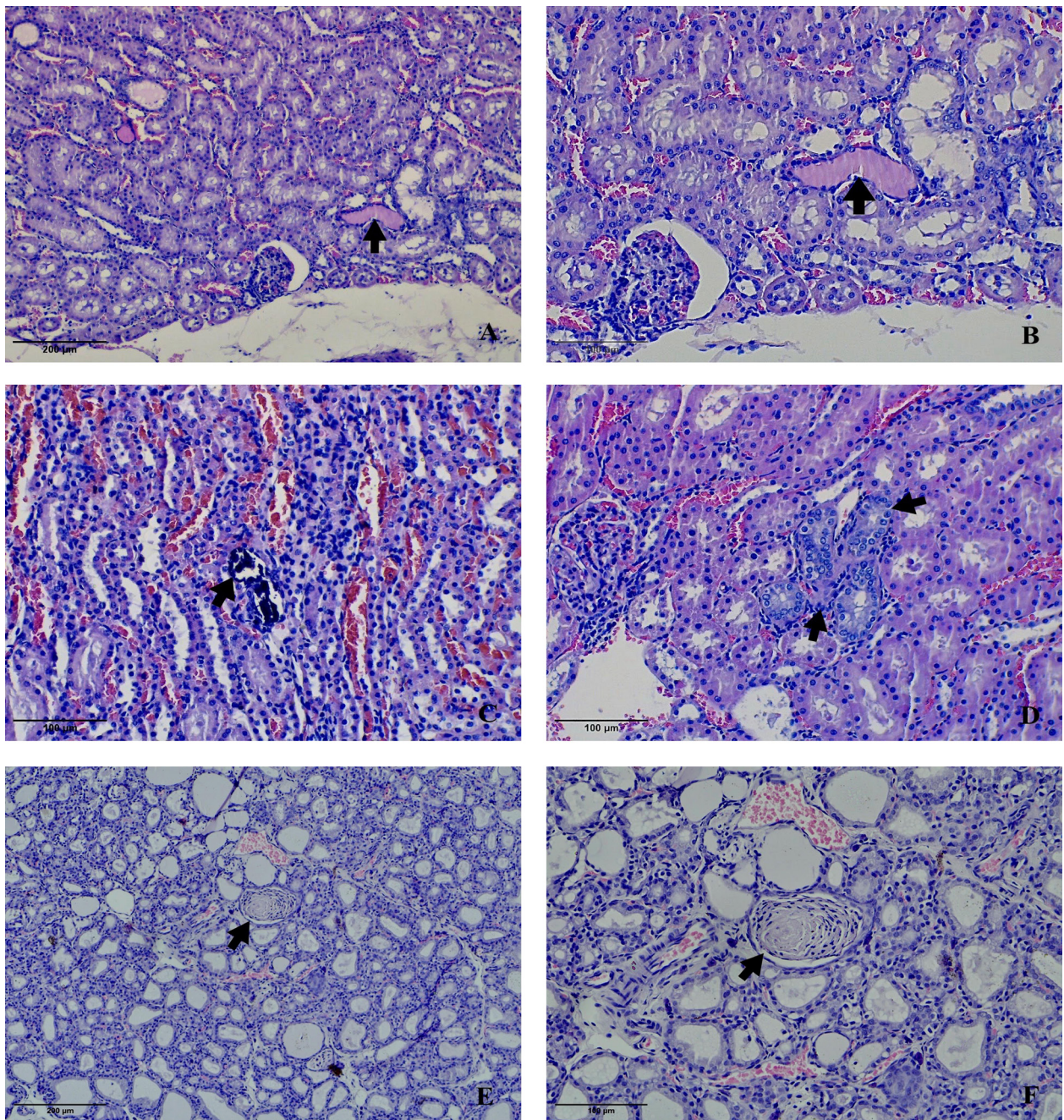
**Table 3.** Microscopic nonneoplastic background lesions in Wistar rats (Mlac:WR) from 90-day oral gavage studies (2023-2025; 84 males and 86 females) (Cont.).

Microscopic findings	Males		Females	
	Occurrence/number of examined animals	Incidence (%)	Occurrence/number of examined animals	Incidence (%)
<b>Urinary System (Kidney)</b>				
• Mineralization, intratubular, focal, minimal	5/84	5.95	10/86	11.63
• Basophilia, tubular, minimal*	8/84	9.52	1/86	1.16
<b>Hepatobiliary System</b>				
• Infiltration, inflammatory cell, minimal (liver)	2/84	2.38	3/86	3.49
• Hepatodiaphragmatic nodule	1/84	1.19	1/86	1.16
• Fatty change, macro-/microvesicular, minimal	1/84	1.19	1/86	1.16
• Congestion, minimal	0/84	0	1/86	1.16
• Glycogen accumulation, mild	0/84	0	1/86	1.16
• Cyst, biliary, focal, minimal	0/84	0	1/86	1.16
• Fibrosis, focal, minimal	0/84	0	1/86	1.16
<b>Cardiovascular System</b>				
• Infiltrate, inflammatory cell, myocardium, minimal	1/84	1.19	0/86	0
<b>Male reproductive System</b>				
• Atrophy, germinal epithelium, diffuse, severe	1/84	1.19	-	-
• Infiltrate, inflammatory cell, focal to multifocal, minimal to mild (prostate gland)	3/84	3.57	-	-
<b>Female reproductive System</b>				
• Cyst, paraovarian (oviduct)	-	-	1/86	1.16
• Proestrus	-	-	22/29 <sup>#</sup>	75.86
• Estrus	-	-	3/29 <sup>#</sup>	10.35
• Metestrus	-	-	0/29 <sup>#</sup>	0
• Diestrus	-	-	4/29 <sup>#</sup>	13.79

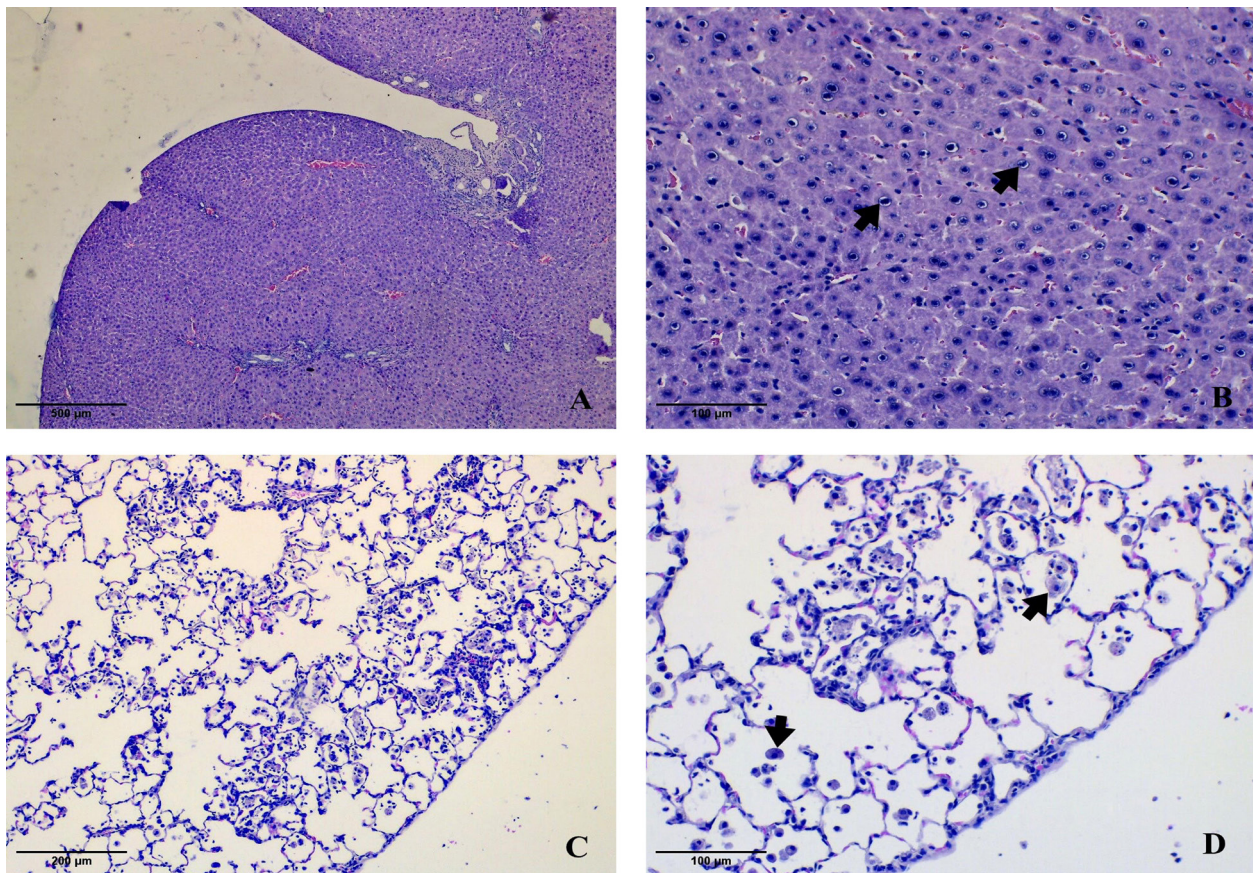
**Note:** A Fisher's exact test was performed on raw data to test the hypothesis: there is no difference of incidence between males and females. \**P*-value < 0.05, the hypothesis is rejected. <sup>#</sup>The number of female rats with clear fluid retention at gross necropsy.



**Figure 1.** (A) The photomicrograph of mild multifocal hemorrhage in thymus of a male rat (4X). (B) Higher magnification of Figure 1A (10X). (C) The photomicrograph of moderate hemorrhage in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) of a female rat (10X). (D) The photomicrograph of ectopic adrenocortical tissue (black arrow) in adrenal cortex of a female rat (10X). (E) The photomicrograph of mild dilation of gastric gland (black arrow) in glandular stomach of a male rat (10X). (F) Higher magnification of Figure 1E (20X); H&E staining.



**Figure 2.** (A) The photomicrograph of minimal focal hyaline cast (black arrow) in renal cortex of a male rat (10X). (B) Higher magnification of Figure 2A (20X). (C) The photomicrograph of minimal focal intratubular mineralization (black arrow) in renal medulla of a female rat (20X). (D) The photomicrograph of minimal focal tubular basophilia (black arrows) in renal cortex of a male rat (20X). (E) The photomicrograph of ultimobranchial cyst (black arrow) in thyroid gland of a female rat (10X). (F) Higher magnification of Figure 2E (20X); H&E staining.



**Figure 3.** (A) The photomicrograph of a hepatodiaphragmatic nodule in the liver of a male rat (4X). (B) Higher magnification of Figure 3A to indicate the linear arrangement of hepatocyte nuclei (black arrows) (20X). (C) The photomicrograph of minimal aggregation of alveolar macrophages in the alveolar spaces of a male rat (10X). (D) Higher magnification of Figure 3C to indicate alveolar macrophages (black arrows) (20X); H&E staining.

## Discussion

### Organ weight

Higher coefficients of variation (CVs) in relative organ weights may reflect inconsistencies in necropsy and/or organ weighing procedures, as this parameter can be affected by trimming technique, timing of weighing, and measurement sensitivity (Srimangkornkaew et al., 2020). Such variability is particularly evident in small organs, such as the ovary and thyroid with parathyroid gland; secretion-filled or friable structures, such as male accessory sex glands, testis, and thymus, which are highly prone to rupture or partially loss during organ trimming;

and organs with poorly defined anatomical boundaries, such as uterus with vagina and epididymis, in which differences in tissue separation may substantially influence the measured organ weight. The organ weight results in the present study showed a similar trend to the previously reported organ weight data for Sprague-Dawley (SD) rats (Piao et al., 2013), with slight differences in relative organ weights of the spleen, heart, liver, kidneys, adrenal glands, testes, and ovaries, which are attributable to variations in rat strain.

### **Microscopic finding**

The varying degrees of hemorrhage observed in lymphoid organs (thymus and BALT) involved a higher number of animals than reported in other studies (Bockenstedt et al., 2022). This finding may represent an agonal change in rats euthanized with CO<sub>2</sub> inhalation (Frith et al., 2000). In the absence of necrosis, vascular lesions, coagulation defect, and other lesions such as erythrophagocytosis or pigment-laden macrophages, necropsy technique-related factors (iatrogenic) or dissection-induced artifacts may account for this observation, and these hemorrhages are not considered the result of a vascular lesion (Rebelatto 2018). However, Vitamin K deficiency in rats may cause thymic hemorrhage, and therefore diet should be considered (Frith et al., 2000). This finding must be distinguished from congestion since congestion of capillaries or venules in the thymus is commonly seen in spontaneous deaths or moribund sacrificed animals (Rebelatto 2018). Moreover, postmortem congestion (Livor mortis) of the thymus without evidence of hemodynamic disturbance has been reported in Wistar rats (Boonmayaphan and Butrat 2022).

In sex-related lesions, hyaline casts and tubular basophilia in the renal cortex were found to be sex-related finding as their incidence in males is significantly higher than in females. Hyaline cast and tubular basophilia can be found as a common feature accompanying the early stage of chronic progressive nephropathy (CPN) (Frazier et al., 2012). Male gender is a primary risk factor for developing CPN linked to the presence of androgen rather than to an absence of estrogen (Khan et al., 2013). Intratubular mineralization in the renal medulla is more commonly seen as a spontaneous lesion along the corticomedullary junction with no clinical consequence, and female rats are more susceptible to dietary imbalance of calcium, phosphorus, chloride, magnesium, protein, and lipid than male rats (Seely et al., 2018). However, the statistically significant difference between the incidence of males and females cannot be

observed in the present study. The incidence of ectopic thymus tissue in the thyroid gland in males is significantly higher than in females; however, there has been no previous report of sex predisposition in rats. In human medicine, the epidemiological study revealed a higher prevalence of this lesion in male (2.79%) than female (0.80%) children (Iwaku et al., 2024). This finding is a congenital defect caused by incomplete separation of the thyroid and thymus during embryonal development (Brändli-Baiocco et al., 2018).

The various types of congenital or developmental anomalies were observed in Wistar rats (Mlac:WR) in the present study. An ectopic adrenocortical tissue in the adrenal cortex is a common finding in both male and female rats, and can be found anywhere in the abdominal cavity caused by completely or partially detached rests of the coelomic epithelial primordia (Suttie and Sutcliffe 2018). An ultimobranchial cyst in the thyroid gland derives from ultimobranchial bodies during embryonal development (Mense and Boorman 2018). In addition to the common congenital lesions, a hepatodiaphragmatic nodule in the liver, paraovarian cyst, cyst in the pars distalis of the pituitary gland, and accessory spleen are less finding in our study. A hepatodiaphragmatic nodule in the liver is caused by the pressing of median or lateral lobes of the liver against the imperforate opening of diaphragm (Bevin 2018) with reported incidence ranging from 1 to 11% in Fischer 344 rats (Thoolen et al., 2010). A paraovarian cyst is thought to arise from vestigial remnants of mesonephric or paramesonephric ducts (Dixon et al., 2014). This finding should be distinguished from cystic rete ovarii, which often lack smooth muscle in the wall, and typically present within or adjacent to the hilus of the ovary (Vidal and Dixon 2018). Cysts in the pars distalis of the pituitary gland are an infrequent incidental finding in rats. The structure, position, or contents cannot determine the origin of a cyst. Some cysts are derived from persistent remnants of the craniopharyngeal duct or Rathke's pouch (Brändli-Baiocco et al., 2018). Lastly, an

accessory spleen is a rare finding in rats. It may develop as a result of fusion failure of the splenic anlage during embryogenesis, and may be acquired following splenectomy or as a consequence of traumatic injury (Rebelatto 2018; Willard-Mack et al., 2019).

In the reproductive system, a markedly dilated and filled with clear fluid (clear fluid retention) is a characteristic feature of proestrus in female rats under the influence of estradiol (Dixon et al., 2014). Although most female rats (75.86%) with clear fluid retention in the uterus were histologically staged as proestrus, some animals at estrus (10.35%) or diestrus (13.79%) also exhibited this change at necropsy, as they might be in a transitional period to proestrus, such as early estrus or late diestrus (Westwood 2008; Ajayi and Akhigbe 2020). An atrophy of the germinal epithelium lining the seminiferous tubules in male rats is considered the consequence of prolonged or severe germ cell degeneration, which may be mediated through sertoli cell injury, primary cytotoxicity, hypoxia, inflammation, or other effects (Creasy et al., 2012).

In age-related lesions, a dilation of the gastric gland is a common observation in the glandular stomach and may be seen as an aging change in rats. This lesion is usually not reported unless it shows a treatment-related trend (Nolte et al., 2016). An aggregation of alveolar macrophages in alveolar spaces is frequently observed as a spontaneous and incidental finding in the subpleural areas or in the more peripheral regions of the lung of older rats (Renne et al., 2016; Herbert et al., 2018). A cystic degeneration of the adrenal gland is a spontaneous condition. It occurs predominantly in aging female rats and is considered to be a consequence of severe focal cortical vacuolation (Brändli-Baiocco et al., 2018). A biliary cyst in hepatic parenchyma is commonly seen in older rats. A single cyst is often caused by cystic dilation of the intrahepatic bile duct (Thoolen et al., 2010).

In other, less common spontaneous lesions, cytoplasmic vacuolations of hepatocytes are mainly composed of macrovesicular and microvesicular fatty changes, and

glycogen accumulation. A macrovesicular fatty change is a reaction to a wide variety of injuries, and can also be regarded as a physiological adaptation demonstrated as an imbalance between uptake and secretion of lipoprotein by the hepatocytes. On the other hand, a microvesicular fatty change is usually indicative of more serious hepatic dysfunction, but can also result from nutritional disturbances; however, focal fatty change can sometimes be seen spontaneously (Foster 2018). An intracellular accumulation of glycogen is a normal physiological response following food ingestion (Thoolen et al., 2010). A hepatic congestion, without the evidence of right-sided heart failure, can be seen in an animal that dies (post-mortem change) or in a situation where there is incomplete exsanguination (Thoolen et al., 2010). Hepatic fibrosis represents a reaction to acute or prolonged hepatic injury (Thoolen et al., 2010). A basal cell hyperplasia of the nonglandular stomach is more commonly seen following administration of a chemical by the gavage route but may occur by dosed-feed or water routes as well (Uehara et al., 2018). An infiltration of inflammatory cells in the alveolar spaces, hepatic parenchyma, cardiomyocardium, and prostate gland without the evidence of inflammation, e.g., edema, hemorrhage, cell swelling, vascular injury, degeneration, or necrosis, is considered to be an incidental finding (Thoolen et al., 2010; Creasy et al., 2012; Berridge et al., 2016; Renne et al., 2016).

One significant limitation of HCD for background lesions is its study-specific nature. Numerous sources of variability, including vehicle type, study duration, route of administration, gross necropsy techniques, histological slide preparation, and standardized histopathological criteria/terms (McInnes and Scudamore 2014), limit the application of HCD to studies with the same design. Consequently, the establishment of study-relevant HCD is essential for the accurate interpretation of future toxicological studies.

## Conclusions

Overall, this is the most recent report of the historical background of nonneoplastic lesions in Wistar rats (Mlac:WR). The present information provides a reference for the background lesions that occur in Wistar rats in 90-day toxicity studies, which may be highly beneficial for the study pathologist to differentiate between spontaneous lesions and test item/article-related changes.

## Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Acknowledgements

We would like to thank Dr. Boo-Hyon Kang (HD Bio) and Mr. Aekkarin Klinkhamhom (NLAC-MU) for their dedication to teaching us toxicologic pathology and for sharing a good example of contemporaneous control data on background lesions. We would like to thank Dr. Passaraporn Srimangkornkaew (NLAC-MU) for providing information on laboratory animals.

## References

- Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract.* 2020;6:5.
- Berridge BR, Mowat V, Nagai H, Nyska A, Okazaki Y, Clements PJ, et al. Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol.* 2016;29(3 Suppl):1S-47S.
- Bevin Z. Peritoneum, retroperitoneum, mesentery, and abdominal cavity. In: Suttie AW, editor. *Boorman's Pathology of the Rat.* 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 71-7.
- Black HE, Moch RW, Frantz JD. Preparation of the pathology report for a toxicity study. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology.* 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic Press; 2013. p. 843-51.
- Bockenstedt M, Kumar A, Laast V, Sharma A. Historical control background incidence of spontaneous nonneoplastic lesions of Sprague Dawley rats used in 104-week toxicity studies. Poster session presented at: Toxicologic pathology of the hematopoietic system. STP 41<sup>st</sup> annual symposium. Austin, TX; 2022.
- Bockenstedt M, Kumar A, Laast V, Sharma A. Historical control background incidence of spontaneous nonneoplastic lesions of Sprague Dawley rats in 104-week carcinogenicity studies. *Toxicol Pathol.* 2025;53(2):173-86.
- Boonmayaphan M, Butrat P. Postmortem macroscopic changes in rats under rat house conditions. *J Appl Anim Sci.* 2022;15(1):9-22.
- Brändli-Baiocco A, Balme E, Bruder M, Chandra S, Hellmann J, Hoenerhoff MJ, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse endocrine system. *J Toxicol Pathol.* 2018;31(3 Suppl):1S-95S.
- Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol.* 2012;40(6 Suppl):40S-121S.
- Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol.* 2014;27(3-4 Suppl):1S-107S.
- Foster JR. Liver. In: Suttie AW, editor. *Boorman's Pathology of the Rat.* 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 81-105.

- Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. *Toxicol Pathol.* 2012;40(4 Suppl):14S-86S.
- Frith CH, Ward JM, Chandra M, Losco PE. Non-proliferative lesions of the hematopoietic system in rats. In: *Guides for Toxicologic Pathology*. Washington DC: STP/ARP/AFIP; 2000. p. 1-21.
- Herbert RA, Janardhan KS, Pandiri AR, Cesta MF, Chen V, Miller RA. Lung, pleura, mediastinum. In: Suttie AW, editor. *Boorman's Pathology of the Rat*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 437-66.
- Ibrahim R, Nyska A, Elmore SA, Boyle M, Ramot Y. Interpretative challenges in animal studies: review of case studies and implications for toxicologic pathology. *Toxicol Pathol.* 2025;53(5):440-55.
- Iwaku K, Noh JY, Watanabe N, Sugino K, Ito K. Age-related reduction of the prevalence of ectopic intrathyroidal thymus in children and its size reduction with age. *Thyroid Sci.* 2024;1(1):2590-3000.
- Keenan C, Elmore S, Francke-Carroll S, Kemp R, Kerlin R, Peddada S, et al. Best practices for use of historical control data of proliferative rodent lesions. *Toxicol Pathol.* 2009;37(5):679-93.
- Khan KM, Hard GC, Alden CL. Kidney. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic Press; 2013. p. 1667-773.
- Long GG, Hardisty JF. Regulatory forum opinion piece: thresholds in toxicologic pathology. *Toxicol Pathol.* 2012;40(7):1079-81.
- McInnes EF, Scudamore CL. Review of approaches to the recording of background lesions in toxicologic pathology studies in rats. *Toxicol Lett.* 2014;229(1):134-43.
- Mense MG, Boorman GA. Thyroid gland. In: Suttie AW, editor. *Boorman's Pathology of the Rat*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 669-86.
- Nakazawa M, Tawaratani T, Uchimoto H, Kawaminami A, Ueda M, Shinoda Y, et al. Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. *Exp Anim.* 2001;50(2):99-103.
- Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol.* 2016;29(1 Suppl):1S-125S.
- Piao Y, Liu Y, Xie X. Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages. *J Toxicol Pathol.* 2013;26(1):29-34.
- Rebelatto MC. Spleen, lymph nodes, and thymus. In: Suttie AW, editor. *Boorman's Pathology of the Rat*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 469-91.
- Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicol Pathol.* 2016;37(7 Suppl):5S-73S.
- Schafer KA, Eighmy J, Fikes JD, Halpern WG, Hukkanen RR, Long GG, et al. Use of severity grades to characterize histopathologic changes. *Toxicol Pathol.* 2018;46(3):256-65.
- Seely JC, Hard GC, Blankenship B. Kidney. In: Suttie AW, editor. *Boorman's Pathology of the Rat*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 125-66.
- Singh S, Dwivedi R, Chaturvedi V. Influence of vehicles used for oral dosing of test molecules on the progression of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):6026-8.
- Srimangkornkaew P, Suwannasaroj K, Yottharat P, Sirimontaporn A. Historical control data from repeated dose 90-days oral toxicity studies of Wistar rats (Mlac:WR). *Bull Dept Med Sci.* 2020;63(3):595-606.

- Suttie AW, Sutcliffe C. Adrenal gland. In: Suttie AW, editor. Boorman's Pathology of the Rat. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 649-67.
- Taylor I, Mowat V. Comparison of longevity and common tumor profiles between Sprague-Dawley and Han Wistar rats. *J Toxicol Pathol.* 2020;33(3):189-96.
- Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010;38(7 Suppl):5S-81S.
- Uehara T, Elmore SA, Szabo KA. Esophagus and stomach. In: Suttie AW, editor. Boorman's Pathology of the Rat. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 35-50.
- Vidal JD, Dixon D. Ovary. In: Suttie AW, editor. Boorman's Pathology of the Rat. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 2018. p. 523-36.
- Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol.* 2008;36(3):375-84.
- Willard-Mack CL, Elmore SA, Hall WC, Harleman J, Kuper CF, Losco P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse hematolymphoid system. *Toxicol Pathol.* 2019;47(6):665-783.
- Wolf DC, Mann PC. Confounders in interpreting pathology for safety and risk assessment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;202(3):302-8.

## **Erratum to Quality Evaluation of Chicken Powder from Broiler Chicken Fed Abattoir Wastes in Their Diet**

**Oluwaseyi Phebian Aluko\*, Patience Olusola Fakolade, Ayodeji Oluwatosin Adedire, Afeez Adeleke Adegoke**

Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Production and Management, Osun State University, Nigeria

\*Corresponding author, E-mail address: [oluwaseyi.aluko@uniosun.edu.ng](mailto:oluwaseyi.aluko@uniosun.edu.ng)

**This erratum relates to the following article:**

Phebian AO, Olusola FP, Oluwatosin AA, Adeleke AA. Quality Evaluation of Chicken Powder from Broiler Chicken Fed Abattoir Wastes in Their Diet. *J Appl Anim Sci.* 2025;18(2):49-60.

**URL:** [https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas\\_muvs/article/view/276689](https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jaas_muvs/article/view/276689)

**Content of correction:**

The authors' names were incorrectly presented in the originally published article. The Editorial Office of the Journal of Applied Animal Science would like to correct the authors' names. The Editorial Office apologizes for any inconvenience this may have caused.

The authors were originally listed as:

Aluko Oluwaseyi Phebian, Fakolade Patience Olusola, Adedire Ayodeji Oluwatosin, Adegoke Afeez Adeleke

The correct authors list is:

Oluwaseyi Phebian Aluko, Patience Olusola Fakolade, Ayodeji Oluwatosin Adedire, Afeez Adeleke Adegoke

The article should be cited as:

Aluko OP, Fakolade PO, Adedire AO, Adegoke AA. Quality Evaluation of Chicken Powder from Broiler Chicken Fed Abattoir Wastes in Their Diet. *J Appl Anim Sci.* 2025;18(2):49-60.



