مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۳، ۲۴۱-۲۳۵

اثر هیدروکلراید لوامیزول آشامیدنی بر پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال در جوجه های گوشتی

محمد روستائی علی مهر[1*] محمود حقیقیان رودسری[1] بهاره منصوری[1] غلامرضا نیکبخت بروجنی[2]

۱) گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت-ایران.

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱۶ بهمن ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۲۳ خرداد ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: در این مطالعه پاسخ‌های سلولی و هومورال سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی در هنگام مصرف مداوم لوامیزول خوراکی بررسی شد. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه، تعیین بهتر مقدار لوامیزول آشامیدنی برای تحریک سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی بود. **روش کار:** این آزمایش با استفاده از ۲۵۰ قطعه جوجه گوشتی (نر و ماده) یک‌روزه از سویه راس با میانگین وزن ۴۰/۲g انجام شد. اثر مقادیر صفر (شاهد L)، ۳/۵ ($L_{۳/۵}$)، ۷ ($L_{۷}$)، ۱۴ ($L_{۱۴}$) و ۲۸ ($L_{۲۸}$) mg/L لوامیزول آب آشامیدنی به‌طور مداوم از روز ۵ تا ۲۵ در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمایش فاکتوریل در ۵ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی به‌کمک تزریق داخل پوستی فیتوهماگلوتینین (PHA-P) در چین پوستی بال (روز پانزدهم) و اندازه‌گیری ضخامت پوست بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. اندازه‌گیری پاسخ‌های ایمنی هومورال با استفاده از تزریق عضلانی محلول ۲۵٪ گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در روزهای ۷ و ۲۱ پرورش و تعیین تیتر آنتی‌بادی IgG علیه گلبول قرمز گوسفند در روزهای ۷، ۱۴، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ پرورش از طریق آزمایش آگلوتیناسیون انجام شد. **نتایج:** پاسخ‌های ایمنی سلولی به P در تیمارهای $L_{۷}$ و $L_{۱۴}$ (به‌ترتیب ۰/۲۷۲ و ۰/۲۰۵) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر لوامیزول قرار گرفت ($p<۰/۰۵$). تیتر آنتی‌بادی علیه SRBC در تیمار $L_{۱۴}$ (۶/۱۶) به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). مصرف مداوم و مقادیر مختلف لوامیزول تأثیری بر صفات لاشه جوجه‌های گوشتی نداشت ($p>۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** استفاده از لوامیزول آشامیدنی به‌طور مداوم در مقادیر کم (تا 14mg/L) موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال جوجه‌های گوشتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لوامیزول، سیستم ایمنی، جوجه گوشتی.

مقدمه

رعایت اصول بهداشت در پرورش طیور صنعتی به منظور استفاده بهینه از خوراک و بهبود ضریب تبدیل، عامل مهمی در موفقیت تولید محسوب می‌شود. راهکار اساسی جهت بهبود راندمان صنعت طیور همانا ممانعت از ورود و جابجایی عوامل عفونی است. در شرایطی که مؤسسات و عوامل تهیه و توزیع مواد اولیه خوراک طیور ملزم به رعایت اصول ایمنی زیستی (Biosecurity) نیستند، مدیریت بهداشتی مزارع پرورش طیور در جهت ممانعت از ورود عوامل عفونی کاری سخت و در بعضی موارد غیر ممکن است. بهترین راهکار برای کم کردن بروز خسارات ناشی از عوامل عفونی در چنین شرایطی ارتقای سیستم ایمنی طیور است به گونه‌ای که سیستم ایمنی طیور در صورت ورود عوامل عفونی آماده پاسخ سریع باشد. مصرف داروهای محرک سیستم ایمنی از جمله لوامیزول بصورت کوتاه مدت و همزمان با مصرف واکسن، روش مناسبی جهت بهبود حفاظت ایجاد شده توسط واکسن‌ها در طیور گوشتی است (۱۱،۲۷).

سال‌ها است که در پزشکی مصرف مستمر داورهای محرک ایمنی به منظور درمان بیماری‌های ناشی از نقص ایمنی مرسوم شده است (۱۶). در این ارتباط لوامیزول از جمله داروهایی است که در مقادیر کم اثر تحریکی مناسب بر سیستم ایمنی دارد و در درمان نقص ایمنی و افراد مبتلا به سندرم اکتسابی نقص ایمنی (Human immunodeficiency virus) HIV مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰،۱۳). لوامیزول جزء خانواده بنزامیدازول‌ها به نام ۲، ۳، ۵، ۶، تتراهیدرو ۶ فنیل ایمیدازول ۱ و ۲ تیازول با وزن مولکولی ۲۴۰kda است که در پرورش دام و طیور بطور وسیع بعنوان داروی ضد انگل استفاده می‌شود (۱۹). در هنگام مصرف طولانی مدت داروها در طیور گوشتی همیشه این نگرانی وجود دارد که احتمال باقیماندن دارو در لاشه مورد استفاده انسان افزایش یابد. به دو دلیل مصرف بلند مدت لوامیزول به منظور تحریک ایمنی در طیور گوشتی قابل توجیه است. اول اینکه مشخص شده است که مقدار باقیمانده لوامیزول در لاشه طیوری که مقدار ۴۰mg لوامیزول را بعنوان داروی ضد انگل مصرف کرده بودند، بعد از گذشت ۱۸ روز به صفر می‌رسد (۷). بنابراین در صورتیکه بین حذف دارو و کشتار ۱۸ روز فاصله وجود داشته باشد بقایای لوامیزول از لاشه حذف می‌شود. دلیل دوم اینکه مقادیر مورد استفاده برای تحریک سیستم ایمنی بسیار کمتر از مقادیر مورد استفاده برای درمان انگلی است (۱۹،۲۱). بنابراین کاربرد بلند مدت مقادیر کم لوامیزول تا ۱۸ روز قبل از

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۰۲۸۲-۰۱۳۱، نمابر: ۶۶۹۰۲۸۱-۰۱۳۱ Email: roostaei@guilan.ac.ir

کشتار بلامانع است. اگرچه مطالعاتی در خصوص اثر لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی انجام شده است ولی اثر مصرف مداوم این دارو بر سیستم ایمنی طیور مورد مطالعه قرار نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر مصرف مداوم لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی طیور است.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر در واحد مرغداری دانشگاه گیلان انجام شد. متوسط ارتفاع ایستگاه مزبور از سطح دریا ۱۰m، دارای آب و هوای مرطوب و متوسط درجه حرارت در این منطقه $15/8^{o}C$ است. سالن پرورش دارای ۱۲m عرض، ۲۵m طول و ۳m ارتفاع در وسط و در کناره‌ها ۲/۵m بود. داخل سالن با استفاده از قفس‌هایی به طول ۱/۶، عرض ۰/۸ و ارتفاع ۱m به ۲۵ بخش، تقسیم شد. این مطالعه با استفاده از ۲۵۰ جوجه‌های گوشتی با میانگین وزنی ۴۰/۲g، بطور مخلوط از هر دو جنس از سویه تجاری راس انجام شد. از زمان ورود جوجه‌ها به مدت ۱۲ ساعت، محلول آب و شکر با غلظت ۵٪ به همراه پودر مولتی ویتامین + الکترولیت (داملران، ایران) به نسبت ۱ در هزار استفاده شد. جوجه‌ها به مدت پنج روز بصورت جمعی با جیره پیش‌دان تغذیه شدند و در روز پنجم وزن کشی شده و تعداد ۱۰ قطعه جوجه گوشتی با میانگین وزن ۷۴g در قفس‌ها قرار داده شدند. نوردهی بصورت ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت خاموشی در یک دوره ۲۴ ساعته صورت گرفت. دما در روز اول $32^{o}C$ بود و با کاهش $2^{o}C$ در هفته به $21^{o}C$ تا آخر دوره پرورش رسید.

جیره آغازین از ۵ تا ۲۱ روزگی و جیره رشد از ۲۲ تا ۴۲ روزگی تهیه و در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. مواد مغذی جیره‌ها بطور یکسان و بر اساس توصیه NRC (۱۸) بود. اجزا و ترکیب شیمیایی جیره‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. در طول دوره پرورش، جوجه‌ها به آب و خوراک دسترسی مداوم داشتند. پودر لوامیزول (داملران، ایران) در آب آشامیدنی بطور مداوم از روز پنجم تا ۲۵ در اختیار جوجه‌ها قرار داده شد. تیمارها شامل: جیره شاهد بدون لوامیزول در لیتر آب (L_0)، جیره شاهد + ۳/۵mg لوامیزول در لیتر آب ($L_{3/5}$)، جیره شاهد + ۷mg لوامیزول در لیتر آب (L_7)، جیره شاهد + ۱۴mg لوامیزول در لیتر آب (L_{14}) و جیره شاهد + ۲۸mg لوامیزول در لیتر آب (L_{28}) بوده است.

بمنظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی در روز ۱۵ پرورش، از هر تیمار ۱۵ قطعه جوجه انتخاب و بعد از شماره‌گذاری ۰/۲ml از محلول PHA-P (Sigma, USA) با غلظت ۱ mg/ml و ۰/۲ml از بافر فسفات بترتیب به چین پوستی بال چپ و بال راست بصورت داخل پوستی تزریق شد و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت، ضخامت پوست بوسیله کولیس اندازه گیری شد. اختلاف در ضخامت ایجاد شده نشان دهنده شاخص تحریک است (۲۶).

ضخامت محل تزریق PBS- ضخامت محل تزریق PHA-P= شاخص تحریک.

برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال از تزریق گلبول قرمز گوسفند و تعیین تیتر آنتی بادی IgG علیه گلبول قرمز گوسفند و انجام آزمایش آگلوتیناسیون استفاده شد. خون گوسفند به میزان ۵۰ml بوسیله سرنگ حاوی ۳ml محلول ۳٪ اتیلین دی آمین تترا استیک اسید (Sigma, USA) در بافر کلرید سدیم ۰/۷٪، از ورید وداج تهیه شد. نمونه خون در آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰rpm دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و بخش مایع آن حذف و هم حجم رسوب باقی مانده بافر فسفات به نمونه خون اضافه شد و جهت شستشوی بیشتر گلبول‌های قرمز تمام مراحل فوق سه بار تکرار شد. میزان ۰/۱ml از محلول ۲۵٪ گلبول قرمز در بافر فسفات در روزهای ۷ و ۲۱ دوره پرورش به عضله سینه تمام جوجه‌ها تزریق شد.

به‌منظور تعیین تیتر آنتی بادی علیه گلبول قرمز در روزهای ۷، ۱۴، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ از سه قطعه جوجه گوشتی در هر تیمار از ورید بال با سرنگ حاوی EDTA خونگیری شد. نمونه‌های خون در آزمایشگاه بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های بدست آمده تا انجام آزمایش آگلوتیناسیون در فریزر $-20^{o}C$ نگهداری شدند. برای آزمایش آگلوتیناسیون نمونه‌ها بعد از یخ گشایی برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای $56^{o}C$ قرار داده شدند. سپس میزان ۱/۴٪ از محلول ۲- مرکاپتواتانول (Sigma, USA) به نمونه‌ها اضافه شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای $37^{o}C$ قرار داده شدند و بر اساس روش Schrank و همکاران در سال ۱۹۹۹ آزمایش آگلوتیناسیون انجام شد. تیتر آنتی بادی IgG بدست آمده علیه گلبول قرمز بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ گزارش شد (۲۵).

در پایان دوره از هر واحد آزمایشی یک قطعه جوجه که وزن آن تقریباً نزدیک به میانگین وزن جوجه‌های همان قفس بوده، انتخاب و بعد از سه ساعت گرسنگی و شماره‌گذاری پا و ثبت وزن زنده، جوجه‌ها ذبح و بلافاصله پرکنی شدند. در مرحله بعد ابتدا پاها از محل اتصال استخوان کف پا به درشت نی، از ناحیه مفصل خرگوشی قطع و در نهایت شاخص‌های مورد نظر شامل درصدهای وزنی لاشه (لاشه بدون امعاء و احشا)، چربی حفره بطنی، ران، سینه، کبد و سنگدان، با ترازو با دقت ۰/۱g اندازه‌گیری شدند.

داده‌های مربوط به آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه شد. بمنظور بررسی اثر مصرف مداوم لوامیزول بر صفات لاشه از طرح کاملاً تصادفی و برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی از آزمایش فاکتوریل (۲×۵) و برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال از آزمایش فاکتوریل (۴×۵) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار در هر تیمار استفاده شد. فاکتورها به ترتیب شامل ۵ سطح مختلف لوامیزول و زمان (۲۴ ساعت اول و ۲۴ ساعت دوم) و ۵ سطح مختلف لوامیزول و زمان‌های ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ بود. میانگین داده‌های تیمارهای آزمایشی با استفاده از آزمون LSD با یکدیگر مقایسه شدند.

مدل ریاضی، $Yij = \mu + Ti + eij$ برای تجزیه داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت که اجزاء آن شامل Yij = مقدار هر مشاهده در هر واحد آزمایشی، μ = میانگین جمعیت، Ti = اثر هر تیمار و eij = اثر خطای آزمایش بوده است.

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره‌های آغازین و رشد. مکمل معدنی: هر کیلوگرم مواد معدنی حاوی: منگنز (اکسید منگنز ۶۲٪) ۱۶g، آهن (سولفات آهن ۲۰٪) ۲۵g، روی (اکسید روی ۷۷٪) ۱۱g، مس. (سولفات مس ۲۵٪) ۴ g ، ید (کلسیم ۶۲٪) ۰/۱۶ گرم، سلنیوم (۱٪) ۲g. مکمل ویتامینی: هر کیلوگرم مواد ویتامینی حاوی ویتامین A(۵۰۰۰۰۰IU/g) ۱/۸g (۹۸/۵٪)، ویتامین B_1 (۹۸/۵٪) ۰/۱۸g، ویتامین B_2 (۹۸٪) ۱g، ویتامین B_6 (۹۸/۵٪) ۰/۳g، ویتامین B_{12} (۱٪) ۰/۱۵g، ویتامین D_3 (۵۰۰۰۰۰IU/g) ۰/۴g، ویتامین E(۵۰۰IU/g) ۳/۶g، ویتامین K_3 (۵۰٪) ۰/۴g، ویتامین B_9 (۸۰٪) ۰/۱۲۵g، ویتامین B_5 (۹۹٪) ۳g، ویتامین H_2 (۲٪) ۰/۵g. انرژی متابولیسمی: kcal ME/kg DM.

اجزای خوراک (٪)	دوره‌های پرورش		ترکیب شیمیایی	دوره‌های پرورش	
	دوره آغازین	دوره رشد		دوره آغازین	دوره رشد
ذرت	۵۸/۹۵	۶۷/۴۱	انرژی متابولیسمی (kcal/ME/kg DM)	۲۸۸۰	۲۸۸۰
کنجاله سویا	۳۵/۶۶	۲۷/۸۹	پروتئین(٪)	۲۰/۷۰	۱۸
چربی	۱/۲۲	۰	کلسیم(٪)	۰/۹۰	۰/۸۱
دی‌کلسیم فسفات	۱/۳۷	۰/۹۷	فسفر قابل دسترس(٪)	۰/۴۰	۰/۳۱
کربنات‌کلسیم	۱/۳۱	۱/۳۵	کلرین(٪)	۰/۲۶	۰/۱۵
دی ال متیونین	۰/۱۳	۰/۵	سدیم(٪)	۰/۱۷	۰/۱۵
لیزین	۰	۰	لیزین(٪)	۱/۱۱	۰/۹۲
مکمل معدنی	۰/۵	۰/۵	متیونین(٪)	۰/۴۵	۰/۳۴
مکمل ویتامینی	۰/۵	۰/۵			
نمک	۰/۳۷	۰/۳۱			
جمع	۱۰۰	۱۰۰			

جدول ۲ ـ اثرات سطوح مختلف و مصرف مداوم لوامیزول بر پاسخ‌های پوست بال به P-PHA در زمان‌های مختلف. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). تیمارها: L_0 ۰ mg/L لوامیزول آب آشانیدنی، $L_{۳/۵}$ =۳/۵ mg/L لوامیزول آب آشانیدنی، $L_۷$ =۷mg/L لوامیزول آب آشانیدنی، $L_{۱۴}$ =۱۴ mg/L لوامیزول آب آشانیدنی، $L_{۲۸}$ =۲۸mg/L لوامیزول آب آشانیدنی.

تیمارها	شاخص تحریک		
	بعد از ۲۴ ساعت (cm)	بعد از ۴۸ ساعت (cm)	از ۲۴ تا ۴۸ ساعت (cm)
L_0	۰/۰۶۷ ^{a}	۰/۰۶۷ ^{b}	۰/۰۶۷ ^{c}
$L_{۳/۵}$	۰/۱۰۹ ^{a}	۰/۰۷۷ ^{b}	۰/۰۹۳ ^{bc}
$L_۷$	۰/۰۹۷ ^{a}	۰/۲۷۲ ^{a}	۰/۱۵۱ ^{ab}
$L_{۱۴}$	۰/۰۹۲ ^{a}	۰/۲۰۵ ^{a}	۰/۱۸۲ ^{a}
$L_{۲۸}$	۰/۰۸۵ ^{a}	۰/۰۸۵ ^{b}	۰/۰۸۵ ^{bc}
SEM	۱/۱۷۵	۱/۲۵۰	۰/۰۲۴۷
زمان‌ها			
۲۴ ساعت اول	۰/۰۹۰۳ ^{b}	-	-
۲۴ ساعت دوم	۰/۱۴۱۵ ^{a}	-	-

از فرمول y=arcsin برای تبدیل داده‌هایی که به صورت نسبت یا درصد بیان می‌شوند استفاده شد.

نتایج

تاثیر سطوح مختلف لوامیزول در طی زمان بر شاخص تحریک پوست در جدول ۲ نشان داده شده است. مصرف لوامیزول با گذشت زمان، شاخص تحریک پوست را تحت تاثیر قرارداد (p<۰/۰۵). در ۲۴ ساعت اول تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵) ولی بعد از گذشت ۴۸ ساعت، شاخص تحریک پوست در تیمارهای حاوی ۷mg/L و ۱۴mg/L تحت تاثیر مصرف مداوم لوامیزول قرار گرفت. اثرات مصرف مداوم لوامیزول طی زمان بر شاخص تحریک پوست در تصویر ۱ نشان داده شده است. بیشترین اختلاف شاخص تحریک پوست نسبت به تیمار شاهد (بدون لوامیزول)، طی زمان در تیمارهای حاوی ۷mg/L و ۱۴mg/L مشاهده شد(p<۰/۰۵).

نتایج به دست آمده در خصوص میزان تیتر آنتی بادی علیه SRBC در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مصرف لوامیزول طی زمان بر تیتر آنتی بادی علیه SRBC مؤثر بود (p<۰/۰۵). بیشترین تیتر آنتی بادی IgG در روز ۳۵ پرورش مشاهده شد (p<۰/۰۵) ولی تیمار $L_{۱۴}$ و $L_{۲۸}$ مستقل از زمان واجد بیشترین تیتر آنتی بادی IgG علیه SRBC نسبت به تیمار شاهد بود. کمترین تیتر آنتی بادی IgG علیه SRBC در تیمار $L_{۳/۵}$ مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (p<۰/۰۵) ولی بین تیمارهای $L_۷$ و $L_{۲۸}$ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

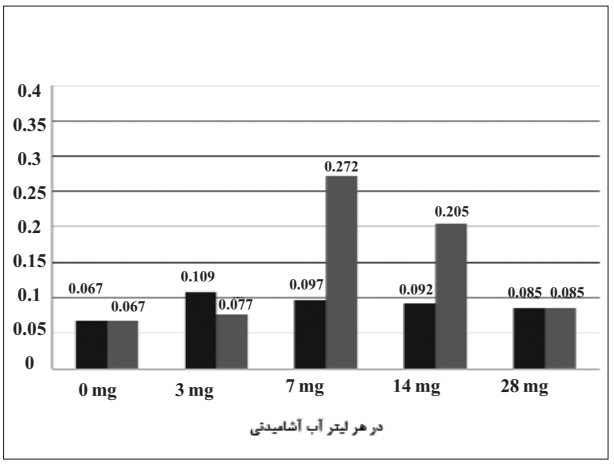
صفات لاشه: سطوح مختلف لوامیزول اثری بر بازده لاشه (نسبت وزن لاشه به وزن زنده) و درصد وزنی اجزای لاشه (سینه، ران، کبد، سنگدان، چربی محوطه بطنی، تیموس و بورس فابریسیوس و طحال) در پایان دوره نداشت (جدول ۴).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف مداوم ۷mg لوامیزول در لیتر آب آشامیدنی ($L_۷$) سبب افزایش پاسخ‌های سلولی به میتوژن فیتوهماگلوتینین می‌شود که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۱۷).

جدول ۳ ـ اثرات سطوح مختلف لوامیزول بر میانگین تیتر آنتی بادی IgG علیه SRBC در ۷، ۱۴، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ روز بعد از تزریق. SRBC. تیمارها: L_0 = ۰ mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، $L_{3.5}$ = ۳/۵mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، L_7 = ۷mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، L_{14} = ۱۴mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، L_{28} = ۲۸mg/L لوامیزول آب آشامیدنی.

تیمارها	تیتر آنتی بادی (نسبت)
L0	۵/۲۸ bc
$L_{3.5}$	۴/۸۲ c
L_7	۵/۴۴ bc
L_{14}	۶/۱۶ a
L_{28}	۵/۸۰ ab
SEM	۰/۵۰
زمان‌ها	
۲۱ day	۴/۱۳ c
۲۸ day	۵/۶۸ b
۳۵ day	۶/۵۲ a
۴۲ day	۵/۷۰ b



تصویر ۱- اثرات مصرف مداوم لوامیزول خوراکی در طی زمان بر میزان حساسیت پوستی به PHA-P بر حسب سانتیمتر. ۲۴ ساعت ■ ۴۸ ساعت ■

مصرف یکبار لوامیزول به مقدار ۷mg/kg به صورت خوراکی در گوساله‌ها موجب افزایش واکنش لنفوسیت‌های خون به PHA-P و کونکاناوالین شده است (۱۴). همچنین مشخص شده است که مصرف ۱۰mg و ۳۰mg لوامیزول در کیلوگرم بر اساس وزن زنده در طی دوره پرورش همراه با جیره غذایی جوجه‌های گوشتی منجر به افزایش پاسخ لنفوسیت‌های T به PHA-P می‌شود (۲۳). شواهد نشان داده است که تزریق فیتوهماگلوتینین در داخل پوست بتدریج سبب ادم، پر خونی، افزایش سلول‌های تک هسته‌ای و لمفوسیت‌ها تا ۴۸ ساعت می‌شود (۲) و لوامیزول قادر است تمامی این روندها را تحریک کند (۱۷). همچنین لوامیزول با افزایش گوانوزین منوفسفات حلقوی در لوکوسیت‌ها فعالیت رونوشت برداری از DNA را افزایش داده است و سبب تکثیر لوکوسیت‌ها و بهبود پاسخ‌های

جدول ۴- اثرات مصرف مداوم و سطوح مختلف لوامیزول خوراکی بر درصد وزنی صفات لاشه (٪). تیمارها: L_0 = ۰ mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، $L_{3.5}$ = ۳/۵mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، L_7 = ۷ mg/L لوامیزول آب آشامیدنی، L_{14} = ۱۴mg/L لوامیزول آب آشامیدنی.

صفات لاشه	تیمارها					SEM
	L0	L3.5	L7	L14	L28	
بازده لاشه	۵۸/۸۰	۶۰/۵۴	۶۱/۴۰	۵۹/۸۰	۵۹/۸۰	۰/۹۰
اجزاء لاشه						
سینه	۳۵/۰۰	۳۶/۸۰	۳۶/۶۰	۳۶/۰۰	۳۶/۲۰	۱/۰۱
ران	۴۲/۶۰	۴۱/۶۰	۴۱/۸۰	۴۲/۴۰	۴۱/۴۰	۰/۸۶
کبد	۴/۳۰	۴/۱۰	۳/۹۰	۴/۱۰	۴/۴۰	۱/۴۸
سنگدان	۳/۰۸	۲/۸۸	۲/۹۶	۲/۵۰	۳/۰۰	۱/۵۵
چربی محوطه بطنی	۱/۵۸	۱/۴۰	۲/۱۰	۱/۹۴	۱/۳۶	۲/۷۹
تیموس	۰/۹۴	۰/۹۸	۰/۸۴	۰/۹۰	۰/۸۸	۲/۳۷
بورس	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۱۳	۲/۱۲
طحال	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۲۲	۰/۲۷	۰/۲۳	۲/۳۴

ایمنی سلولی می‌شود (۸). لوامیزول در مقادیر کم، اثر میتوژنی بر لمفوسیت‌های T دارد (۱۵) و سبب افزایش بیان ۸۰ CD، ۸۳ CD و ۸۶ DC و تولید اینترلوکین ۱۲-(IL)، ۴۰ p و ۱۰-(IL) در سلول‌های دندریتی (سلول‌های عرضه‌کننده آنتی ژن) می‌شود. همچنین سلول‌های دندریتی تحت تاثیر لوامیزول سبب فعال‌سازی لمفوسیت‌های T جهت تولید لمفوسیت‌های T کمکی و تولید اینترفرون گاما می‌شود (۵). لوامیزول در مقادیر پایین موجب تشدید پاسخ سلولی سیستم ایمنی شده بطوری که مصرف آن به صورت خوراکی سبب افزایش تعداد سلول‌های T و نسبت سلول‌های CD۴/CD۸ شده است (۱۳).

همانطورکه نتایج نشان داد، افزایش مقدار مصرف لوامیزول تا ۱۴mg/L آب آشامیدنی سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی به تزریق PHA-P شد. ولی با افزایش مصرف لوامیزول تا ۲۸mg/L آب آشامیدنی پاسخ‌های ایمنی سلولی مجدداً کاهش یافت. مطالعات نشان داد که مقادیر زیاد لوامیزول اثرات بازدارنده بر ایمنی دارد (۲۴). بنابراین اثر لوامیزول بر تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی وابسته به مقدار مصرف بوده و مصرف ۷mg و ۱۴ لوامیزول در لیتر آب آشامیدنی بصورت مستمر بهترین نتیجه را بر پاسخ‌های ایمنی داشته است.

نتایج این تحقیق نشان داد که تیتر آنتی بادی IgG علیه گلبول قرمز گوسفندی تحت تأثیر سطوح مختلف لوامیزول گرفت. مطالعات انجام شده در گونه‌های مختلف نشان داده است که اثر لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی هومورال با نتایج متناقضی همراه بوده است. مصرف ۶mg لوامیزول در گاوهایی که واکسن هاری دریافت کرده بودند تأثیری در تیتری آنتی بادی علیه ویروس هاری نگذاشت (۴). از طرفی مصرف لوامیزول در خوک‌های تازه از شیر گرفته، سبب افزایش IgA روده شده است (۱۲). مصرف ۱۰۰mg لوامیزول برای ۱۲ روز در انسان سبب بهبود تیتر آنتی بادی

علیه ویروس هپاتیت B در بیماران دیالیزی می‌شود (۳). استفاده از لوامیزول در بیمارانی که سیستم ایمنی آنها به آنتی ژن پاسخ نمی‌داد سبب افزایش تعداد سلول‌های B و پاسخ آنتی بادی‌ها به تیفوئید شد اما اثری روی واکسن آنفولانزا نداشت (۶). مصرف لوامیزول در جوجه‌های گوشتی به میزان ۳/۷۵ mg/Kg، ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ براساس وزن زنده موجب افزایش تیتر آنتی بادی علیه SRBC شد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد(۲۰). مصرف ۲۰mg/Kg لوامیزول براساس وزن زنده در آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی در ۲۴ ساعت قبل از واکسیناسیون، موجب افزایش تیتر آنتی بادی علیه واکسن نیوکاسل نشد (۱). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از لوامیزول، تیتر آنتی بادی IgG علیه SRBC را در جوجه‌های گوشتی افزایش داد و موجب تسریع پاسخ‌های اختصاصی شد (۲۲). با توجه به این واقعیت که لازمه تولید مناسب آنتی بادی در پاسخ‌های ایمنی، عملکرد مناسب سلول‌های B، T و ماکروفاژها و اثر این سلول‌ها بر هم است (۲۵) احتمالاً عدم نتایج یکسان مطالعات در ارتباط با اثر لوامیزول بر تیتر آنتی بادی مربوط به روش مصرف، مقدار مصرفی لوامیزول، روش اندازه‌گیری تیتر آنتی بادی (۲۸) و نوع آنتی ژن محرک سیستم ایمنی است. به هر حال شواهد نشان دهنده آثار تحریکی لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی هومورال است.

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تزریق ۰/۲۵ mg/Kg لوامیزول به جوجه‌های سالم تأثیری بر وزن اجزاء لاشه ندارد و وزن بورس فابریسیوس و تیموس نیز تغییر نمی کند (۲۶). این یافته‌ها با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. از طرفی مصرف لوامیزول به میزان ۰/۲۵، ۲/۵ و ۱۷/۵ mg به ازای هر جوجه یک روزه سبب تحریک بافت‌های لنفوئیدی شد که با نتایج این تحقیق مطابقت نداشت (۲۹). دلیل عدم تأثیر لوامیزول بر اجزاء لاشه خصوصاً سیستم لمفاوی مثل تیموس، بورس فابریسیوس و طحال در این تحقیق شاید بدلیل وجود ۱۸ روز فاصله بین قطع دارو و کشتار باشد. در این وضعیت، دارو توسط مکانیزیم‌های حذف کننده از بدن پاک شده و اثر تحریکی لوامیزول بر این بافتها از بین رفته است (۹،۲۴). همچنین اثر لوامیزول به مقدار مصرف، روش مصرف و نوع میزبان وابسته است هر کدام از این سه عامل می‌تواند دلیلی بر بی اثر بودن لوامیزول بر صفات لاشه نیز باشند.

با توجه به نتایج بدست آمده چنین استنباط می‌شود که مصرف ۱۴mg لوامیزول در لیتر آب به‌مدت ۲۰ روز با رعایت فاصله ۱۸ روز قبل از کشتار سبب بهبود پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال در جوجه‌های گوشتی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان بدلیل تأمین هزینه و سایر امکانات قدردانی می‌شود.

References

1. Al-Nammi, A. K., Khamas, E. J. (2004) Effect of levamisole on the Newcastle disease vaccine immune response in chickens. Iraqi J. Vet. Sci. 6: 5-8.
2. Andrieu, J. M. (1977) Levamisole stimulant of the immune system in animal and man. Pathol. Biol. 25: 57-66.
3. Argani, H., Akhtarishojaie, E. (2006) Levamizole enhances immune responsiveness to intra-dermal and intra-muscular hepatitis B vaccination in chronic hemodialysis patients. J Immune Based Ther Vaccines. 4: 1-5.
4. Castro Garzón M., Mubita, M., Kachinka, I. (1992) Levamisole treatment in HIV-infected Zanbian children. Lancet. 340: 1099-1100.
5. Cazella, L.N., Pardo, P.E., Frazatti-Gallina, N.M., Reis, L.S.L.S. (2009) Effect of levamisole on the humoral response against rabies in cattle. Vet. Rec. 165: 722-723.
6. Chen, L.Y., Lin, Y.L., Chiang, B.I. (2008) Levamisole enhances immune responses by affecting the activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Clin. Exp. Immunol. 151: 174-181.
7. Delespesse, G., Vrijens, R., Maubeuge, J., Hudson, D., Kennes, B., Govaerts, A. (1977) Influence of levamisole on the immune response of old people. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 54: 151-157.
8. El-Kholy, H., Kemppainen, B. W. (2005) Levamisole residues in chicken tissue and eggs. Poult. Sci. 84: 9-13.
9. El-Kholy, H., Kemppainen, B., Ravis, W., Hoerr, F. (2006) Pharmacokinetics of levamisole in broiler breeder chickens. J. Vet. Pharmacol. Ther. 29:49-53.
10. Frenandez, M., Garcia, J.J., Sierra, M., Diez, M.J., Teran, M.T. (1998) Bioavailability of levamisole after intra-muscular and oral administration in sheep. NZ Vet J. 46: 173-176.
11. Gwilt, P., Tempero, M., Kremer, A., Connolly, M., Ding, C. (2000) Pharmacokinetics of levamisole in cancer patient treated with 5-fluorouraci. Cancer Chemother. Pharmacol. 45: 247-251.
12. Janjatovic, A.K., Lackovic, G., Bozic, F., Popovic, M.,

Valpotic, I. (2008) Levamisole synergizes proliferation ofintestinal IgA+ cells in weaned pigs immunized with vaccine candidate F4ac+ nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strain. J. Vet. Pharmacol. Ther. 31: 328-333.

13. Lai, W.H., Lu, S.Y., Eng, H.L. (2002) Levamisole aids in treatment of refractory oral candidiasis in two patients with thymoma associated with myasthenia gravis: report of two cases. Chang Cung Med J. 25: 606-611.
14. Le Jan, C. (1981) In-vivo effect of levamisole on responses of blood lymphocytes to mitogens in calf. Ann. Rech. Vet. 12: 57-63.
15. Merluzzi, V.J., Badger Alison, M., Kaiser, C.W., Cooperband, S.R. (1975) *In vivo* stimulation of immune lymphoid cell cultures by levamisole. Clin. Exp. Immunol. 22:486-492.
16. Mielants, H., Veys, E.M. (1978) A study of the hematological side effects of levamisole in rheumatoid arthritis with recommendations. J. Rheumatol. Suppl. 4: 77-83.
17. Munir, K., Muneer, M.A., Tiwari, A., Masaoud, E., Chaudhry, R.M. (2009) Effect of salinomycin on cell-mediated immunity of broiler chickens against hydropericardium syndrome and Newcastle disease viruses. Poult. Sci. 88: 86-91.
18. National Research Council (1994) Nutrient Requirements of Poultry, (9^{th} ed.) National Academy Press, Washington.D.C., U.S.A.
19. Lanussus, C.E., Alvarez, L.I., Sallovitz, J.M., Mottier, M.L., Sanchez Bruni, F.S. (2009) Antinematodal Drugs.In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Riviere, J.E., Papich, M.G. (eds.). (9^{th}ed.) Wiley-Blackwell. Ames, USA. p. 1054-1090.
20. Porchezhian, T., Punniamurthy, N. (2006) Effect of oral levamisole hydrochloride on feed intake and body weight of broiler chicks. Anim. Vet. Adv. 5: 847-848.
21. Rajesh, A., Anish, Y., Rajesh, K., Rajeev, S., Mohanty, T.R. (2008) Efficacy of levamisole against Ascaris suum infection in pigs. J. Vet. Parasitol. 22: 87-88.
22. Renoux, G. (1980) The general immune-pharmacology of levamisole. Drug. 20: 89-99.
23. Rijun, Z., Jianming, T., Yan, H. (1999) Effect of levamisole in diet on immune function in broiler chicks. J. Chin. Soc. Anim. Sci. 35: 5-8.
24. Sampson, D., Lui, A. (1976) The effect of levamisole on cell-mediated immunity and suppressor cell function. Cancer Res. 36: 952-955.
25. Schrank Candy, S., Cook Mark, E., Hansen Wallace, R. (1999) Immune response of Mallard ducks treated with immunosuppressive against: Antibody response to erythrocytes and *in vivo* response to phytohemagglutinin-p. J. Wildl. Dis. 26: 307-315.
26. Soppi, E., Lassila, M., Viljanen, O., Lehtonen, P., Eskola, J. (1999) In-vivo effect of levamisole on cellular and humoral immunity in normal chickens. Clin. Exp. Immunol. 38: 609-614.
27. Stevenson, H.C., Green, I., Hamilton, J.M., Calabro, B.A., Parkinson, D.R. (1991) Levamisole known effects on the immune system, clinical results, and future applications to the treatment of cancer. J. Clin. Oncol. 9: 2052-2066.
28. Rymoens, J., Rosenthal, M. (1977) Levamisole in the modulation of the immune response: the current experimental and clinical state. J. Reticuloendothel. Soc. 21: 175-221.
29. Szeleszczuk, P., Karpinska, E., Bielecki, W., Borzemska, W., Kosowska, G. (2003) Evaluation of chosen immune-modulators toxicity for chicken embryos and one-day-old chicks. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 47: 411-417.

J.Vet.Res. 67,3:235-241,2012

Effects of oral levamisole hydrochloride on cellular and humoral immune responses in broiler chickens

Roostaei Ali Mehr, M.[1*], Haghighian Roudsari, M.[1], Mansori, B.[1], Nikbakht Broujeni, G.R.[2]

[1]*Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht- Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

(Received 5 February 2012 , Accepted 12 June 2012)

Abstract:

BACKGROUND: in this experiment, the effect of consecutive oral levamisole usage on cellular and humoral responses of broilers immune system was evaluated. **OBJECTIVES:** The aim of this experiment was to determine the best level of levamisole for stimulating immune system of broilers. **METHODS:** The experiment was conducted by 250 day old (male and female) broiler (Ross) chicks with an average live weight of 40.2g. Effect of zero (control L_0), 3.5 ($L_{3.5}$), 7 (L_7), 14 (L_{14}) and 28 (L_{28}) mg/l of levamisole in drinking water from 5 to 25 days under randomized design using a factorial experiment with 5 replication were studied. Cellular immune responses were assayed by PHA-P injection in the skin fold of wings (day 15) and thickness of skin were measured after 24 and 48 hours. Sheep Red Blood Cell (SRBC) 25% were injected in the breast muscle in days 7 and 21 to investigate humoral immune responses, and IgG titer against SRBC was determined in days 7, 14, 28, 35, and 42 by agglutination test. **RESULTS:** Cellular immune responses to PHA-P in treatments containing 7 and 14 mg/l of levamisole (0.272 and 0.205, respectively) were significantly affected ($p<0.05$). IgG titer against SRBC in treatment containing 14 mg/l of levamisole (6.16) was significantly higher than other groups ($p<0.05$). Carcass trait of broiler chicks were not affected by different level of consecutive oral levamisole ($p>0.05$). **CONCULUSIONS:** The low level (up to 14 mg/L) of consecutive oral levamisole promotes cellular and humoral immune system responses of broiler chicks.

Key words: broiler chicks, immune system, levamisole.

Figure Legends and Tabel Captions

Table 1. Chemical composition and components of the food ration of broiler at initial and growing periods. Mineral Supplement: Each Kg of minerals containing: manganese (manganese oxide 62%)16 g, iron (ferrous sulfate 20%) 25 g, zinc (zinc oxide 77%) 11 g, copper (copper sulfate25%) 4g, iodide (calcium 62%) 0.16 g, selenium (1%) 2g. Vitamin Supplement: Each Kg of vitamine containing: Vit A (500000IU/g) 1.8g, Vit B1 (98.5%) 0.18, Vit B2 (98%) 1g, Vit B6 (98.5%) 0.3g,Vit B12 (1%) 0.15g, Vit D3 (500000IU/g) 0.4 g, Vit E (500IU/g) 3.6g, Vit K3 (50%) 0.4 g, Vit B9 (80%) 0.125 g, Vit B5 (99%) 3 g, Vit H2 (2%) 0.5 g. Metabolisable energy: kcal ME/kg DM.

Table 2. The effect of different levels and consecutive oral levamisole on responses of wing skin to PHA-P at different times. [a-c] Different superscripts indicate treatment differences ($p<0.05$). L_0: 0 mg/L levamisole in drinking water; $L_{3.5}$: 3.5 mg/L levamisole in drinking water; L_7: 7 mg/L levamisole in drinking water; L_{14}: 14 mg/L levamisole in drinking water; L_{28}: 28 mg/L levamisole in drinking water

Table 3. The effect of different levels of levamisole on the mean of anti SRBC IgG titers at 7, 14, 28, 35 and 42 days after ARBC injection. [a-c] Different superscripts indicate treatment differences ($p<0.05$). L_0: 0 mg/L levamisole in drinking water; $L_{3.5}$: 3.5 mg/L levamisole in drinking water; L_7: 7 mg/L levamisole in drinking water; L_{14}: 14 mg/L levamisole in drinking water; L_{28}: 28 mg/L levamisole in drinking water.

Table 4. The effect of different levels of consecutive oral levamisole on the percentage of carcass traits (percentage). L_0: 0 mg/L levamisole in drinking water; $L_{3.5}$: 3.5 mg/L levamisole in drinking water; L_7: 7 mg/L levamisole in drinking water; L_{14}: 14 mg/L levamisole in drinking water; L_{28}: 28 mg/L levamisole in drinking water

Graph 1. The effect of consecutive oral levamisole on sensitivity of skin to PHA-P during the time. 24 huors ■ 28 hours ■

***Corresponding author's email: roostaei@guilan.ac.ir, Tel: 0131-6690282, Fax: 0131-6690281**