مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۱، ۱۳۶-۱۲۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 72,1:129-136, 2017

اثرات لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در برابر تنش تراکم در بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سعید مشکینی[1*] نوروز دلیرژ[2] علی اکبر طافی[3]

۱) گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی آبزیان، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳) گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ آبان ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱۱ دی ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: تقویت سیستم ایمنی ماهیان در برابر تنش‌های موجود در مزارع پرورشی، امری ضروری به نظر می‌رسد. **هدف:** این تحقیق به منظور بررسی اثر لوامیزول در تقویت سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان در برابر تنش تراکم انجام گرفت. **روش کار:** ۱۵۰۰ قطعه ماهی ۵۰ گرمی قزل‌آلای رنگین کمان با تراکم kg/m^3 ۳۳ در پنج تیمار (هر تیمار دارای سه تکرار) تقسیم گردید و بترتیب با جیره‌های حاوی mg ۰ (گروه شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ لوامیزول در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند، سپس تا روز ۶۰ همه تیمارها در شرایط تنش تراکم دو و سه برابر دوره پرورش قرار گرفتند. در روزهای ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و۶۰ از تمام تیمارها نمونه سرم برای ارزیابی فاکتورهای فعالیت عامل مکمل، فعالیت لیزوزیم و میزان ایمونوگلوبولین تام تهیه گردید. **نتایج:** نتایج حاصل بیانگر این بود که تا پایان روز ۴۵ تیمارهای دریافت کننده لوامیزول تنها از نظر فاکتور عامل مکمل سرم دارای تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) با گروه شاهد بودند. در پایان آزمایش در تنش تراکم دو و سه برابر، تیمار حاوی ۱۰۰۰mg لوامیزول در یک کیلوگرم غذا، افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) فعالیت عامل مکمل، فعالیت لیزوزیم و ایمونوگلبولین تام سرم را نسبت به گروه شاهد نشان داد. بیشترین درصد بقا در پایان آزمایش در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ مشاهده گردید. **نتیجه گیری‌نهایی:** با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از لوامیزول به عنوان محرک ایمنی، حداکثر با غلظت ۰/۱٪ جیره غذایی موجب بالا بردن مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در برابر تنش تراکم زیاد و افزایش بقای آن می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، لوامیزول، پاسخ‌های ایمنی، تنش تراکم

مقدمه

پرورش ماهی و دیگر آبزیان در محیط‌های مصنوعی به دلیل تفاوت شرایط با محیط طبیعی زندگی آن‌ها همواره با چالش‌های ابتلا به بیماری یا رویارویی با تنش‌های مختلف محیطی همراه بوده و پرورش دهندگان ناگزیر از به کار بردن روش‌های مختلف برای بالا بردن مقاومت آبزیان پرورشی در برابر این شرایط سخت محیط‌های پرورشی مصنوعی هستند. استفاده از محرک‌های ایمنی یکی از روش‌هایی است که به منظور بالا بردن مقاومت آبزیان در برابر تنش‌های گوناگون و پیشگیری و کنترل بیماری‌ها در آبزی پروری به کار می‌رود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد محرک‌هایی مانند گلوکان، لاکتوفرین، کیتین، کیتوزان و لوامیزول باعث تحریک سیستم ایمنی ماهی و میگو می‌شوند. این محرک‌ها سبب تسهیل عمل بیگانه خواری سلول‌های فاگوسیت کننده و افزایش فعالیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی آن‌ها و بالابردن توان مقاومت آبزی در برابر شرایط تنش زای محیطی می‌شوند (۶،۱۹).

محرک‌های ایمنی با بالا بردن مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌ها در مدیریت سلامت ماهی در آبزی پروری دخیل هستند. محرک‌های ایمنی که تاکنون اثر آن‌ها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است شامل مواد شیمیایی، ترکیبات باکتریایی، پلی ساکاریدها، عصاره‌های گیاهی و جانوری، فاکتورهای تغذیه‌ای و سیتوکین‌ها می‌باشند (۱۰،۲۸) که باعث تسهیل عمل سلول‌های بیگانه خوار و افزایش فعالیت‌های ضد باکتریایی آن‌ها می‌شود (۱۳). محرک‌های ایمنی همچنین باعث تحریک سلول‌های طبیعی کشنده (Natural killer cells) و پاسخ‌های آنتی بادی در ماهی می‌شوند (۲۸). این مواد همچنین باعث افزایش تولید اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و پروتئین‌های عامل مکمل شده که موجب افزایش فعالیت لنفوسیت‌های B و T می‌گردند (۲۶). محرک‌های ایمنی قادرند با فعال کردن ماکروفاژها (۱۳) که نقش مهمی در ایمنی سلولی دارند، مقاومت طولانی مدتی را در ماهیان ایجاد نمایند (۲۷). بنابراین نقش محرک‌های ایمنی در پیشگیری از بیماری‌های آبزیان و مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی انکار ناپذیر می‌باشد.

لوامیزول یک داروی ضد کرم بوده که برای مبارزه با آلودگی با نماتودها در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان داده اند که لوامیزول باعث افزایش مقاومت در برابر آلودگی‌های مختلف و تنش‌های محیطی در ماهیان هم می‌شود و می‌توان از آن به عنوان محرک ایمنی در آبزیان استفاده نمود (۳۱). محققین تأثیر لوامیزول بر ارتقای سطح پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی و کاهش مرگ و میر در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpiio*) (۲۳)، کپور علفخوار (Ctenopharyngodon idella) (۳۰)، گربه ماهی (Clarias Gariepenus) (۲۹) گزارش نموده‌اند.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۲۹۵، نمابر: ۰۴۴۱-۳۴۶۷۰۹۷ Email: s.meshkiniy@gmail.com

امروزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به عنوان یکی از عمده‌ترین گونه‌های ماهیان پرورشی در اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی، در بیشتر نقاط جهان شناخته شده است و تلاش‌ها برای تولید بیشتر این آبزی در سیستم‌های متراکم و فوق متراکم در دنیا رو به افزایش است. لذا با توجه به اینکه افزایش تراکم در سیستم‌های پرورشی برای ماهیان تنش‌زا است، بنابراین تقویت سیستم ایمنی آن‌ها برای رویارویی با این تنش‌ها ضروری به نظر می‌رسد. از این رو مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر مقادیر مختلف لوامیزول به عنوان یک محرک ایمنی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای افزایش مقاومت این گونه در برابر تنش تراکم در سیستم‌های پرورشی متراکم، در پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش کار

تهیه بچه ماهیان و شرایط پرورشی: تعداد ۱۵۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۵۰ گرمی از یکی از مزارع پرورش ماهی ارومیه تهیه شده و پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیط آزمایش و اطمینان از سلامتی ظاهری آن‌ها، در سالن تکثیر و پرورش ماهیان پژوهشکده آرتمیای دانشگاه ارومیه به تعداد مساوی در ۱۵ حوضچه ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی استوانه‌ای با حجم آبگیری ۱۵۰l (تراکم ۳۳ kg/m^3) تقسیم گردیدند. ماهیان در پنج تیمار غذایی (یک گروه شاهد و چهار گروه تیمار با مقادیر ۱۰۰mg ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ لوامیزول در هر کیلوگرم غذا) و با سه تکرار به مدت دو ماه (۴۵ روز تحت تیمار با لوامیزول و ۱۵ روز بدون لوامیزول و با تراکم ۲ و ۳ برابر حالت معمول پرورش یا به عبارتی به ترتیب با تراکم ۶۶kg/m^3 و ۹۹) مورد پرورش قرار گرفتند.

تهیه جیره غذایی و غذادهی: غذای ماهیان از نوع تجارتی (Growth GFT (food trout–1 شرکت چینه تهران با ترکیب ۴۰٪ پروتئین، ۱۴٪ چربی، ۱۱٪ رطوبت، ۱۰٪ خاکستر، ۴٪ فیبر و ۱/۱٪ فسفر تهیه شده و مقدار مورد نیاز هر گروه از ماهیان با توجه به میانگین وزن، دمای آب و با استفاده از جدول استاندارد غذادهی (۱۴) تعیین گردید. برای تهیه جیره حاوی لوامیزول، روزانه غذای هر تیمار با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱g) وزن شده و سپس مقدار لوامیزول لازم برای هر تیمار با توجه به مقادیر ۱۰۰mg ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ در هر کیلوگرم غذا، با ترازوی دیجیتالی (با دقت g ۰/۰۰۱) وزن و در ۱۵cc آب مقطر حل گردید و با آب پاش مخصوص هر تیمار، روی غذای آن تیمار اسپری گردید. پس از خشک شدن غذا در دمای اتاق، تا زمان استفاده در دمای ۴°C نگهداری شدند. در گروه شاهد، فقط ۱۵cc آب مقطر روی غذا اسپری شد تا تنها تفاوت غذای آن با سایر گروه‌ها در مقدار لوامیزول غذا باشد. غذادهی ماهیان در ۴ وعده بین ساعات ۸ صبح تا ۶ عصر و در فواصل مساوی صورت گرفت.

خونگیری و تهیه سرم: در طول تحقیق هر پانزده روز یکبار از همه تیمارها تعداد ۱۵ قطعه ماهی (۵ قطعه از هر تکرار) به طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با محلول ۱۵۰mg/l پودر گل میخک با قطع ساقه دمی از آن‌ها خونگیری شد (۲۴). پس از جداسازی سرم، نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند (۳۰).

اندازه‌گیری فعالیت مسیر فرعی عامل مکمل: فعالیت مسیر فرعی عامل مکمل براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش و به کمک روش Amar و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲) اندازه‌گیری شد. در این روش گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تتراستیک اسید – منیزیوم – ژلاتین ورنال (pH = ۷ ،۰/۰۱mol) (Sigma, E۴۳۷۸ ,St. Louis, USA) شسته شده و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار به میزان ۲×۱۰^۸ سلول در هر میلی لیتر تنظیم گردید. سپس نمونه‌های سرم ابتدا ۱۰۰ مرتبه با بافر فوق الذکر رقیق شده و براساس جدول استاندارد آماده سازی نمونه سرم جهت اندازه‌گیری فعالیت عامل مکمل (۳) حجم‌های متفاوتی از آن در هفت لوله آزمایش استریل ریخته شده، حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰µl رسانده شد. سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰µl گلبول قرمز خرگوش اضافه گردید. مخلوط فوق در دمای ۲۰°C به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شده و در پایان به هرکدام از لوله‌ها ۳/۱۵ml محلول ۰/۸۵٪ کلرید سدیم افزوده شد. سپس لوله‌ها با دور ۱۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴°C سانتریفیوژ شده و دانسیته نوری محلول رویی به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۱۴nm اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان فعالیت مسیر فرعی عامل مکمل با استفاده از کاغذ شطرنجی منحنی لیز رسم و فعالیت عامل مکمل نمونه از رابطه زیر محاسبه گردید (۲):

فعالیت عامل مکمل (U/ml) = k × (فاکتور رقت) × ۰/۵

در رابطه فوق k مقداری از سرم بر حسب میلی لیتر است که موجب ۵۰٪ همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این آزمایش ۰/۰۱ می‌باشد، چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است. در اندازه‌گیری فعالیت مسیر فرعی عامل مکمل هر نمونه سرم دارای ۷ تکرار بوده است.

اندازه گیری فعالیت لیزوزیم سرم: فعالیت لیزوزیم سرم براساس روش Clerton و Kim و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی *Micrococous lysodeikticus* (Sigma, M۳۷۷۰ , St. Louis, USA) اندازه‌گیری شد (۸،۲۰). به طور خلاصه، مقدار ۱۵۰µl از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس با غلظت ۲mg/ml در بافر سیترات سدیم ۰/۰۲mol (pH = ۵/۵)، به ۱۵µl نمونه سرم در چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۵۰nm با الایزا نگار (اوارنس، آمریکا) قرائت گردید. طبق تعریف یک واحد فعالیت لیزوزیم برابر با میزان سرمی است که باعث کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه گردد (U/min).

اندازه گیری ایمونوگلبولین تام سرم: برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین

جدول ۱. میانگین فعالیت عامل مکمل سرم (± انحراف معیار) (U/ml) در تیمارهای مختلف. حروف یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.

تیمارهای مختلف			روزهای نمونه برداری		
	LV۰	LV۱۰۰	LV۲۵۰	LV۵۰۰	LV۱۰۰۰
روز صفر	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱
روز ۱۵	۴۶۸±۴۲ abcd	۲۵±۸۸۸ a	۸۹۵±۸۵ b	۷۵۵±۲۱ c	۹۰۲±۷۶ d
روز ۳۰	۵۳±۴۸۵ abcd	۸۹۰±۲۸ b	۸۸۲±۵۹ c	۸۹۵±۴۶ d	۱۰۶۳±۴۲ abcd
روز ۴۵	۱۴±۵۰۵ abcd	۹۸۳±۱۲۵ b	۹۵۵±۱۳۵ c	۹۹۸±۳۷۴ d	۱۱۳۵±۷۰ abcd
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	۴۷۲±۷۰ abcd	۸۷۵±۱۰۷ b	۸۹۸±۱۰۸ c	۹۶۵±۷۹ d	۱۰۷۷±۴۲ abcd
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	۴۷۰±۸۵ abc	۷۱۵±۶۴ abc	۸۰۱±۱۰۳ b	۸۸۸±۴۲ c	۱۰۱۲±۳۱ abc

جدول ۲. میانگین فعالیت لیزوزیم سرم (± انحراف معیار) (U/min) در تیمارهای مختلف. حروف یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.

روزهای نمونه برداری			تیمارهای مختلف		
	LV۰	LV۱۰۰	LV۲۵۰	LV۵۰۰	LV۱۰۰۰
روز صفر	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸
روز ۱۵	۶۸۸±۸۱	۷۱۳±۱۱۰	۸۲۹±۳۱	۶۹۴±۹۱	۶۹۲±۳۴
روز ۳۰	۶۳۸±۲۴	۷۰۳±۹۶	۶۵۴±۹۹	۸۹۳±۴۲	۷۱۵±۶۶
روز ۴۵	۶۶۰±۱۱۰	۶۳۷±۱۳۳	۷۰۴±۵۴	۷۸۷±۱۶۴	۶۷۲±۶۷
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	۶۶۳±۳۸ abc	۸۳۰±۶۷ a	۷۶۳±۳۹	۸۱۸±۶۲ b	۸۴۰±۴۴ c
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	۶۱۷±۱۱۰ a	۵۵۶±۱۶ b	۶۱۷±۷۱ c	۷۵۷±۶۸ ab	۷۶۱±۵۷ ac

تام سـرم از روش Siwicki و همکاران استفاده شـد (۳۰). اساس کار بر روش رنگ سـنجی برادفورد (۴) استوار بوده که میزان جذب نوری محلول Coomassie Brilliant Blue G-۲۵۰ (به عنوان ماده رنگ پذیر) هنگام اتصال با پروتئین‌های سـرم در طول موج ۵۹۵ nm برای محاسـبه میزان پروتئین‌ها بـه کار می‌رود. در این روش محلول اسـتاندارد از غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ µg آلبومین سـرم گاوی (Bovine Serum Albumin) استفاده گردید.

تنش‌های تراکم: در پایان روز ۴۵ تحقیق برای ارزیابی اثر لوامیزول بر افزایش قدرت دفاعی ماهیان در برابر شرایط تنشی تراکم زیاد، تمام ماهیان هر تیمار در دو حوضچه به صورت جداگانه یکی با تراکم دو و دیگری با تراکم سه برابر حالت دوره پرورشی قبلی تقسیم گردیدند. در حوضچه‌های تنشی تغذیه ماهیان همه تیمارها فقط با غذای کنسانتره مورد نظر (بدون افزودن لوامیزول) تا روز ۶۰ ادامه یافت. در روز اول شروع تنش ابتدا در هر ۳ ساعت یکبار و در روزهای بعد به صورت روزانه تلفات ماهیان شمارش و ثبت گردید.

آنالیـز آماری: در این تحقیق جهت تحلیل آمـاری داده‌ها از نرم افزار SPSS ۱۵ و آزمون t-Test استفاده گردید و جداول و نمودارها به ترتیب با نرم افزارهای Microsoft Word ۲۰۰۳ و Microsoft Excel ۲۰۰۳ ترسیم گردیدند.

نتایج

همان گونه که در جدول ۱ نشـان داده شـده اسـت در کلیه تیمارها، کمترین میزان فعالیت عامل مکمل متعلق به روز اول آزمایش می‌باشد و در روز ۶۰ (پایان آزمایش) بیشترین میزان فعالیت عامل مکمل در تنش تراکم ۲ برابر و در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ مشاهده می‌شود که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) نشان می‌دهد.

در روز ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میانگین‌هـای فعالیـت لیزوزیم اختلاف آماری با یکدیگر ندارند. اما در روز ۶۰ بیشـترین میانگین فعالیت لیزوزیم در تراکم ۲ برابر و در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ می‌باشـد که با کمترین میانگین فعالیت لیزوزیم که در تیمار شـاهد مشـاهده می‌شـود تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهـد. همچنیـن در روز ۶۰ بـا تنش تراکم ۳ برابر بیشـترین میانگین فعالیت لیزوزیم در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ دیده شده که با تیمار شاهد و تیمار لوامیزول ۲۵۰ تفاوت معنی‌دار دارد (جدول ۲).

طبق جدول ۳ در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ در تیمارهای مختلف لوامیزول اختلافی بین میانگین‌های مقادیر ایمونوگلوبولین دیده نمی شود. اما در روز ۶۰ با تنش تراکم ۲ برابر بیشـترین میانگین ایمونوگلوبولین کل در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ و کمترین مقدار نیز در تیمار شاهد مشاهده می‌شود و همین روند در روز ۶۰ با تنش تراکم ۳ برابر نیز ادامه دارد.

درصـد بقای تیمارهای مختلـف طی دوره تحقیق و پـس از اعمال تنش‌های تراکم ۲ و ۳ برابر در جدول ۴ نشـان داده شده است. همان گونه که در این نمودار نشان داده شده بیشترین درصد بقا متعلق به تیمار لوامیزول ۱۰۰۰mg/kg غذا می‌باشد.

بحث

امروزه در بسـیاری از کشورها استفاده از محرک‌های ایمنی به منظور

جدول ۳. میانگین مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم (± انحراف معیار) (mg/ml) در تیمارهای مختلف. حروف یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.

روزهای نمونه برداری	تیمارهای مختلف				
	LV۰	LV۱۰۰	LV۲۵۰	LV۵۰۰	LV۱۰۰۰
روز صفر	۳/۱۶±۰/۵۷	۳/۱۶±۰/۵۷	۳/۱۶±۰/۵۷	۳/۱۶±۰/۵۷	۳/۱۶±۰/۵۷
روز ۱۵	۲/۸۷±۰/۱۲	۳/۲۰±۰/۵۳	۳/۶۷±۰/۷۶	۳/۳۳±۰/۴۲	۳/۳۳±۰/۲۳
روز ۳۰	۲/۷۳±۰/۲۳	۳/۱۳±۰/۶۱	۳/۲۰±۰/۵۳	۳/۸۷±۰/۹۵	۳/۶۷±۰/۲۳
روز ۴۵	۳/۲۰±۰/۵۳	۳/۶۰±۱/۰۰	۳/۱۳±۰/۸۱	۳/۶۷±۰/۶۴	۲/۶۰±۱/۵۶
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	۳/۲۳±۰/۱۲ [abcd]	۴/۰۶±۰/۲۰ [a]	۴/۰۳±۰/۳۱ [b]	۴/۰۵±۰/۴۰ [c]	۴/۰۷±۰/۳۱ [d]
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	۳/۰۲±۰/۶۱ [a]	۳/۲۱±۰/۱۲	۳/۴۰±۱/۰۶	۳/۷۵±۰/۴۲	۳/۸۱±۰/۶۰ [a]

جدول ۴. میانگین تغییرات درصد بقا در تیمارهای مختلف طی دوره تحقیق.

زمان محاسبه درصد بقا	تیمارهای مختلف				
	LV۰	LV۱۰۰	LV۲۵۰	LV۵۰۰	LV۱۰۰۰
روز ۱۵	۹۸	۹۹/۵	۹۹	۹۹	۹۹/۸
روز ۳۰	۹۷/۸	۹۹/۵	۹۸	۹۹	۹۹/۵
روز ۴۵	۹۷/۸	۹۹	۹۸	۹۸/۵	۹۹/۵
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	۹۵	۹۸/۵	۹۶/۵	۹۸	۹۹/۵
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	۹۲/۵	۹۸/۵	۹۴/۵	۹۷	۹۹

تقویت سیستم ایمنی ماهیان پرورشی امری معمول می‌باشد و در این بین از محرک‌های ایمنی مختلفی استفاده می‌گردد که از میان آن‌ها لوامیزول نقش بسزایی در ارتقای سیستم ایمنی آبزیان دارد، به طوری که مطالعات صورت گرفته در این زمینه بیانگر تأثیر این ماده در تقویت پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی از جمله افزایش سلول‌های سفید خون، افزایش فعالیت بیگانه خواری سلول‌های سفید خون از جمله ماکروفاژها، افزایش فعالیت و همچنین مقدار آنزیم لیزوزیم و میزان آنتی بادی‌ها در سرم خون ماهیان می‌باشند (۱۵).

مطالات انجام شده تأثیرات محرک ایمنی لوامیزول را بر ارتقای پاسخ‌های ایمنی در گونه‌های مختلفی از ماهیان نشان داده اند. در این تحقیقات لوامیزول با شیوه‌های مختلفی از جمله به صورت تزریقی، غوطه وری، خوراکی و به همراه مواد محرک ایمنی دیگر از جمله واکسن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶). در این تحقیق هم تأثیر لوامیزول به صورت خوراکی جهت بررسی تأثیر آن بر پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفته است.

از آنجایی که شرایط زیست محیطی، مدت زمان، شرایط تغذیه‌ای، تفاوت‌های فردی و گونه‌ای بر فعالیت عامل مکمل مؤثر می‌باشند (۲۵)، این موضوع می‌تواند باعث تفاوت در نتایج بدست آمده در تحقیقات محققین مختلف گردد به گونه‌ای که در تحقیق پیش رو در کلیه روزهای نمونه برداری، افزایش غلظت لوامیزول به ۱۰۰۰mg سبب افزایش فعالیت عامل مکمل گردیده (جدول۱) در حالیکه در تحقیق دیگری که توسط Yousefian و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفته فعالیت عامل مکمل سرم کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از تجویز خوراکی مقدار ۴۰mg لوامیزول در هر کیلوگرم جیره غذایی در دوره ۳۰ روزه بین تیمارهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداده است، در حالیکه در دوره ۶۰ روزه مقادیر بالای فعالیت عامل مکمل مشاهده گردیده است (۳۳).

یکی از مهمترین اثرات محرک‌های ایمنی افزایش فعالیت لیزوزیم سرم است (۱۱،۱۸) به طوری که محققان مختلفی تأثیر محرک‌های ایمنی مختلف بر فعالیت لیزوزیم سرم را در گونه‌های متفاوتی از آبزیان گزارش نموده اند (۱،۵،۹،۱۲).

در تحقیق پیش رو هم نتایج بیانگر معنی‌دار بودن تأثیر محرک ایمنی لوامیزول بر افزایش فعالیت عامل مکمل، فعالیت لیزوزیم و غلظت ایمونوگلبولین تام سرم در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد و این تأثیر خصوصا در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ mg/kg غذا در گونه یاد شده مشاهده گردیده است. در تحقیقات دیگر محققین تأثیر لوامیزول بر ارتقای شاخص‌های اندازه‌گیری شده در این تحقیق را در گونه‌های دیگر هم گزارش کرده اند. Maqsood و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی تأثیر مقادیر مختلف لوامیزول بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی خون از جمله پروتئین تام سرم، آلبومین و گلوبولین سرم و میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، تأثیر قابل ملاحظه و معنی‌دار مقدار ۲۵۰ mg لوامیزول در کیلوگرم غذا را بر ارتقای این شاخص‌ها نشان داده اند (۲۳). همچنین Wijendra و Pathiratne در سال ۲۰۰۷ هم تأثیر معنی‌دار لوامیزول بر ارتقای شاخص‌های ایمنی خونی نظیر فعالیت بیگانه خواری سلول‌های بیگانه خوار خون و نیز فعالیت لیزوزیم پلاسما در کپور هندی (Labeo rohita) را گزارش نمود ه اند (۳۲).

نتایج بدست آمده از تحقیق حاظر حاکی از آن است که فعالیت عامل مکمل، فعالیت لیزوزیم و غلظت ایمونوگلوبولین در ماهیان ۵۰ گرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزایش تنش تراکم از ۲ برابر به ۳ برابر در کلیه تیمارهای لوامیزول، کاهش نشان می‌دهد هرچند در مواردی این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نیست (جداول۱،۲،۳) و تنها در تیمارهای تنش تراکم ۲ و ۳ برابر است که افزایش غلظت لوامیزول به ۱۰۰۰ mg سبب افزایش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم می‌گردد (جدول۲). بطور کلی در شرایط تنش‌زا میزان فعالیت لیزوزیم در ماهیان بیشتر از سایر مهره داران عالی می‌باشد (۲۰).

محرک‌هـای ایمنی با افزایش فعالیت سیسـتم عامـل مکمل خون (۱۱)، افزایش فعالیت لیزوزیم سرم (۱۱،۱۷)، تولید آنتی بادی بیشتر توسط لنفوسـیت‌های خون (۷،۲۱) باعث افزایش بقـا و مقاومت ماهیان در برابر تنش‌هایی نظیر تراکم، دما و شوری و آلودگی‌های باکتریایی (۲۲) شده و در تولید نهایی مزارع پرورش آبزیان نقش بسزایی دارند. در این تحقیق هم نقش محرک ایمنی لوامیزول مبنی بر بهبود پاسخ‌های ایمنی و بالا بردن میزان بقا و مقاومت آبزیان در برابر تنش‌ها در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسـی قرار گرفت و مشاهده گردید این ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان را در برابر تنش‌های تراکم مقاوم تر نموده و بقای بیشتر آنرا نسبت به گروه شـاهد باعث می‌شـود (جدول ۴). اما در عین حـال برخی مطالعات انجام شده روی لوامیزول نشان از عدم تأثیر این ماده در تقویت برخی پاسخ‌های سیستم ایمنی ماهیان دارد. Wijendra و Pathiratne در سال ۲۰۰۷ با بررسی تأثیر لوامیزول روی پاسخ‌های ایمنی لاروهای کپور هندی (Labeo rohita) گـزارش کردند که این ماده تأثیر معنی‌داری در افزایش پروتئین کل و میزان ایمونوگلبولین پلاسـمای خون این ماهی ندارد (۳۲). بنابراین گونه آبزی مورد مطالعه در میزان عملکرد محرک‌های ایمنی، نقش آن‌ها بر سیستم ایمنی آبزیان و میزان بقای آن‌ها در برابر تنش‌های مختلف مؤثر می‌باشد.

با توجه به ارزیابی مقاومت ماهیان نسبت به تنش تراکم و درصد بقای آن‌ها (جدول ۴) که نشـان‌دهنده غلظت بـالای لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و فعالیـت عامل مکمل در گروه‌های تغذیه شـده با لوامیـزول بویژه تیمار ۱۰۰۰mg غذا نسبت به گروه شاهد می‌باشد، استفاده از لوامیزول حداکثر با غلظت ۰/۱٪ جیره غذایی می‌تواند باعث تقویت پاسـخ‌های ایمنی و بالا بردن درصد بقا و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در برابر تنش تراکم زیاد گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در تاریـخ ۱۳۹۱/۴/۲۴ و با کد ۰۱۱/آ/۸۶ و حمایت مالی پژوهشـکده آرتمیا و آبـزی پروری و از محل اعتبارات پژوهشـی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه اجرا گردیده است.

References

1. Ai, Q., Mai, K., Zhang, Xu, W., Duan, Q., Tan, B., Liufu, Z. (2004) Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, Lateolabrax japonicas. Aquaculture. 242: 489-500.
2. Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. Watanabe, T. (2000) Effect of dietary beta-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Sci. 66: 1068-1075.
3. Boesen, J., Maganga, F.P., Odgaard, R. (1999) Norms, organizations and actual practices in relation to land and water management in Ruaha River Basin, Tanzania. In: Managing the Globalized Environment. Granfelt, T. (ed.). (1st ed.) Intermediate Technology Publlications. England, London. p. 98-128.
4. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann Clin Biochem. 72: 248-254.
5. Cha, S., Lee, J., Song, C., Lee, K., Jeon, Y. (2008) Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder، Paralichthys olivaceus. Aquaculture. 278: 110-118.
6. Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K., Vuddhakul, V. (2007) Comparing the efficiency with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. Food Control. 18: 1031-1035.
7. Chen, D., Ainsworth, A.J. (1992) Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafineque. J Fish Dis. 15: 295-304.
8. Clerton, P., Troutaud, D., Verlha, V., Gabraudan, J., Deschaux, P. (2001) Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish Shellfish Immunol. 11: 1-13.
9. Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S., Vernet, G. (2004) Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by Ptychobothrium sp. (Cestoda). Aquat Toxicol. 64: 325-338.
10. Dugenci, K.S., Arda, N., Canadan, A. (2003) Some medicinal plants as immunostimulants for fish. J Ethnopharmacol. 88: 99-106.
11. Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E. (1992) Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol. 2: 287-297.

12. Gopalakannan, A., Arul, V. (2006) Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of Aeromonas hydrophila infection in ponds. Aquaculture. 255: 179-187.
13. Haq, A., Lobo, P., Al-Tufail, M., Rama, N., AL-Sedair, Y.S. (1999) Immunomodulatory effect of Nigella sativa proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol. 21: 283-295.
14. Hardy, R.W. (2002) Rainbow Trout, *Oncorrhynchus mykiss*. In: Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. Carl, D., Webster, Lim, C. (eds.). (1st ed.) CABI publishing. London, England. p. 184-202.
15. Ispir, U., Dorucu, M. (2005) A study on the effects of Levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk J Vet Anim Sci. 29: 1169-1176.
16. Ispir, U., Yonar, M.E. (2007) effects of Levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Acta Vet Brno. 76: 493-497.
17. Jorgensen, J.B., Lunde, H., Robertsen, B. (1993) Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis. 16: 313-325.
18. Jorgensen, J.B., Lunde, H.B. (1993) Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon، *Salmo salar* L. J Fish Dis. 16: 313-325.
19. Kakuta, I., Kurokura, H. (1995) Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against Cryptocaryon irritans infection of red sea bream. Fish Pathol. 30: 289-290.
20. Kim, D.H., Austin, B. (2006) Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. Fish Shellfish Immunol. 21: 513-524.
21. Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D.P., Dixon, O. W., Blanch, A. (1987) Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. J Fish Biol. 31: 87-91.
22. Kitao, T.,Yoshida, T. (1986) Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Vet Immunol Immunopathol. 12: 287-291.
23. Maqsood, S., Samoon, M.H., Singh, P. (2009) Immunomudiolatory and growth promoting effect of dietary Levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. Turkish J Fish Aquat Sci. 9: 111-120.
24. Meshkini, S., Tafy, A.A., Tokmechi, A., Farhangpajou, F. (2012) Effect of Chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet Res Forum. 3: 49-54.
25. Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., End, M. (2006) Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium Lactobacillus rhamnosus against experimental Edwardsiella tarda infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Vet Immunol Immunopathol. 113: 339-347.
26. Raa, R., Rørstad, G., Engstad, R., Robertsen, B. (1992) The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (eds). (1st ed.) Manila, Philippines. p. 39-50.
27. Roberts, R.J. (2001) The immunology of teleost. In: Fish pathology. Roberts, R.J. (ed.). (1st ed.) Vol. 1: W. B. Saunders. London, England. p. 133-150.
28. Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.
29. Salah, A., Osama, A.A., Amina, M., Hala, G. (2011) Efficiency of Levamisole in improving the immune response of catfish (*Clarias Gariepenus*) to Aeromonas hydrophila vaccine: clinicopathological studies. Mediterranean Aquaculture J. 4: 18-26.
30. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. (1994) Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet Immunol Immunopathol. 41: 125-139.
31. Symoens, I., Rosenthall, M. (1977) Levamisole

in the modulation of the immune responses. The current experimental and clinical state. J Reticuloendothel Soc. 21: 175-221.

32. Wijendra, G., Pathiratne, A. (2007) Evaluation of immune responses in Indian carp, labeo rohito (Hamilton) fed with Levamisole incorporated diet. J Sci Uni Kelaniya. 3: 17-28.
33. Yousefian, M., Hedayatifard, M., Sadeghifar, H. (2009) Evaluation of Zeolite effect on immune and enzymatic factors of common carp (*Cyprinus carpio*). J Shilat. 3: 1-10.

Effects of levamisole on immune responses and resistance against density stress in rainbow trout fingerling (*Oncorhynchus mykiss*)

Meshkini, S.[1*], Delirezh, N.[2], Tafi, A.A.[3]

[1]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine and Artemia and Aquatic Animals Institute, Urmia University, Urmia, Iran*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran*

[3]*Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran*

(Received 14 November 2016, Accepted 31 December 2016)

Abstract:

BACKGROUND: It is necessary to potentiate the immune system of fishes against stresses in farms. **OBJECTIVES:** This study was carried out to address the potential effect of Levamisole on immune system of rainbow trout against density stress. **METHODS:** 1500 fish (average weight of 50 g) were divided into 5 test groups, in which each test group was repeated three times with average density of 33 kg/m^3. They were fed with commercial diet supplemented with Levamisole at concentrations of 0 (control), 100, 250, 500 and 1000 mg / kg for a period of 45 days. The fishes of all groups were then fed with Levamisole free diet and exposed to 2 and 3-fold density stress for the following 15 days. Blood samples were collected on days 0, 15, 30, 45 and 60 to evaluate the serum compliment and lysozyme activity as well as total immunoglobulins. **RESULTS:** The results showed that all used concentrations of Levamisole just had significant effect on compliment activity after 45 days feeding period ($p<0.05$). Higher levels of lysozyme and complement activity as well as total immunoglobulin were observed in 1000 mg/kg Levamisole treated group when exposed to density stresses 2 and 3-fold at the end of trial (day 60) ($p<0.05$). The highest overall survival was found in group which was treated with 1000 mg/kg of Levamisole. **CONCLUSIONS:** Our results revealed that using 0/1% Levamisole as an immunostimulator in commercial diet could potentiate rainbow trout against outbreak of high density stresses and increase its overall survival.

Keyword: rainbow trout, levamisole, immune responses, density stress

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Complement activity of serum (mean±SD) (U/ml) in different treatments. The same superscript alphabets in the same raw are significantly different at $p<0.05$.

Table 2. Lysozyme activity of serum (mean±SD) (U/min) in different treatments. The same superscript alphabets in the same raw are significantly different at $p<0.05$.

Table 3. Amount of total immunoglobulin of serum (mean±SD) (mg/ml) in different treatments. The same superscript alphabets in the same raw are significantly different at $p<0.05$.

Table 4. Mean survival of different treatments in trial period.

***Corresponding author's email: s.meshkiniy@ gmail.com, Tel: 0441-3440295, Fax: 0441-3467097**