

## RESEARCH ARTICLE

# Effects of melamine on growth, immunity, blood indices and histopathology of the hybrid catfish, *Claria macrocephalus* x *C. gariepinus*

Parichat Kubkaew<sup>1</sup>, Bundit Tengjaroenkul<sup>2\*</sup>, Urai Tengjaroenkul<sup>3</sup>, Peerapol Sukon<sup>4</sup>

## Abstract

**Objective** — To investigate the effects of melamine on growth, immunity, blood indices and histopathology in the hybrid catfish, *Clarius macrocephalus* x *C. gariepinus*.

**Materials and Methods** — Juvenile hybrid catfish weighed about 50 g were fed with diets containing melamine at 0, 1, 2, 4, 8 and 16 % (w/w) for 8 weeks. At the end of experiment, body weight, antibody titer against *Aeromonas hydrophila*, blood indices and histopathology of the catfish were collected and analyzed.

**Results** — Melamine was able to decrease growth performance, hematocrit, antibody titer and ratio of sodium and potassium, particularly in fish group fed on melamine at 4% (w/w) and higher. Furthermore, the melamine contaminated diet affect the increment of white blood cell count, blood urea nitrogen, creatinine and aspartate amino transferase. Among fish groups, fish fed melamine at 16% (w/w) had the greatest value with significant difference from the fish fed melamine at 2, 4 and 8% (w/w). Histopathologically, cellular lesions were found in liver, kidney and spleen of the melamine fed fish. Round green-brown melamine crystals deposited in all of the collected tissues.

**Conclusion** — Melamine in the diet at 4% (w/w) and higher likely demonstrates negative effects on growth, blood indices, antibody titer and histopathological lesions of the hybrid catfish.

*KKU Vet J. 2010;20(2):154-164*

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

**Keywords** : Hybrid catfish; Melamine; Hematology; Immunity; Histopathology

<sup>1</sup>Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary, Khon Kaen University, Khon Khan 40002, Thailand

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

<sup>3</sup>Faculty of Science, Chiang Mai University, Ching Mai, 50200, Thailand

<sup>4</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

\*Corresponding author: btengjar@kku.ac.th

# ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ระดับภูมิคุ้มกัน ค่าโลหิตวิทยาและพยาธิสภาพในปลาดุกลูกผสม

ปาริฉัตร กุบแก้ว<sup>1</sup>, บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล<sup>2\*</sup>, อุไร เต็งเจริญกุล<sup>3</sup>, พีระพล สุขอ้วน<sup>4</sup>

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ระดับภูมิคุ้มกัน ค่าโลหิตวิทยา และพยาธิสภาพ เมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอาหารปนเปื้อนสารเมลามีน

**วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ** ผสมสารเมลามีนในอาหารที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 8 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหารแก่ปลาดุกลูกผสม น้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อทำการศึกษา การเจริญเติบโต ระดับแอนติบอดีไทเตอร์ต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ค่าโลหิตวิทยา พยาธิสภาพ เนื้อเยื่อไต ตับและม้ามของปลาดุกลูกผสม

**ผลการศึกษา** เมลามีนส่งผลให้การเจริญเติบโตเฉลี่ย ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์และสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมของปลาดุกลดลง เมื่อได้รับอาหารที่ปนเปื้อนเมลามีนใน ความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยเฉพาะความเข้มข้นตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่วนจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ระดับความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจน ครีเอทีนินและเอนไซม์แอสพาเตสอะมิโนทรานสเฟอเรสเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับอาหารปนเปื้อนเมลามีนในความเข้มข้นที่สูงขึ้น กลุ่มที่ได้รับเมลามีนเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด และแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 2, 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ อย่างมี นัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้เมลามีนทำให้ตับ ไตและม้ามเกิดพยาธิสภาพ โดยพบผลึกเมลามีน ลักษณะกลมสีเขียวน้ำตาลกระจายในเนื้อเยื่อ

**ข้อสรุป** เมลามีนปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีผลต่อ การเจริญเติบโต ระดับภูมิคุ้มกัน ค่าโลหิตวิทยา รวมทั้งก่อให้เกิดพยาธิสภาพในตับ ไต และม้ามของ ปลาดุกลูกผสม

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(2):154-164

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

**คำสำคัญ** : ปลาดุกลูกผสม เมลามีน โลหิตวิทยา ระดับภูมิคุ้มกัน พยาธิสภาพ

<sup>1</sup>ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

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

<sup>3</sup>คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

<sup>4</sup>ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

\*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ: btengjar@kku.ac.th

## บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมทางเกษตรที่มีความสำคัญ จากสถิติของกรมประมงปี พ.ศ. 2549 รายงานว่าปลาน้ำจืดที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีปริมาณ 688,300 ตัน คิดเป็นมูลค่า 26,750 ล้านบาท โดยผลผลิตปลาดุกมีปริมาณ 142,200 ตัน มูลค่า 4,998.9 ล้านบาท ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย (2550) [1] ได้มีการคาดการณ์ถึงการเพิ่มปริมาณและมูลค่าผลผลิตปลาดุก สารเมลามีนเป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้เล็กน้อย จุดหลอมเหลว 250 องศาเซลเซียส มีชื่อเรียกทางเคมี 2,4,6-triamino-1,3,5 triazine เป็นสารตัวกลางที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอะมิโนเรซิน พลาสติกทนร้อน โฟม ปูย สารทนไฟ สีย้อม ยา ผ้าทอและกาว เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาและรายงานถึงความเสียหายจากพิษของเมลามีนต่อผู้บริโภค อุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะผลต่อสมรรถนะการผลิตและสุขภาพ [2,3] ความเป็นพิษของเมลามีนในสัตว์มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิด เพศ พันธุ์ ความทนต่อพิษและความสามารถในการขับทิ้งเมลามีนของสัตว์แต่ละชนิด [2,4,5,6] สำหรับอาการเป็นพิษเฉียบพลันพบว่า ในหนูขาวและกระต่ายที่กินเมลามีนมากกว่า 3,100-3,300 และมากกว่า 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ทำให้สัตว์ตายร้อยละ 50 สำหรับในมนุษย์และหนูตะเภา ทำให้เกิดอาการระคายเคืองตา [5,6] ส่วนความเป็นพิษเรื้อรังพบในสุกร ไก่ และสุนัข [2,5,6,7] โดยสัตว์ที่ได้รับเมลามีนจะมีอาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด ซึม อ่อนแอ อาเจียน ท้องเสีย ความถี่และปริมาณการกินน้ำ การปัสสาวะเปลี่ยนแปลง ไตวาย ผื่นท้อปัสสาวะหนาตัว ต่อมเหงื่อบวม และเกิดนิ่วในท้อปัสสาวะและที่ไต ยาวมาลย์ (2550) [2] รายงานว่าปลาดุกที่ได้รับเมลามีนจะมีสีผิวคล้ำขึ้น ตับและไตบวม ในปลานิลพบเกล็ดลอกหลุดและตัวมีสีคล้ำ อย่างไรก็ตามรายงานการเกิดพิษเมลามีนในสัตว์น้ำต่อสมรรถนะการผลิต ระดับภูมิคุ้มกัน และพยาธิสภาพยังมีน้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ระดับภูมิคุ้มกันต่อวัชชีน *Aeromonas hydrophila* ค่าโลหิตวิทยา และพยาธิสภาพในปลาดุกลูกผสม

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### การออกแบบการทดลองและสัตว์ทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD-Completely Randomized Design) ใช้ปลาดุกลูกผสม (*Claria macrocephalus* x *C. gariepinus*) น้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัมต่อตัว แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับอาหารไม่ผสมเมลามีน กลุ่มที่ 2-6 ได้รับอาหารผสมเมลามีนที่ระดับความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารตามลำดับ ทดลองที่ความหนาแน่น 1 ตัวต่อน้ำ 10 ลิตร นาน 8 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การทดลองนี้ได้ปฏิบัติตามกฎระเบียบและข้อปฏิบัติในการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

### การวัดการเจริญเติบโต

วัดการเจริญเติบโตของปลาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น หลังทำการทดลองได้ 8 สัปดาห์ โดยใช้เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

### การเตรียมวัคซีนและการตรวจแอนติบอดีไตเตอร์

วัคซีนเชื้อตายและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นแอนติเจนในการทดลองเตรียมมาจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ฉีดวัคซีนแก่ปลาทุกกลุ่มทางช่องท้องปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม โดยฉีด 2 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำซีรัมไปตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธีการเกาะกลุ่มแบบตรง (direct agglutination)

### การศึกษาค่าโลหิตวิทยา

ทำการสลบปลาด้วย Clove oil (Sigma, USA) 100 พีพีเอ็ม ก่อนเจาะเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณโคนหาง ส่วนหนึ่งเก็บในขวดเก็บเลือดที่เคลือบด้วยสารเฮปาริน เพื่อไปตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น อีกส่วนหนึ่งเก็บในขวดเพื่อนำไปประเมินระดับยูเรียไนโตรเจน ครีเอทีนิน เอนไซม์แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรสและสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม

### การศึกษาพยาธิสภาพ

ตรวจดูการภายนอกสังเกตความผิดปกติ แล้วผ่าเปิดช่องท้องปลาเพื่อดูรอยโรคเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายในได้แก่ ตับ ม้ามและไต แช่ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน [10] ผ่านกรรมวิธีการไล่น้ำในไอโซโพรพานอลและตรึงเนื้อเยื่อด้วยพาราฟิน ตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องมือโครโตม แล้วทำการย้อมสีด้วยฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน [10] ก่อนดูใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ระดับยูเรียไนโตรเจน ครีเอทีนิน เอนไซม์แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรสและสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม ในแต่ละกลุ่มทดลองนำมาเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนโดยใช้ Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5

## ผลการศึกษา

### ผลต่อการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตเฉลี่ยของปลาดุกลดต่ำลงเมื่อได้รับอาหารที่มีเมลามีนความเข้มข้นที่สูงขึ้น กลุ่มควบคุมมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ) แต่กลุ่มที่ได้รับสารเมลามีนความเข้มข้น 8 และ 16 เปอร์เซ็นต์

มีการเจริญเติบโตเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 1)

#### ผลต่อปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์

กลุ่มควบคุมมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เฉลี่ยสูงที่สุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ) แต่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมลามีนในความเข้มข้นตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 1)

#### ผลต่อค่าโลหิตวิทยา

##### ผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลงเมื่อความเข้มข้นของเมลามีนเพิ่มขึ้น กลุ่มควบคุมมีปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ) แต่พบว่ามีค่าแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับเมลามีนตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 1)

##### ผลต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฉลี่ยของปลาตุ๊กเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเมลามีนความเข้มข้นที่สูงขึ้น กลุ่มควบคุมมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฉลี่ยต่ำที่สุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ) นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับเมลามีน 4 เปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมลามีน 8 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลุ่มที่ได้รับเมลามีน 16 เปอร์เซ็นต์แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 1)

**Table 1.** Mean Final Weight, Antibody Titer, Hematocrit and White Blood Cell Count of the Hybrid Catfish Fed Different Levels of Melamine

Melamine (%)	Mean Final Weight (g)	Antibody Titer (log 10)	Hematocrit (%)	White Blood Cell Count ( $\times 10^6$ cell/ml)
Control(0)	56.40 $\pm$ 8.66 <sup>a</sup>	1.75 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	41.50 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>
1	48.10 $\pm$ 2.12 <sup>ab</sup>	1.65 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	38.75 $\pm$ 4.99 <sup>ab</sup>	1.93 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
2	46.90 $\pm$ 8.59 <sup>ab</sup>	1.55 $\pm$ 0.86 <sup>ab</sup>	35.60 $\pm$ 2.65 <sup>bc</sup>	2.30 $\pm$ 3.51 <sup>ab</sup>
4	44.89 $\pm$ 6.70 <sup>ab</sup>	1.35 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	32.60 $\pm$ 1.81 <sup>cd</sup>	2.60 $\pm$ 2.04 <sup>bc</sup>
8	37.48 $\pm$ 10.47 <sup>b</sup>	0.95 $\pm$ 0.86 <sup>bc</sup>	29.60 $\pm$ 4.06 <sup>de</sup>	2.95 $\pm$ 2.68 <sup>c</sup>
16	36.95 $\pm$ 6.63 <sup>b</sup>	0.75 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	25.60 $\pm$ 2.53 <sup>e</sup>	3.69 $\pm$ 4.14 <sup>d</sup>

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

**ผลต่อค่าเคมีในเลือด**

ระดับยูเรียไนโตรเจนมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเมลามีนที่เพิ่มขึ้น กลุ่มทดลองที่ได้รับเมลามีนที่ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) กลุ่มควบคุมมีระดับยูเรียไนโตรเจนสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเมลามีนตั้งแต่ 2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับเมลามีน 4 เปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมลามีน 8 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) (Table 2)

ระดับครีเอทีนีนมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นเมลามีนที่เพิ่มขึ้นกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด ปรากฏกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้นตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 2)

ระดับของเอนไซม์แอสพาเทอะมิโนทรานสเฟอเรสทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเมลามีนที่เพิ่มขึ้น กลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้นมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 2)

สัดส่วนของโซเดียมต่อโพแทสเซียมมีค่าลดลงเมื่อได้รับเมลามีนความเข้มข้นสูงขึ้น กลุ่มที่ได้รับเมลามีน 16 เปอร์เซ็นต์มีค่าต่ำที่สุด และมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมการทดลองและกลุ่มที่ได้รับเมลามีนเข้มข้นมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 2)

**Table 2.** Urea Nitrogen (BUN), Creatinine (Cre), Aspartate Aminotransferase (AST) and Sodium Potassium Ratio ( $Na^+ / K^+$  ratio) of the Blood of the Fish Fed Different Levels of Melamine

Melamine (%)	BUN	Creatinine	AST	( $Na^+ / K^+$ ratio)
control (0)	0.33 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>a</sup>	87 ± 6.24 <sup>a</sup>	58.16 ± 1.96 <sup>a</sup>
1	0.38 ± 0.30 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>a</sup>	91 ± 3.5 <sup>ab</sup>	52.23 ± 1.16 <sup>b</sup>
2	0.43 ± 0.45 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.41 <sup>ab</sup>	104 ± 6.02 <sup>b</sup>	46.07 ± 3.88 <sup>c</sup>
4	0.51 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.39 ± 0.20 <sup>bc</sup>	128 ± 9.01 <sup>c</sup>	44.16 ± 2.84 <sup>c</sup>
8	0.54 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.44 ± 0.23 <sup>cd</sup>	171 ± 6.55 <sup>d</sup>	37.51 ± 2.04 <sup>d</sup>
16	0.65 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.50 ± 0.43 <sup>d</sup>	197 ± 16.01 <sup>e</sup>	32.41 ± 2.78 <sup>e</sup>

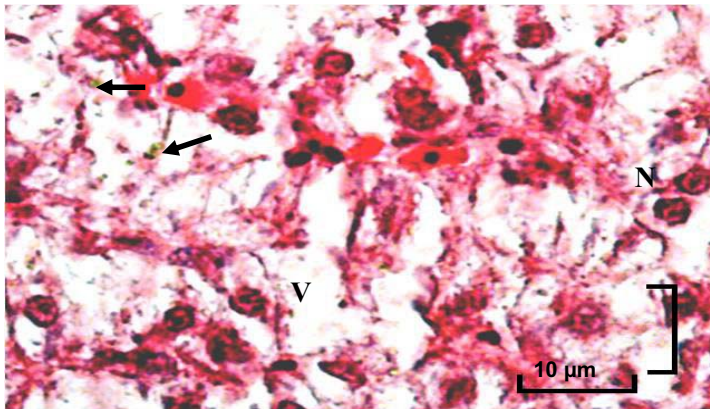
<sup>a,b,c,d</sup>Different superscripts within each column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

**ผลต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ**

**ผลต่อตับ**

เนื้อเยื่อตับมีความผิดปกติมากที่สุดที่ความเข้มข้นเมลามีน 16 เปอร์เซ็นต์คือ เห็นขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจน เกิดช่องว่างภายในเซลล์ พบการแทรกของเซลล์เม็ดเลือดขาวและพบผลึกเมลามีนลักษณะกลม สีเขียวน้ำตาลกระจายในเนื้อเยื่อตับ โดยเริ่มพบที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Figure 1)

**Figure 1.** Liver of the Catfish Fed Melamine Contaminated in the Diet

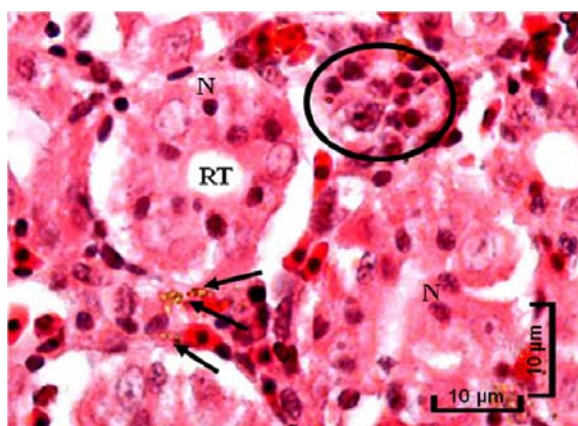


Melamine crystals deposited in the liver (Arrows). Hepatocyte showed vacuoles (V) in cytoplasm with a pyknotic nucleus (N). (H&E, Scale = 10  $\mu\text{m}$ ).

### ผลต่อไต

เซลล์ท่อไตบวม นิวเคลียสอัดกันแน่น ขนาดของนิวเคลียสไม่สม่ำเสมอ พบช่องว่างรอบเซลล์ท่อไต มีเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรกเข้ามาในไต พบผลึกเมลามีนลักษณะกลมสีเขียวน้ำตาลแทรกระหว่างท่อไต โดยเริ่มพบที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Figure 2)

**Figure 2.** Kidney of the Catfish Fed Melamine Contaminated in the Diet

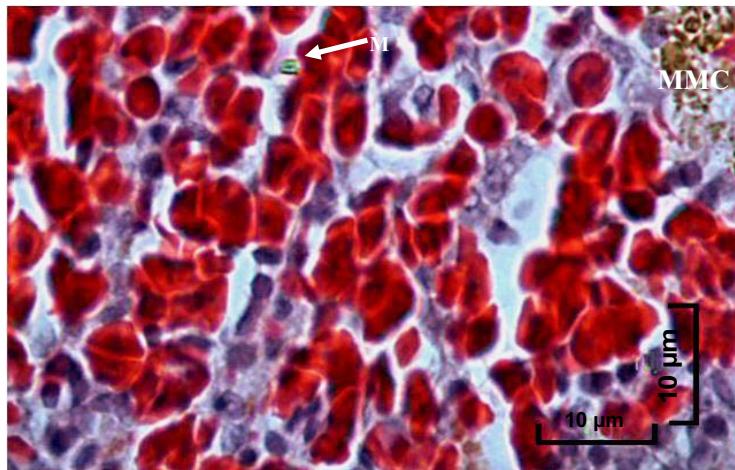


Melamine crystals (Arrows) deposited in the interstitial tissues between kidney tubules (RT). Tubular cell showed a pyknotic nucleus (N). White blood cells infiltrated to the kidney tissues (Circle). (H&E, Scale = 10  $\mu\text{m}$ )

### ผลต่อม้าม

ระดับความเข้มข้นของเมลามีนสูงขึ้นพบว่ามียากลุ่มเมลานโนแมคโครฟาจ เซลล์เม็ดเลือดขาว และผลึกเมลามีนสีเขียวน้ำตาลแทรกในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะปลากลุ่มที่ได้รับเมลามีนที่ความเข้มข้นมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Figure 3)

**Figure 3.** Spleen of the Catfish Fed Melamine Contaminated in the Diet



Melamine crystals deposited in the spleen (Arrows). Melano-macrophage center (MMC) presented in the spleen. (H&E, Scale = 10  $\mu$ m )

### วิจารณ์

น้ำหนักตัวของปลาดุกลูกผสมเฉลี่ยลดลง เมื่อความเข้มข้นของเมลามีนเพิ่มขึ้น ผลของเมลามีนที่ทำให้ปลาดุกมีการเจริญเติบโตลดลงสอดคล้องกับการศึกษาของเยาวมาลย์ [2] ซึ่งรายงานว่าสัตว์ที่ได้รับสารเมลามีนจะมีอาการผอมซูบ ไม่กินอาหาร และการเจริญเติบโตลดลง ในทำนองเดียวกัน ณัฐพงศ์ และคณะ (2550) [9] รายงานว่าสุกรอายุประมาณ 6-9 สัปดาห์ ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนเมลามีนมากกว่า 4,000 พีพีเอ็ม มีอาการซึม ไม่กินอาหาร ซูบผอมและตาย ภาณุวัฒน์และกิตติกร (2550) [10] รายงานว่าลูกสุกรอนุบาลได้รับสารเมลามีนปนเปื้อนในอาหารประมาณ 2-3 สัปดาห์ ลูกสุกรจะผอม น้ำหนักลดลงและเริ่มทยอยตาย นอกจากนี้ Nilubol และคณะ (2009) [7] ได้สรุปว่าเมลามีนเป็นสาเหตุให้สุกรอายุ 5-6 สัปดาห์ป่วย น้ำหนักตัวลดลง สีเหลืองซีดและมีอัตราการตายสูง Reimschuessel และคณะ [11] รายงานว่าหนูที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้นตั้งแต่ 15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารขึ้นไป นาน 2 สัปดาห์ มีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในปี พ.ศ. 2553 สุรพงษ์และบัณฑิตย์ [12] พบว่าเมลามีนปนเปื้อนในอาหารทำให้ปลานิลรุ่นที่มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ความเข้มข้นของเมลามีนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แอนติบอดีไตเตอร์ของปลาตุ๊กตากลุ่มผสมมีแนวโน้มลดลง กลุ่มที่ได้รับเมลามีน 16 เปอร์เซ็นต์มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมลามีนมี ผลต่อการทำงานของอวัยวะระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ตับ ไต และม้าม สมมุติฐานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ ที่พบพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อและเซลล์ของอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันข้างต้น และอาจส่งผลให้ปลาตุ๊กตาที่ได้รับเมลามีนสร้างแอนติบอดีไตเตอร์น้อยลง ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของปริณูทิพย์ และคณะ (2552) [13] ที่รายงานว่ากบขุนอายุ 2-4 เดือนได้รับสารเมลามีนปนเปื้อนในอาหารก่อให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันในร่างกายลดลง ติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน และเกิดฝีในตับ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบความผิดปกติในเซลล์และไซโทซอลของตับ รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของระดับซีรัมเอนไซม์แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรส น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระดับของสารเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ซึ่ง Brown และคณะ (2007) [14] รายงานว่าสุนัขและแมวจำนวน 16 ตัวเมื่อได้รับเมลามีนปนเปื้อนในอาหารพบว่าระดับเอนไซม์ตับมีค่าสูงขึ้น พบผลึกเมลามีนในเนื้อเยื่อไต และเกิดการอักเสบของเซลล์ระหว่างท่อไต

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น ทำให้พบการสะสมของผลึกเมลามีนลักษณะกลมสีเขียวน้ำตาลแทรกในทุกเนื้อเยื่อ โดยพบมากที่สุดที่เนื้อเยื่อตับ ซึ่งมากกว่าเนื้อเยื่อไตและม้าม ผลที่เกิดขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของตับในการขจัดสารพิษ และสภาพความเป็นกรดต่างของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน [5]

ในตับ ม้าม และไตของปลาตุ๊กตากลุ่มผสมที่ได้รับสารเมลามีนผสมในอาหาร พบเซลล์เม็ดเลือดขาวกระจายตัวปะปนในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเมลามีนที่สูงขึ้น ความผิดปกตินี้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการจับกินสิ่งแปลกปลอมหรือเซลล์ที่ตาย [15] พบว่าเมื่อปลาได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน ร่างกายจะผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงขึ้น เพื่อทำหน้าที่กำจัดและทำลายสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งพบเมลานินเม็ดโครมาจเพิ่มมากขึ้น ตามความเข้มข้นของเมลามีนที่เพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ Domitrovic (2000) [16] รายงานว่า ตับปลาพิซ (Pisces, *Cichlasoma dimerus*) ที่ได้รับสารพิษปนเปื้อนในอาหาร มีจำนวนและขนาดเมลานินเม็ดโครมาจเพิ่มขึ้น

ปลาตุ๊กตาที่ได้รับเมลามีนความเข้มข้นที่สูงขึ้น จะมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง กลุ่มที่ได้รับเมลามีนเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำที่สุด ผลดังกล่าวอาจเกิดจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลายหรือเนื้อเยื่อซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดได้รับความเสียหายส่งผลให้เกิดภาวะโลหิตจางตามมา ความผิดปกตินี้สอดคล้องกับการศึกษาในสุกรของนพพร (2551) [3] รายงานว่าพิษของเมลามีนทำให้ไตและม้ามซึ่งเป็นอวัยวะในการสร้างเม็ดเลือดเสื่อมสภาพหรือสูญเสียหน้าที่ อย่างไรก็ตามในหนูและแกะ พบว่าผลึกเมลามีนในไตไม่สัมพันธ์กับภาวะโลหิตจาง [4,11] เมื่อพิจารณาสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมในเลือดของปลาตุ๊กตากลุ่มผสมพบว่า มีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ลดลงอาจเป็นไปได้ว่าสารเมลามีนมีผลต่อการขับโซเดียมและโพแทสเซียมออกจากร่างกาย ซึ่งผลดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการเสื่อมหน้าที่ของไต พัชรินทร์ [17] ได้รายงานว่าในภาวะไตวายเรื้อรัง จะมีการขับโซเดียมและโพแทสเซียมออกทางปัสสาวะสูงขึ้น

ระดับยูเรียไนโตรเจนและครีเอทีนีนมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเมลามีนที่เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเมื่อสัตว์ได้รับสารเมลามีนเข้าสู่ร่างกายมีผลให้เกิดการตกค้างและอวัยวะทำงานผิดปกติ โดยเฉพาะที่ไต สารเมลามีนที่เข้าไปจะสะสมกลายเป็นผลึก ทำให้เกิดการอักเสบและไตวาย ในปี พ.ศ. 2550 ณัฐพงศ์ และคณะ [9] รายงานว่าสุกรอายุ 6-9 สัปดาห์ ได้รับอาหารปนเปื้อนเมลามีนมากกว่า 4,000 พีพีเอ็ม พบระดับยูเรียไนโตรเจน ครีเอทีนีนและพลาสมาโปรตีนมีค่าสูงกว่าปกติ รวมทั้งพบการอักเสบรอบท่อไต Baynes และคณะ (2009) [18] รายงานว่าเมื่อสุนัขและแมวได้รับสารเมลามีนก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ไต พบผลึกสีน้ำตาลเหลืองที่ท่อไต ระดับยูเรียไนโตรเจนและครีเอทีนีนมีค่าสูงขึ้น Reimschuessel และคณะ [11] รายงานว่าเมื่อหนูได้รับสารเมลามีนที่ระดับ 12,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 90 วัน พบผลึกคริสตัลตามท่อไต และ Kun Chao Chen และคณะ (2009) [22] รายงานว่าหนูที่ได้รับเมลามีนปนเปื้อนในอาหาร 50-100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นาน 3 เดือน มีระดับยูเรียไนโตรเจนและครีเอทีนีนในเลือดสูงขึ้น เกิดการสะสมผลึกเมลามีน และพบการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบท่อไต

จากการศึกษานี้พบการสะสมของผลึกเมลามีนในเนื้อเยื่อระหว่างท่อไต ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่น [5,20,21] ที่พบผลึกเมลามีนอยู่ในท่อไต ทั้งนี้อาจเนื่องจากสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นคนละชนิด กลไกในการขจัดสารพิษและสรีระวิทยา รวมถึงความเป็นกรดต่างของเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกัน จึงอาจทำให้เกิดการสะสมผลึกเมลามีนในไตที่ตำแหน่งต่างกัน [5]

## ข้อสรุป

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าเมลามีนปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีผลต่อการเจริญเติบโต ระดับภูมิคุ้มกัน ค่าโลหิตวิทยา รวมทั้งก่อให้เกิดพยาธิสภาพในตับ ไต และม้ามของปลาดุกกุลผสม

## เอกสารอ้างอิง

1. Fisheries statistics of Thailand 2007. Fisheries Information Technology Center (FITC). 2007.
2. Jowaman K. Melamine. Chicken & Pig Magazine. 2007;52: 23-25.
3. Nopporn S. Melamine. National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standard. 2008.
4. Clark R. Melamine crystalluria in sheep. *J South African Vet Med Assoc.* 1996; 37: 349-351.
5. 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 Rome, Italy, 3-12 October 2006, 187, 1-400.
6. US-FDA (U.S. Food and Drug Administration). Interim Melamine and Analogues Safety/Risk Assessment. Available at URL: <http://cfsan.fda.gov/~dms/melamine.html>;2007
7. Nilubol D, Pattanaseth T, Boonsri K, Pirarat N, Leepipatpiboon N. Melamine and cyanuric acid-associated renal failure in pig in Thailand. *Vet Pathol.* 45: 730-740; 2009.

8. Suppaluk R. Animal tissue technique. Kasetsart University Press. Bang kok; 2002; 286.
9. Nattaphong A, Pariwat P, Alongkot B, Taweesak S. Effect of feed contaminated with melamine on nursery pigs. Kasetsart university conference fortysix<sup>th</sup>. In Veterinary Medicine. Bang kok; 2008; 650-655.
10. Panuwat Y, Kittikon B. Toxicity of melamine contamination in animal feed. The Animal Health Service center CMU; 2007.
11. Reimschuessel R, Hattan DG, and Gu Y. Background Paper on Toxicology of Melamine and Its Analogues. World Health Organization, Geneva; 2009: 1-25.
12. Surapong, Y and Bundit, T. Effects of melamine on growth and health status, and lethal dose 50 in tilapia fish. *KKU Vet J.* 2010;20:
13. Printip W, Witsanu B, Theraporn P, Patra M. Melamine affected fattening frog farms. Kasetsart university conference fortysix<sup>th</sup>. In Veterinary Medicine. Bang kok; 2008; 471-477.
14. Brown CA, Jeong KS, Poppenga RH, Puschner B, Miller DM, Ellis AE, et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *J Vet Diag Invest.* 2007;19:525-531.
15. Ferguson HW. Systemic Pathology of Fish. Ames: ISU Press; 1989.
16. Domitrovic HA. Melanomacrophage centers in liver, spleen and kidney of *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae): histology and modifications in relation to sanitary and environmental conditions. *Rev Ichthyol.* 2000;8:9-8.
17. Pucharin S. Chronic kidney disease nursing. Banloang hospital, Nan district. 2009.
18. Baynes R, Riviere J. Risks associated with melamine and related triazine contamination of food. *Emerging Health Threats Journal* 2009.
19. Chen KC, Liao CW, Cheng FP, Chou CC, Chang SC, Wu JH, et al. Evaluation of subchronic toxicity of pet food contaminated with melamine and cyanuric acid in rats. *Toxicol Pathol.* 2009;37:959-968.
20. Dobson RL, Motlagh S, Quijano M, Cambron R T, Baker TR, Pullen A, et al. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicol Sci.* 2008;106:251-262.
21. Sun N, Shen Y, He LJ. Histopathological features of the kidney after acute renal failure from melamine. *N Eng J Med.* 2010;362:662-664.

