

## RESEARCH ARTICLE

# Effects of Melamine on Growth and Health Status, and Lethal Dose 50 in Tilapia Fish

Surapong Yowarach<sup>1</sup>, Bundit Tengjaroenkul<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Objective** — To investigate the effects of melamine on growth and health status, and lethal dose 50 in the Nile tilapia fish, *Oreochromis niloticus*.

**Materials and Methods** — Juvenile tilapia weighed about 25 g were fed with diets containing melamine at 0, 1, 2, 4, 8 and 16 g% (w/w) for 8 weeks. At the end of experiment, body weight, antibody titer, blood indices, pathological lesions and lethal dose 50 of the fish were collected and analyzed.

**Results** — Melamine was able to decrease growth performance, % hematocrit, antibody titer against *Streptococcus agalactiae* and blood sugar level, particularly in fish group fed with 8 % and 16 % melamine. Histologically, cellular lesions were found in liver, kidney, gill and spleen of melamine-fed fish. Moreover, lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) of melamine at day 60 of the experiment was 271 g/kg feed.

**Conclusion** — Melamine likely demonstrates low toxicity effects to the Nile tilapia according to the growth performance, blood indices, antibody titer, histopathological lesions and LD<sub>50</sub>.

KKU Vet J. 2010; 20(1):34-44

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**Keywords** : Tilapia; Melamine; Hematology; Immunity; Pathology; Lethal dose<sub>50</sub>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Khan 40002, Thailand

<sup>2</sup>Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Khan 40002, Thailand

\*Corresponding author E-mail: btengjar@kku.ac.th

# ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพ และขนาดของเมลามีนที่ทำให้ปลาตายครั้งหนึ่ง

สุรพงษ์ โยวะราช<sup>1</sup>, บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล<sup>2\*</sup>

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเมลามีนต่อสมรรถนะการผลิต ภูมิคุ้มกัน ค่าทางโลหิตวิทยา พยาธิสภาพ และความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายครั้งหนึ่ง

**วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ** ให้อาหารผสมสารเมลามีน 6 ความเข้มข้นคือ ร้อยละ 0, 1, 2, 4, 8 และ 16 ของน้ำหนักอาหารแก่ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ซึ่งน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 25 กรัมเป็นเวลา 8 สัปดาห์เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล ด้านอัตราการเจริญเติบโต ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ค่าทางโลหิตวิทยา พยาธิสภาพเนื้อเยื่อไต ตับ ม้าม และเหงือกของปลา และศึกษาความเข้มข้นของเมลามีนที่ทำให้ปลาตายครั้งหนึ่ง

**ผลการศึกษา** เมลามีนมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย ซีมาโตคริต แอนติบอดีไตเตอร์และค่าน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลง โดยเฉพาะปลากลุ่มที่ได้รับเมลามีนในอาหารที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 8 และ 16 ส่วนผลต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อพบว่า เมลามีนทำให้ตับ ไต เหงือก และม้ามเกิดความเสียหาย สำหรับความเข้มข้นของเมลามีนที่ทำให้ปลาตายครั้งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 271 กรัม/กิโลกรัมอาหาร

**ข้อสรุป** สารเมลามีนโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นสูงตั้งแต่ ร้อยละ 8 มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการตาย ภูมิคุ้มกัน ค่าทางโลหิตวิทยา รวมทั้งพยาธิสภาพตับ ไต เหงือก และม้าม ส่วนความเข้มข้นของเมลามีนที่ทำให้ปลาตายครั้งหนึ่งมีค่าค่อนข้างสูง แสดงว่าเมลามีนเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อปลานิล

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553; 20(1):34-44

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**คำสำคัญ** : ปลานิล เมลามีน โลหิตวิทยา ภูมิคุ้มกัน พยาธิสภาพ ความเข้มข้นที่ทำให้ตายครั้งหนึ่ง

<sup>1</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

<sup>2</sup>ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

\*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: btengjar@kku.ac.th

## บทนำ

ปลานิลมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn.) ชื่อสามัญคือ Nile tilapia อยู่ในน้ำจืด และน้ำกร่อย มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา ในประเทศไทยได้รับการพัฒนาสายพันธุ์จากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง และหน่วยงานเอกชน ทำให้เกิดปลานิลสายพันธุ์ใหม่ขึ้น เช่น สายพันธุ์จิตรลดา และสายพันธุ์ปลาทับทิม [1] ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวเพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองการบริโภคภายในประเทศและการส่งออกเนื่องจากปลานิลเลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นแหล่งโปรตีนราคาถูก เป็นอาหารโปรตีนที่ผู้บริโภคนิยม โดยในปี พ.ศ. 2550 ปลานิลที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีปริมาณ 237,500 ตัน คิดเป็นมูลค่า 7,779.9 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วน 30.6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณผลผลิตรวมของปลาน้ำจืดของไทย และยังมีการคาดการณ์ถึงการเพิ่มปริมาณและมูลค่าการผลิตปลานิลอย่างต่อเนื่องในอนาคต [2]

ปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในอาหารสัตว์เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตเสื่อมคุณภาพ และอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค สารเมลามีนก็เป็นอีกชนิดหนึ่งที่มีการตรวจพบว่ามีสารปนเปื้อนมาที่วัตถุดิบอาหาร แล้วเป็นอันตรายต่อสัตว์และผู้บริโภค รวมถึงมีรายงานเกี่ยวกับความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาลเมื่อกลางปี พ.ศ. 2550 ที่ผ่านมาเกี่ยวกับการเรียกคืนสินค้าวัตถุดิบอาหารสัตว์ครอบคลุมสินค้า 100 รายการจากประเทศจีนโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา หลังจากที่มีการตรวจพบว่ามีสัตว์ป่วยและตายจำนวนมากเนื่องจากสัตว์ได้รับอาหารปนเปื้อนด้วยสารเมลามีนดังกล่าว [3] เมลามีนเป็นผงสีขาว มีสูตรโครงสร้างทางเคมี  $C_3H_6N_6$  ละลายน้ำได้เล็กน้อย [4] เป็นสารตัวกลางในการผลิตพลาสติก ปู๊ยม โฟม สีย้อม ยา สารทนไฟ ผ้าทอ และกาวยปัจจุบันมีการรายงานถึงความเสียหายจากพิษของเมลามีนต่อผู้บริโภคและอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ [3-6] ความเป็นพิษในสัตว์แตกต่างกันขึ้นกับชนิด พันธุ์ ความทนต่อพิษ และความสามารถในการขจัดพิษ [3-7] ความเป็นพิษเฉียบพลันพบว่าทำให้หนูขาวและกระต่ายตาย ในมนุษย์และหนูตะเภาพบว่าทำให้ระบบหายใจเกิดระคายเคือง สำหรับความเป็นพิษเรื้อรังพบในสุกร ไก่และสุนัข สัตว์จะมีอาการซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อ่อนแอ ท้องเสีย ต่อม่าน้ำเหลืองโต นิ้วที่ท้อปัสสาวะและไต และไตวาย [3, 4, 6, 8] ยาวมาลย์ [4] รายงานว่าปลาตุ๊กที่ได้รับสารเมลามีนจะมีสีตัวคล้ำ ดับและไตบวม ในปลานิลพบเกล็ดหลุดและสีตัวคล้ำ

อย่างไรก็ตาม รายงานการเกิดพิษในปลานิลยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเมลามีนต่อสมรรถนะการผลิต ภูมิคุ้มกัน ค่าทางโลหิตวิทยา พยาธิสภาพ และความเข้มข้นที่ทำให้ปลานิลตายครั้งหนึ่ง

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### การออกแบบการทดลอง และสัตว์ทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ใช้ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักประมาณ 25 กรัม ทดลองเลี้ยงในสภาพเลี้ยงจริงในกระชังขนาด 1x1 เมตร ในบ่อดินที่ความหนาแน่น 15 ตัวต่อกระชัง ทำการเลี้ยงปรับสภาพปลาก่อนทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ปลาทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่ม 1 กลุ่มต่อ 1 กระชัง โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไม่ผสมเมลามีน กลุ่มที่ 2-6 ได้รับอาหารผสมเมลามีนที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16% ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้อาหาร 2 เวลา คือ 09.00 น. และ 15.00 น. ให้อาหารปลา กินจนอิ่ม (ad libitum) ทำการทดลอง 3 ชั่วโมง โดยในการทดลองได้ปฏิบัติตามแนวทางการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

### การวัดการเจริญเติบโตและอัตราการตาย

วัดการเจริญเติบโตของปลา โดยการชั่งน้ำหนักปลาก่อนการทดลอง และหลังจากการทดลองได้ 8 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักปลาทุกตัวด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหารปลาในวันที่ชั่ง) ส่วนการวัดอัตราการตายทำการบันทึกจำนวนปลาที่ตายในแต่ละวันเพื่อใช้คำนวณหาอัตราการตาย

### การเตรียมวัคซีนและการตรวจแอนติบอดีไตเตอร์

แยกเชื้อ *Streptococcus agalactiae* จากปลานิลป่วยและเพิ่มจำนวนเชื้อใน Brain Heart Infusion Agar ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่า  $1 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 2.5% และล้างเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เพื่อฉีดเข้าทางช่องท้องปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม 2 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยในการศึกษานี้ทดลองให้วัคซีนแก่ปลานิลทุกกลุ่มทดลอง ให้วัคซีนในวันที่ 28 และ 42 นับจากวันแรกของการทดลอง สำหรับการเตรียมแอนติเจนใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีน แต่ใช้ความเข้มข้นแบคทีเรียที่  $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำซีรัมไปตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธีการเกาะกลุ่ม (direct agglutination) [9]

### การศึกษาพยาธิสภาพ

สุ่มปลานิล 3 ตัว จากแต่ละกลุ่มทำให้สลบด้วย phenoxy-ethanol (Fluka, Germany) ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ตรวจดูการภายนอก แล้วผ่าเปิดช่องท้องปลาเพื่อดูรอยโรค เก็บตัวอย่างไต ตับ เหงือก และม้าม แช่ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมและตัดเนื้อเยื่อแล้วย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน [10] และส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

### การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา

ศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา เพื่อใช้วินิจฉัยภาวะผิดปกติของร่างกาย โดยสุ่มปลานิล 9 ตัว จากแต่ละกลุ่ม เจาะเก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากหลอดเลือดหาง (caudal vessel) นำมาประเมินค่าฮีมา

โตคริต และดัชนีอื่นๆ ในซีรัม ได้แก่ น้ำตาล โปรตีน ไตรกลีเซอไรด์ โคอเลสเตอรอล โพแทสเซียม ยูเรีย ในโตรเจน อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส อาลาไมนอะมิโนทรานสเฟอเรส และแอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรส

### การประเมินค่าเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการตายครั้งหนึ่ง

บันทึกจำนวนของปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มทดลองทุกวันจนสิ้นสุดการทดลอง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาประเมินค่า LD<sub>50</sub> โดยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) ตามวิธีของ Finney [11]

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการตายวิเคราะห์โดยใช้ Kruskal-wallis test ข้อมูลน้ำหนักตัว ค่าฮีมาโตคริต ค่อแอนติบอดีไตเตอร์ และดัชนีอื่นๆ ในซีรัมใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version. 11.5

## ผลการศึกษา

### ผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการตาย

อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันโดยพบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด กลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนที่ 16% มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด และน้ำหนักเฉลี่ยของปลาจะลดลงเมื่อได้รับเมลามีนที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ปลานิลที่ได้รับสารเมลามีนที่ 8 และ 16% มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่ำที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 1) อัตราตายเฉลี่ยสะสมของปลานิลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ซึ่งพบอัตราการตายสูงที่สุดในกลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนความเข้มข้น 8 และ 16% ซึ่งแตกต่างจากปลากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**Table 1.** Mean Final Weight, Mortality and Antibody Titer in Experimental Fish

Melamine (%)	Mean Final Weight (g)	Mortality (Mean rank)	Antibody Titer
0 (control)	70.00±9.69 <sup>a</sup>	3.00	38.40±14.311 <sup>a</sup>
1	64.44±5.59 <sup>ab</sup>	5.50	26.67±9.24 <sup>ab</sup>
2	54.28±6.87 <sup>c</sup>	8.00	24.00±13.86 <sup>ab</sup>
4	56.00±10.19 <sup>bc</sup>	9.50	21.33±9.24 <sup>ab</sup>
8	48.50±8.06 <sup>c</sup>	14.67	20.00±8.00 <sup>ab</sup>
16	46.75±3.86 <sup>c</sup>	16.33	13.33±4.62 <sup>c</sup>

Fish are categorized into group according to concentration levels of melamine (%) in feed.

<sup>a,b,c</sup>Different superscripts within each column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

**ผลต่อการสร้างแอนติบอดี**

ปลาที่ได้รับสารเมลามีนจากการผสมในอาหารที่ระดับแตกต่างกัน มีค่าแอนติบอดีไทเดเตอร์เฉลี่ยหลังการได้รับวัคซีนครั้งที่สองต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มลดลง เมื่อปลาได้รับเมลามีนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยปลากลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 16% มีระดับของแอนติบอดีต่ำที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) (Table 1)

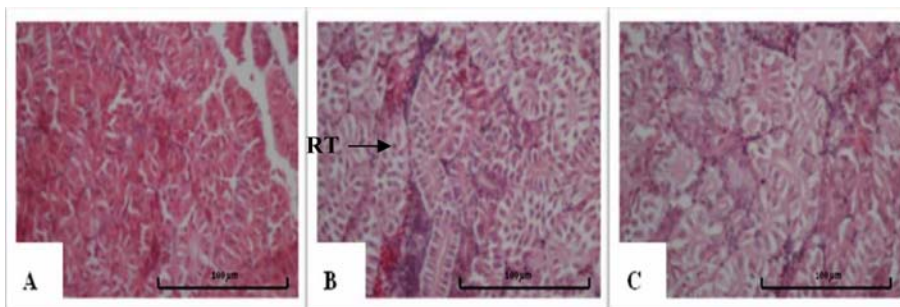
**Table 2.** Hematocrit, Blood Sugar Level and Sodium Potassium Ratio in Fish Blood

Melamine (%)	Hematocrit (%)	Blood Sugar Level	Na+/K+ ratio
control	35.17 ± 1.94 <sup>a</sup>	107.50 ± 0.71 <sup>a</sup>	53.74 ± 6.24 <sup>a</sup>
1	33.50 ± 2.66 <sup>ab</sup>	99.50 ± 2.12 <sup>ab</sup>	41.83 ± 0.24 <sup>b</sup>
2	30.33 ± 3.82 <sup>b</sup>	90.50 ± 6.36 <sup>b</sup>	33.59 ± 4.22 <sup>b</sup>
4	34.17 ± 1.94 <sup>ab</sup>	73.50 ± 7.78 <sup>c</sup>	36.90 ± 0.10 <sup>b</sup>
8	27.26 ± 2.00 <sup>b</sup>	76.00 ± 5.66 <sup>c</sup>	39.71 ± 5.66 <sup>b</sup>
16	23.40 ± 0.85 <sup>c</sup>	58.00 ± 5.66 <sup>d</sup>	36.23 ± 3.154 <sup>b</sup>

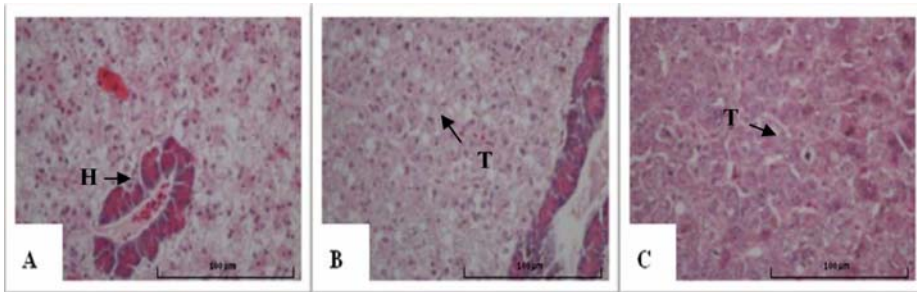
Fish are categorized into group according to concentration levels of melamine (%) in feed.

<sup>a,b,c</sup>Different superscripts within each column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

**Figure 1.** Histopathological Findings in Fish Kidney



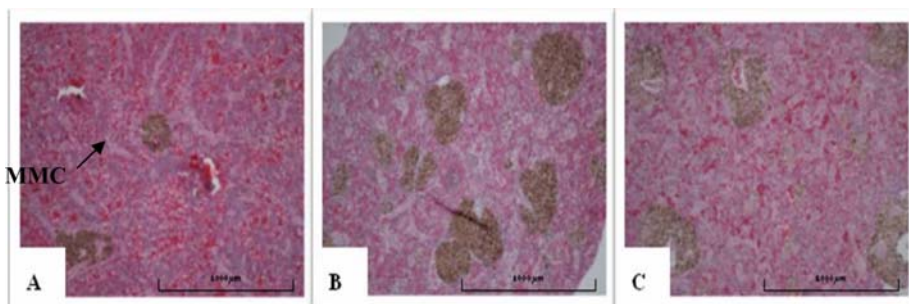
A: the control fish, B: the fish fed melamine at 8 % (w/w), C: the fish fed melamine at 16 % (w/w) Showing abnormality in tissue of kidney; RT= Renal tubule (H&E, Scale bar=100 micrometers)

**Figure 2.** Histopathological Findings in Fish Liver

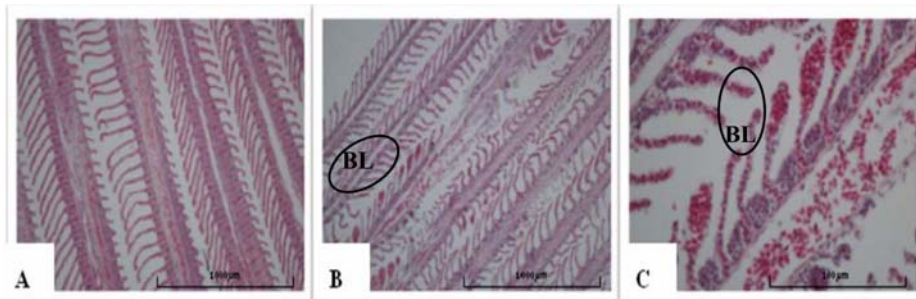
A: the control fish, B: the fish fed melamine at 8 % (w/w), C: the fish fed melamine at 16 % (w/w)  
Lower number of red blood cells and tissue damages (T) are observed in the liver of tilapia treated with high concentration of melamine. H=Hepatocyte (H&E, Scale bar=100 micrometers)

### ผลของเมลามีนต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของปลาไนล์

ตรวจพบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อไต ตับ เหงือก และม้ามในปลาไนล์กลุ่มที่ได้รับเมลามีนเมื่อสังเกตเนื้อเยื่อตับและไตจากภายนอกและไตกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีสีซีดจาง มีจำนวนเม็ดเลือดแดงภายในเนื้อเยื่อลดลง บางเซลล์พบการขยายขนาดของนิวเคลียสและเกิดช่องว่างภายในเซลล์ แต่ไม่พบผลึกคริสตัลของเมลามีน (**Figure 1-2**) นอกจากนี้ที่เมลามีนความเข้มข้น 16% พบการเสียหายของตับมากที่สุด โดยเซลล์ตับมีรูปร่างผิดปกติ นิวเคลียสหดตัว การเกิดช่องว่างในไซโตพลาสซึม ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีน้อยลง และไซโทซอลขยายมากขึ้น สำหรับม้ามพบว่ามีจำนวนกระดูกเม็ดเลือดขาวกระจายตัวในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น (**Figure 3**) ส่วนปลายซีเหงือกของปลาไนล์จะเกิดลักษณะการโป่งพอง (**Figure 4**)

**Figure 3.** Histopathological Findings in Spleen of Tilapia

A: the control fish, B: the fish fed melamine at 8 % (w/w), C: the fish fed melamine at 16 % (w/w)  
Melano-macrophages are abundant in the spleen of tilapia treated with high concentration of melamine.  
MMC= Melano-macrophage center (H&E, Scale bar=1000 micrometers)

**Figure 4.** Histopathological Findings in Gill Filament of Tilapia.

A: the control fish, B: the fish fed melamine at 8 % (w/w), C: the fish fed melamine at 16 % (w/w)

Ballooning lesions (BL) are found at the tip of gill lamella in melamine fed fish. (H&E, Scale bar= 1000 micrometers)

## ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

### ผลต่อค่าฮีมาโตคริต

จากการทดลองพบว่าปลาในทุกลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนผสมในอาหารมีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 16% มีค่าฮีมาโตคริตเฉลี่ยต่ำที่สุด เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปลาในกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 4, 8 และ 16% มีค่าฮีมาโตคริตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) (Table 2)

### ผลต่อค่าอื่น ๆ ทางโลหิตวิทยา

จากการทดลองพบว่า ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของปลาในทุกลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยระดับน้ำตาลในเลือดมีแนวโน้มลดต่ำลง เมื่อปลาได้รับเมลามีนความเข้มข้นสูงขึ้น และพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนที่ระดับ 16% มีระดับน้ำตาลต่ำที่สุด ระดับน้ำตาลเฉลี่ยของปลาในกลุ่มที่ได้รับเมลามีนตั้งแต่ 2% ในอาหาร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) (Table 2) ระดับโปรตีนในเลือดทั้งค่าอัลบูมิน โกลบูลิน และโปรตีนรวม พบว่าไม่แตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม สำหรับค่าไตรกลีเซอไรด์ ยูเรีย ไนโตรเจน อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส อลาไนน์อะมิโนทรานสเฟอเรส แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรส โซเดียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และคลอไรด์ ของทุกลุ่มทดลองรวมทั้งกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) อย่างไรก็ตามค่ายูเรียไนโตรเจนในเลือด และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส แม้จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าทั้งสองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อปลาได้รับเมลามีนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากนี้พบว่าสัดส่วนของโซเดียมต่อโพแทสเซียมของปลาในกลุ่มที่ได้รับเมลามีนมีค่าต่ำกว่าปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 2) โดยสัดส่วนของโซเดียมต่อโพแทสเซียมในเลือดมีแนวโน้มลดต่ำลงเมื่อปลาได้รับเมลามีนความเข้มข้นสูงขึ้น



### ขนาดของสารเมลามีนที่ทำให้ปลาตายครั้งหนึ่ง

จากผลการทดลองพบว่า ค่าโปรบิทคาดคะเนเมื่อนำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอยได้เป็น  $y = 3.1932 + 0.7427x$  ( $x$  คือ ค่า  $\log$  ของระดับความเข้มข้นของสารเมลามีน และ  $y$  คือ เอ็มไพริกัลของโปรบิทได้จากการเปลี่ยนค่าเปอร์เซ็นต์การตายโดยใช้ตารางโปรบิท) ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารเมลามีนที่ทำให้เกิดการตายครั้งหนึ่ง สำหรับปลานิลขนาด 25 กรัม คือที่ความเข้มข้น 271 กรัม/ กิโลกรัมอาหาร

## วิจารณ์

การศึกษานี้แสดงผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพปลานิล น้ำหนักตัวเฉลี่ยของปลาจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น โดยเริ่มพบที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8% ผลกระทบของเมลามีนที่ทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตลดลงนี้สอดคล้องกับรายงานของเยาวมาลย์ [4] ที่รายงานอาการของสัตว์ที่ได้รับสารเมลามีนว่าจะมีอาการผอมซูบ ไม่กินอาหารและการเจริญเติบโตลดลง ภาณุวัฒน์ [8] รายงานว่าลูกสุกรอนุบาลเมื่อได้รับอาหารปนเปื้อนสารเมลามีนประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะผอม น้ำหนักลดลง มีอาการป่วยและตายในที่สุด ในสัตว์จำพวกหนู Reimschuessel และคณะ [12] รายงานว่าในหนูที่ได้รับเมลามีนตั้งแต่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารขึ้นไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สัตว์จะมีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับผลของเมลามีนต่อภูมิคุ้มกันของปลานิลจากการศึกษานี้พบว่า ค่าแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยของปลา มีแนวโน้มลดลงเมื่อปลาได้รับสารเมลามีนในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องการศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต และม้าม โดยเฉพาะอย่างยิ่งไตของปลานิลซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งความเสียหายของเซลล์จะพบมากขึ้นเมื่อปลาได้รับเมลามีนที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ในไตและม้ามของปลานิลที่ได้รับสารเมลามีนผสมในอาหาร พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวกระจายตัวปะปนในเนื้อเยื่อเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมหรือเซลล์ที่ตาย [13] นอกจากวิธีการที่ตรวจพบในไตและม้ามแล้วยังพบวิธีการที่สำคัญคือพบลักษณะโป่งพองของปลายซีเทร็อก เนื่องจากการคั่งของเม็ดเลือดแดงในหลอดเลือด ซึ่งวิธีการดังกล่าวคล้ายรายงานของ Ferguson [13] ที่ทำการศึกษาในปลาเทราท์สายรุ้งเกี่ยวกับการได้รับพิษโลหะหนักจำพวกแคดเมียม ปรอท และทองแดง ส่วนความผิดปกติที่พบในเซลล์ตับและไขนุชอยด์ของตับน่าจะเกิดจากความเป็นพิษของสารเมลามีนที่ผสมในอาหาร

ส่วนผลของสารเมลามีนต่อค่าทางโลหิตวิทยา พบว่าเมื่อปลาได้รับเมลามีนนาน 8 สัปดาห์ ค่าฮีมาโตคริต ระดับน้ำตาลและสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ การลดลงของค่าฮีมาโตคริตในปลานิลทุกกลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนโดยเฉพาะเมลามีนระดับ 8 และ 16% ในอาหารอาจบ่งชี้ว่าสารเมลามีนมีผลให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิวไินไตในปลานิลหรือการเกิดผลึกคริสตัลของเมลามีนในไตเหมือนในสัตว์อื่น [5, 12, 14, 17] อย่างไรก็ตามภาวะโลหิตจางที่พบในการศึกษานี้น่าจะเกิดจากพิษของสารเมลามีนที่ทำให้ไตเสื่อมสภาพหรือ

สูญเสียหน้าที่การทำงาน โดยเมื่อพิจารณาจากข้อมูลทางด้านค่าสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมในเลือดของปลาชนิดปลาที่มีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับค่าเม็ดเลือดแดงที่ลดลง เป็นไปได้ว่าสารเมลามีนจะมีผลต่อการขับโซเดียมและโพแทสเซียมออกจากร่างกายมากผิดปกติซึ่งผลดังกล่าวเป็นผลโดยตรงจากการเสื่อมหน้าที่ของไตซึ่งพัชรินทร์ [15] ได้รายงานไว้ในภาวะไตวายเรื้อรัง ระยะเวลาที่มีปัสสาวะออกมากจะมีการขับโซเดียมและโพแทสเซียมออกทางปัสสาวะสูงขึ้น จึงอาจมีภาวะขาดโซเดียมและโพแทสเซียมเกิดขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อเนื่องทำให้ปริมาณเลือดที่ไหลเวียนในร่างกายลดลง โดยปกติโซเดียมและโพแทสเซียมมีส่วนสำคัญในกลไกการรับส่งสารเข้าออกของเซลล์ ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Channel) เมื่อเกิดภาวะขาดโซเดียมและโพแทสเซียมขึ้น จึงทำให้เซลล์สูญเสียการทำงานและถูกทำลายในที่สุด สำหรับผลของเมลามีนที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง อาจเกี่ยวข้องกับการเสื่อมหน้าที่ของไตจากพิษของสารเมลามีน ทำให้การดูดน้ำตาลและแร่ธาตุต่างๆกลับที่ท่อไตลดลง หรืออาจเกี่ยวข้องกับการปริมาณอาหารที่กินซึ่งพบว่ากรกินอาหารจะลดลงในปลาที่ได้รับอาหารผสมเมลามีน

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของสารเมลามีนที่ทำให้ปลานิลตายครึ่งหนึ่งหรือ  $\text{LD}_{50}$  มีค่าเท่ากับ 271 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ซึ่งค่า  $\text{LD}_{50}$  นี้จัดอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของเมลามีนมีแนวโน้มจะเป็นแบบกึ่งเฉียบพลันหรือเรื้อรัง มากกว่าจะเป็นแบบเฉียบพลัน ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ European Food Safety Authority [16] เกี่ยวกับความเป็นพิษของสารเมลามีนในสัตว์ฟันแทะที่พบว่ามีความ  $\text{LD}_{50}$  ประมาณ 3,100 - 3300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งค่าที่ได้พบว่าใกล้เคียงกับที่ Reimschuessel และคณะ[12] ได้รายงานไว้ว่าในหนูไมซ์ พบว่ามีค่า  $\text{LD}_{50}$  ประมาณ 2,787 - 5,255 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งจัดว่าพิษของเมลามีนจะเป็นแบบเฉียบพลันต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ว่าเมื่อสัตว์ได้รับสารเมลามีนเพียงอย่างเดียวจะมีความเป็นพิษต่ำ แต่เมื่อสัตว์ได้รับเมลามีนร่วมกับสารอนุพันธ์ของเมลามีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไซยานูริก สารเมลามีนและสารอนุพันธ์สามารถเกิดปฏิกิริยาระหว่างกันได้เป็นสารเชิงซ้อน ซึ่งจะมีความเป็นพิษสูงขึ้น [16, 17] อย่างไรก็ตามมีหลายรายงาน ที่กล่าวถึงพิษของเมลามีนจะทำให้เกิดผลเรื้อรังมากกว่า [4, 8, 12, 16] โดยเมื่อสัตว์ได้รับสารเมลามีนเข้าสู่ร่างกายจะมีผลในการทำให้เกิดการตกค้างในอวัยวะ ทำให้อวัยวะทำงานผิดปกติ โดยเฉพาะที่ไต โดยสารเมลามีนที่เข้าไปสะสมจะรวมตัวกันกลายเป็นผลึกคริสตัลในท่อไต ไตมีอาการอักเสบ และเกิดไตวาย ซึ่ง Reimschuessel และคณะ[12] ได้รายงานไว้ว่า เมื่อหนูได้รับสารเมลามีนที่ระดับ 12,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 90 วันจะพบว่าผลึกคริสตัลตามท่อไต ในสุนัขพบว่าเมื่อได้รับเมลามีน 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวพบว่าเกิดผลึกคริสตัลขึ้นเมื่อหลังจากผ่านไปแล้ว 60-90 วัน แต่สำหรับการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีการสะสมของผลึกคริสตัลขึ้นในไต ทั้งนี้อาจเนื่องจากสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นสัตว์คนละชนิดกลไกในการขจัดสารพิษมีความแตกต่างกันมากทำให้เกิดภาวะการสะสมผลึกคริสตัลในไตที่แตกต่างกัน [6, 18]

จากผลการศึกษาที่สามารถสรุปได้ว่า สารเมลามีนโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายสูงขึ้น ภูมิคุ้มกันลดลง ค่าทางโลหิตวิทยา เช่น ฮีมาโตคริตระดับน้ำตาล สัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมในเลือดลดลง ทำให้ตับ ไต ม้าม และเหงือกเสียหาย และ

ค่าความเข้มข้นของสารเมลามีนที่ทำให้ปลานิลตายครั้งหนึ่ง หรือ LD<sub>50</sub> มีค่าเท่ากับ 271 กรัม/กิโลกรัม อาหาร

## เอกสารอ้างอิง

1. Penpun, S. Situation of Nile tilapia fish culture in Thailand. *Khon Kaen Agriculturer Journal*. Faculty of Agriculture Khon Kaen University. 2000;28: 173-181.
2. Fisheries statistics of Thailand 2007. Fisheries Information Technology Center (FITC). 2007.
3. US-FDA (U.S. Food and Drug Administration). Interim Melamine and Analogues Safety/Risk Assessment. 2007.
4. Jowaman, K. Melamine. *Chicken & Pig Magazine*. 2007;52: 23-25
5. Nopporn, S. Melamine. National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standard. 2008
6. FAO (Food and Agriculture Organization). Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residue in food and the environment and the WHO core assessment group on pesticide residue. 2006 Oct 3-12;Rome, Italy. 2006; 187. p.1-400.
7. Clark, R. Melamine crystalluria in sheep. *J South Afri Vet Med Assoc*. 1996;37: 349-351.
8. Panuwat, Y and Kittikon, B. Toxicity of melamine contamination in animal feed. The Animal Health Service center CMU; 2007.
9. Karakawa WW, Osterland CK, Krause R. Detaection of streptococcal group-specific antibodies in human sera. *J Experim Med*. 1965;122:195-205.
10. Suppaluk, R. Animal tissue technique. Kasetsart university press. Bang kok;2002; 286.
11. Finney DJ. In: Probit analysis. London: Cambrige University Press;1971: 68-72.
12. Reimschuessel R, Hattan DG, and Gu Y. Background Paper on Toxicology of Melamine and Its Analogues. World Health Organization, Geneva;2009: 1-25.
13. Ferguson HW. Systemic Pathology of Fish. Ames: I S U Press; 1989
14. Chen CY, Gregory AW, Rodman GG, Paul RB, Michael BT. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis -affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system. *Aquaculture*. 2003;218: 89- 102.
15. Pucharin, S. Chronic kidney disease nursing. Banloang hospital, Nan district. 2009.
16. EFSA (European Food Safety Authority). EFSA provisional statement on a request from the European commission related to melamine and structurally related compound such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for feed and food. 2007 June 07;Perma; 2007.
17. Reimschuessel et al. Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fishand pigs. *Am J Vet Res*. 2008;69: 1217-1228.
18. Andersen WC, Turnispeed SB, Karbiwnyk CM, Clark SB, Madson MR, Giesecker CM, et al. Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2008;56: 4340-4347.