



Histopathology and Immunology of Rainbow Trout Fed with Levamisole

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Meshkini S.* *PhD*,
Tehrani A.A.¹ *PhD*,
Farhangpajouh F.² *MSc*,
Tafi A.A.³ *PhD*

How to cite this article

Meshkini S, Tehrani A A, Farhangpajouh F, Tafi A A. Histopathology and Immunology of Rainbow Trout Fed with Levamisole. Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(2):87-93.

*Food Hygiene & Quality Control Department, Veterinary Medicine Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

¹Pathobiology Department, Veterinary Medicine Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

²Pathobiology Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

³Fishery Department, Natural Resources Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

Correspondence

Address: Food Hygiene & Quality Control Department, Veterinary Medicine Faculty, Urmia University, Daneshgah Boulevard, 11km SERO Road, Urmia, Iran. Postal Code: 5756151818

Phone: +98 (44) 32752743

Fax: +98 (44) 32771926
s.meshkiniy@gmail.com

Article History

Received: June 13, 2017

Accepted: February 18, 2018

ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims The use of immune stimulants to prevent diseases and increase the resistance of aquatic animals to stress has been rising. The aim of the present study was examining the histopathology and immunology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed with Levamisole.

Materials & Methods In this experimental research, 1000 fish were divided in 5 treatments and fed on diet supplemented with levamisole at 0 (control), 100, 250, 500, and 1000mg/kg-1 diet for 45 days. Then, the fish were fed on a diet without levamisole and increased density twice for the following 15 days. Blood samples were collected from all treatments on days 15, 30, 45 and 60 to evaluate the total immunoglobulin and lysozyme activity of serum. At the end of the trial, 15 fish from each treatment (each replicate 5 fish) were randomly selected and tissue samples of gill, kidney, and liver were evaluated. The data were analyzed by SPSS 15 software, using one way ANOVA and Duncan test.

Findings Treatment fed with 1000mg levamisole on day 30 and 60 had the highest total serum immunoglobulin and had the highest lysozyme activity in comparison to other treatments on 15, 30, and 60 days. The least amount of tissue damage was observed in gills, kidneys, and liver in 1000mg levamisole.

Conclusion A total of 1000mg/kg-1 levamisole of rainbow trout diet causes the least amount of damage to the gill, kidneys, and liver tissues, as well as the increase of total immunoglobulin and lysozyme activity of serum.

Keywords Rainbow Trout; Levamisole; Histopathology; Immune Responses

CITATION LINKS

[1] A review of principal bacterial diseases of ... [2] The effect of cobalt, vitamin, tissue preparations and antibiotics ... [3] Effects of dietary vitamin D₃ administration on ... [4] Current research status of fish ... [5] Effect of Echinacea purpurea on growth and survival ... [6] The use of immunostimulants in fish larval ... [7] Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* ... [8] The stress response in ... [9] Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged ... [10] Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase ... [11] The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune ... [12] Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of ... [13] Evaluation of immune responses in an Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with Levamisole ... [14] Efficiency of Levamisole in improving the immune response of Catfish (*Clarias gariepinus*) to *Aeromonas* ... [15] Effect of feeding level on growth and nutrient ... [16] Feed intake, growth, feed conversion, digestibility, enzyme activities and ... [17] Effect of Chitosan on hematological parameters ... [18] Dietary intake of immunostimulants by rainbow ... [19] A rapid and sensitive method for the quantitation ... [20] Innate immune responses in rainbow trout ... [21] Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte ... [22] Impact of plant products on innate and adaptive ... [23] Yeast glucan induces increase in lysozyme and ... [24] Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral ... [25] Glucan administration potentiates immune defence mechanisms ... [26] Ultrastructural study of the teleost fish ... [27] Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas* ... [28] Innate immunity ... [29] Immunomodulatory and growth promoting ... [30] Study of lysozyme, immunoglobulin, blood cell and ... [31] Histopathology of mortality in cultured rainbow trout fry ... [32] Effects of cortisol on gill chloride cells in persian ... [33] Protective effect of commercial prebiotic Immunogen on liver ... [34] Safety evaluation of chloramine-T on ornamental zebra fish (*Danio rerio*) using ... [35] Passive immune complex glomerulonephritis in mice: Models for various ...

بررسی آسیب‌شناسی بافتی و ایمنی‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با لوامیزول

سعید مشکینی* PhD

گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

علی‌اصغر تهرانی PhD

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

فرهاد فرهنگ‌پژوه MSc

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

علی‌اکبر طافی PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اهداف: استفاده از محرک‌های ایمنی برای پیشگیری از بیماری‌ها و بالابردن مقاومت آبزیان در برابر استرس‌ها روندی صعودی داشته است. هدف پژوهش حاضر بررسی آسیب‌شناسی بافتی و ایمنی‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با لوامیزول بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر ۱۰۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در قالب پنج تیمار با جیره‌های حاوی صفر (گروه شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۵ روز مورد تغذیه قرار گرفتند و به مدت ۱۵ روز دیگر کلیه تیمارها با غذای فاقد لوامیزول و با تراکم دو برابر حالت معمول پرورشی تغذیه شدند. هر ۱۵ روز، ۳۰ قطعه ماهی از هر تیمار (هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی) به‌طور تصادفی بی‌هوش و ایمونوگلوبولین تام سرم و فعالیت لیزوزیم سرم آنها اندازه‌گیری شد. در پایان دوره تیماری تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار (هر تکرار ۵ قطعه ماهی) به‌طور تصادفی انتخاب و بافت‌های آبشش، کلیه و کبد آنها بررسی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 15 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن تحلیل شدند.

یافته‌ها: تیمار تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در روز ۳۰ و ۶۰ بیشترین ایمونوگلوبولین تام سرم را داشت و نسبت به دیگر تیمارها در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دارای بیشترین مقدار فعالیت لیزوزیم بود. کمترین میزان آسیب‌های بافتی در اندام‌های آبشش، کلیه و کبد در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کمترین آسیب‌دیدگی بافت‌های آبشش، کلیه و کبد و همچنین ارتقای ایمونوگلوبولین تام و فعالیت لیزوزیم سرم می‌شود.

کلیدواژه‌ها: قزل‌آلای رنگین‌کمان، لوامیزول، تغییرات آسیب‌شناسی بافتی، پاسخ‌های ایمنی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

*نویسنده مسئول: s.meshkinii@gmail.com

مقدمه

در دنیایی که تولیدات آبرزی پروری آن سالانه روبه‌رشد است، پرورش ماهی سهم مهمی از این تولیدات را به خود اختصاص داده و این در حالی است که هجمه بیماری‌ها در این صنعت روبه‌رشد و تاثیر آن بر پیشرفت این صنعت بر محققان و اهل فن پوشیده نیست. همواره تلاش‌های زیادی برای بررسی نقش مواد و داروهای مختلف برای کاهش و ازمیان‌برداشتن عوامل بازدارنده در مسیر توسعه این صنعت صورت می‌گیرد^[۱]. در جیره غذایی ماهیان می‌توان موادی را افزود که با استفاده از آنها قدرت مقابله آبزیان در برابر استرس‌های مختلف را به میزان قابل ملاحظه‌ای بالا برد. این مواد تحت عنوان محرک‌های ایمنی شناخته شده‌اند و در عین حال نمی‌توانند جایگزین غذا و مواد مغذی موثر در جیره غذایی ماهیان باشند، ولی می‌توانند در افزایش جذب مواد غذایی، افزایش میزان

رشد و تقویت ایمنی آبزیان بسیار موثر واقع شوند^[۲]. سال‌های متمادی است که از داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و پیشگیری از بیماری‌های مختلف ماهیان به‌ویژه آلودگی‌های باکتریایی استفاده شده است، اما موضوع مقاومت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و تجمع این مواد در بافت‌های ماهیان پرورشی و همچنین تاثیرات آلاینده‌ی این داروها بر محیط زیست از مهمترین مسایل جلوگیری از پیشرفت پرورش آبزیان بوده است. این امر سبب شده است تا در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها روندی کاهشی به خود بگیرد و در عین حال استفاده از محرک‌های ایمنی (که عوارض جانبی کمتری را در پی دارند) برای پیشگیری از بیماری‌ها و بالابردن مقاومت آبزیان در برابر انواع مختلف استرس‌ها روندی صعودی داشته باشد^[۳]. محرک‌های ایمنی موادی هستند که با تحریک سیستم ایمنی و تقویت پاسخ‌های ایمنی موجب افزایش عملکرد این سیستم در حفاظت از بدن در برابر عوامل تنش‌زا می‌شوند. چنین موادی علاوه بر اینکه مقاومت آبزیان را نسبت به بیماری‌های عفونی بیشتر می‌کنند، خطر شیوع بیماری را نیز کاهش می‌دهند^[۴]. استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهیان باعث افزایش مقاومت آنها نسبت به طیف گسترده‌ای از آلودگی‌های پاتوژنی می‌شود. این محرک‌ها از طریق افزایش مکانیزم‌های دفاعی غیراختصاصی باعث ایجاد مقاومت ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند^[۵]. بنابراین با توجه به نقش مهم سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان در طول دوره پرورش، پژوهشگران به تحقیقات در زمینه عملکرد محرک‌های ایمنی مختلف و استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی تقویت‌کننده سیستم ایمنی تمایل زیادی نشان داده‌اند^[۶-۸]. علی‌رغم اینکه استفاده از محرک‌های ایمنی نتایج مطلوب و جالب توجهی را ارائه داده است، نمی‌توان از آثار و عوارض جانبی احتمالی این مواد بر بافت‌های بدن آبزیان به‌طور کامل چشم‌پوشی نمود. لذا بررسی پیرامون آثار جانبی و به‌ویژه تغییرات آسیب‌شناسی بافتی ناشی از استفاده از این مواد و همچنین نقش این مواد در کاهش آسیب‌های بافتی در گونه‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد^[۹].

لوامیزول دارویی ضدکرم در پستانداران بوده^[۱۰] و نقش محرک ایمنی آن در گونه‌های مختلف آبزیان نیز به اثبات رسیده است. فیندلای و موندای^[۱۱] تاثیر لوامیزول را در افزایش شاخص بیگانه‌خواری و افزایش فعالیت لیزوزیم موکوس و سرم ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) گزارش کرده‌اند. گویالاکاتان و ارو^[۱۲] نقش لوامیزول را در افزایش فعالیت لیزوزیم سرم و افزایش مقاومت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در برابر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) گزارش کرده‌اند. همچنین نقش محرک ایمنی لوامیزول در تحریک پاسخ‌های ایمنی مانند افزایش فعالیت لیزوزیم سرم و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری ماکروفاژها در کپور هندی (*Labeo rohita*)^[۱۳]، افزایش ایمونوگلوبولین کل در گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) و افزایش مقاومت آن در برابر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*^[۱۴] گزارش شده است. لذا در تحقیق حاضر سعی بر آن شد تا علاوه بر تاثیر این ماده بر پاسخ‌های ایمنی، نقش آن در تغییرات آسیب‌شناسی بافتی در اندام‌های حساسی مانند آبشش، کلیه و کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان از گونه‌های ماهیان تجاری و مهم آبرزی پروری دنیا مورد بررسی قرار گیرد. پژوهش حاضر با هدف بررسی آسیب‌شناسی بافتی و ایمنی‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه‌شده با لوامیزول

میکروتیوب‌های حاوی خون منعقدشده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفیوژ و سرم آنها جداسازی شد. نمونه‌های سرم تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی در دمای ۸°C - نگهداری شدند [17].

الف) سنجش ایمونوگلوبولین تام سرم: در اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین تام سرم از روش سیویکی و همکاران [18] استفاده شد. این اندازه‌گیری بر روش رنگ‌سنجی بردفورد [19] استوار بود که در آن معیار محاسبه میزان پروتئین‌ها میزان جذب نوری محلول کوماسی برلیانت بلو G-250 (به عنوان ماده رنگ‌پذیر) در زمان اتصال با پروتئین‌های سرم در طول موج ۵۹۵ نانومتر است و محلول استاندارد مورد استفاده در این روش اندازه‌گیری غلظت‌های صفر، ۰.۲۵، ۰.۵۰، ۱.۰۰، ۱.۵۰ و ۲.۰۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (BSA) است.

ب) سنجش فعالیت لیزوزیم سرم: اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم سرم طبق روش ارایه‌شده توسط کیم و /وستین [20] و همچنین کلریتون و همکاران [21] و براساس لیز باکتری گرم مثبت میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) حساس به آنزیم لیزوزیم (سیگما-آلدريج؛ ایالات متحده) انجام شد. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از سوپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس با غلظت ۰.۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر سترات سدیم ۰.۲ مولار (pH برابر با ۵/۵) به ۱۵ میکرولیتر نمونه سرم در چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده و بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزاخوان (اوارنس، ایالات متحده) قرائت شد. براساس تعریف، یک واحد فعالیت لیزوزیم برابر با میزان سرمی است که باعث کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۱ در دقیقه شود (U/min).

آزمایشات آسیب‌شناسی بافتی: به منظور تعیین اثرات لوامیزول بر بافت‌های بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ایجاد تغییرات احتمالی در بافت‌ها، در پایان دوره تیماری تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار (هر تکرار ۵ قطعه ماهی) به طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی آنها به وسیله محلول ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک [17] بافت‌های آبشش، کلیه و کبد آنها برداشته و پس از شست‌وشو در سرم فیزیولوژی در فرمالین ۱۰٪ فیکس شد. برای تهیه لام‌های بافتی از این بافت‌ها، ابتدا بافت‌ها به وسیله یک سری اتیل الکل با غلظت‌های بالارونده (اتانول ۶۰٪ تا الکل مطلق) آب‌گیری و شفاف‌سازی آنها با استفاده از روغن سدر و گزیلول انجام شد. پس از شفاف‌سازی نمونه‌ها در پارافین مایع قرار گرفتند و قالب‌گیری شدند. پس از قالب‌گیری نمونه‌های بافتی، برش‌های نواری شکل با ضخامت ۵ میکرون به وسیله میکروتوم تهیه شد و این نوارها ابتدا در الکل ۳۰٪ و بعد داخل بن‌ماری روی آب ۵۵°C قرار داده شدند و پس از صاف و بدون چروک شدن روی لام‌ها گذاشته شدند تا در دمای آزمایشگاه به مدت حداکثر ۶-۵ ساعت خشک شوند. برای رنگ‌آمیزی لام‌های بافتی از رنگ‌های همتاکسیلین و اتوزین استفاده شد [9]. برای هر تیمار ۱۵ لام آسیب‌شناسی بافتی تهیه شد و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی هر آسیب با توجه به شدت موارد مشاهده‌شده آن آسیب در لام‌های هر تیمار، ضریب مربوط به هر شدت (ضریب ۱ برای آسیب‌های خفیف، ضریب ۱۰ برای آسیب‌های متوسط و ضریب ۱۰۰ برای آسیب‌های شدید) برای آن لحاظ و در نهایت با توجه به رابطه زیر میانگین شدت هر آسیب برای هر تیمار

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی روی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به تعداد ۱۰۰۰ قطعه و با میانگین وزنی ۱۵۰/۰±۶/۰ گرم اجرا شد که از یکی از مزارع پرورش ماهی ارومیه تهیه شدند. پس از انتقال ماهیان به پژوهشگاه آرتمیا و آبی‌پروری دانشگاه ارومیه و گذراندن دو هفته زمان سازگاری با محیط آزمایش، به طور تصادفی در ۱۵ حوضچه استوانه‌ای پلی‌اتیلنی حاوی ۲۰۰ لیتر آب (آب جاری و تراکم ۳ لیتر آب به ازای هر قطعه ماهی ۱۵۰ گرمی) تقسیم شدند. هر سه حوضچه به تکرارهای یک تیمار غذایی اختصاص داده شد و به ترتیب با مقدارهای صفر (گروه شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا و به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. در پایان روز ۴۵، میانگین وزن ماهیان هر حوضچه اندازه‌گیری و با توجه به تعداد و میانگین وزن ماهیان باقیمانده در هر حوضچه، با پایین آوردن سطح آب، تراکم ماهیان به دو برابر تراکم اولیه رسانده شد و همه تیمارها به مدت ۱۵ روز با غذای گروه شاهد (غذای فاقد لوامیزول) مورد تغذیه قرار گرفتند. دوره نوری برای همه تیمارها ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود. با توجه به جاری بودن آب، فضولات ماهیان در تانک‌ها تجمع پیدا نمی‌کرد، ولی با این حال در صورت مشاهده هر گونه فضولات کم در تانک‌ها بلافاصله به وسیله شیلنگ مخصوص هر تانک سیفون می‌شد.

اکسیژن محلول آب هر حوضچه در طول دوره آزمایش به صورت روزانه و با اکسی‌متر دیجیتال CRISON 45P (Crison؛ اسپانیا)، pH و دمای آب با pH متر دیجیتال (Elmetron؛ لهستان)، نیتريت، نیترات و آمونیاک آب به صورت هفتگی و با دستگاه فتومتر ۷۵۰۰ (پالین؛ انگلستان) و جمع‌آوری تلفات به صورت روزانه انجام گرفت.

تهیه جیره غذایی حاوی لوامیزول و تغذیه ماهیان: غذای تجاری مورد استفاده از نوع GFT-2 (چینه؛ ایران) با ترکیبات ۳۸٪ پروتئین، ۱۶٪ چربی، ۱۰٪ رطوبت، ۱۰٪ خاکستر، ۴٪ فیبر، ۱٪ فسفر و ۲۲٪ عصاره عاری از نیتروژن بود که با توجه به میانگین وزن ماهیان، دمای آب و با استفاده از جدول استاندارد غذایی [15]، مقدار غذای مورد نیاز هر گروه از ماهیان تعیین و در چهار وعده با فواصل ۶ ساعته به صورت دستی به ماهیان داده شد. پس از وزن کردن مقدار غذای تعیین شده برای هر تیمار با ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۱ گرم)، مقادیر ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم لوامیزول به طور جداگانه در ۱۵ سی‌سی آب مقطر حل و با آب‌پاش مخصوص هر تیمار روی غذای آن تیمار اسپری شد [16]. پس از خشک شدن غذا در دمای اتاق تا زمان استفاده در دمای ۴°C نگهداری شدند. در گروه شاهد، فقط ۱۵ سی‌سی آب مقطر روی غذا اسپری شد تا تنها تفاوت غذای آن با سایر گروه‌ها در مقدار لوامیزول غذا باشد. غذای تیمارها نیز به صورت روزانه تهیه و استفاده شد.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی

در طول دوره آزمایش، هر ۱۵ روز یک‌بار، ۳۰ قطعه ماهی از هر تیمار (هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی) به طور تصادفی برداشته و در محلول پودر گل میخک ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند و با سرنگ از ساقه دمی آنها خونگیری انجام و خون ماهیان درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری استریل ریخته شد. پس از انعقاد نمونه‌های خون،

تعیین شد:

میانگین شدت هر آسیب در تیمار = (تعداد آسیب‌های خفیف × ۱) + (تعداد آسیب‌های متوسط × ۱۰) + (تعداد آسیب‌های شدید × ۱۰۰)

در نهایت اگر مقدار عددی رابطه فوق بین ۱ تا ۱۰، ۱۱ تا ۹۹ و ۱۰۰ یا ۱۰۰ به بالا بود، شدت آن آسیب برای تیمار مربوطه به ترتیب خفیف، متوسط و شدید در نظر گرفته شد [9].

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 15 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای بررسی تفاوت میانگین‌ها و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌های تیمار حاصل از آنالیز شاخص‌های ایمنی صورت گرفت.

یافته‌ها

در روزهای ۱۵ و ۴۵ بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما در روزهای ۳۰ و ۶۰ با استرس تراکم دو برابری تفاوت‌های معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت، به‌طوری که تیمار تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر دو روز ۳۰ و ۶۰ بیشترین مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم را نشان داد و با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱).

جدول ۱) میانگین آماری مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در تیمارهای مختلف ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با لوامیزول

تیمار (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰ (تراکم دو برابر)
صفر (شاهد)	۳/۱۲±۰/۵۳a	۲/۹۱±۰/۳۳a	۳/۴۴±۱/۳۰a	۲/۷۹±۰/۱۳a
۱۰۰	۳/۱۵±۰/۴۸a	۳/۳۱±۰/۴۹a	۲/۶۴±۰/۸۷a	۲/۶۳±۰/۱۲a
۲۵۰	۳/۵۸±۰/۵۶a	۳/۴۴±۰/۳۱a	۳/۳۱±۰/۲۳a	۳/۶۴±۰/۳۳ab
۵۰۰	۳/۲۵±۰/۴۷a	۳/۳۴±۰/۳۰a	۱/۳۲±۰/۲۹a	۳/۵۱±۰/۲۰ab
۱۰۰۰	۳/۷۱±۰/۳۸a	۴/۱۰±۰/۲۵b	۱/۷۵±۱/۳۹a	۵/۲۱±۰/۴۵c

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ میلی‌گرم نسبت به دیگر تیمارها شرایط مطلوب‌تری را نشان داد، به‌طوری که این تیمار در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ با استرس تراکم دو برابری دارای بیشترین مقدار فعالیت لیزوزیم بود و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

جدول ۲) میانگین آماری فعالیت لیزوزیم سرم (واحد بین‌المللی/دقیقه) در تیمارهای مختلف ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با لوامیزول

تیمار	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰ (تراکم دو برابر)
صفر (شاهد)	۶۲۷±۱۱۳a	۶۰۸±۷۲a	۶۵۱±۸۰b	۷۷۹±۳۰b
۱۰۰	۶۴۱±۱۰۰a	۶۸۵±۹۸ab	۶۵۱±۲۸b	۵۴۸±۲۳a
۲۵۰	۷۶۶±۱۰۷ab	۷۲۷±۵۴ab	۶۸۵±۴۷b	۸۵۱±۷۹bc
۵۰۰	۷۴۳±۱۴۵ab	۶۸۷±۷۲ab	۲۸۷±۵۹ba	۷۰۲±۷۶b
۱۰۰۰	۸۱۲±۹۵b	۸۰۰±۱۲۷b	۶۱۱±۴۰b	۹۶۵±۱۵cd

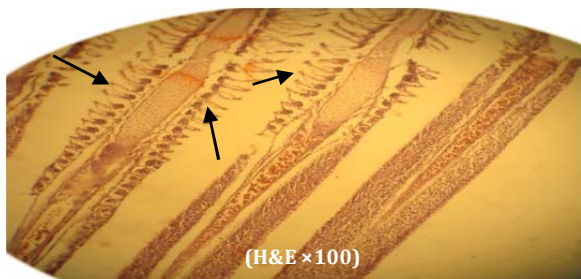
حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

کمترین میزان آسیب‌های بافتی در اندام‌های آبشش، کلیه و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا مشاهده شد، به‌طوری که به‌ویژه در بافت‌های آبشش و کلیه از نظر تغییرات بافت‌شناسی تفاوت زیادی با گروه شاهد داشت (جدول ۳؛ شکل‌های ۱-۴).

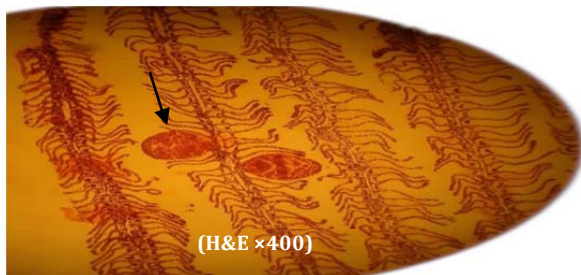
جدول ۳) میزان تغییرات آسیب‌شناسی بافتی ماهیان قزل‌آلای تحت تیمار غلظت‌های مختلف لوامیزول (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پس از پایان دوره تیماری

اندام	شاهد	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
آبشش					
ادم	+	+	+	+	+
افزایش حجم سلول‌های کلراید	+	++	+	+	-
چسبندگی لاملاها	++	+	+	+	-
چماقی‌شدن آبشش‌ها	+	+	+	+	-
نکروز غضروفی	+	+	-	-	-
از بین رفتن تیغه‌های ثانویه	+	+	+	-	-
آنوریکسم آبشش‌ها	+	+	+	-	-
کلیه					
پُر خونی بافت کلیه	+++	++	++	++	+
تورم سلولی	+++	++	++	++	+
تورم آبکی	+	+	-	-	-
نکروز بافتی کلیه	+	+	-	-	-
نفوذ سلولی	+++	++	+	++	+
هیالینه‌شدن	++	+	-	+	-
کبد					
پُر خونی	+	+	+	+	-
تورم سلولی	+	+	+	+	+
دژنراسانس بافت کبد	+	+	+	+	-
نکروز بافتی کبد	+	+	+	+	-

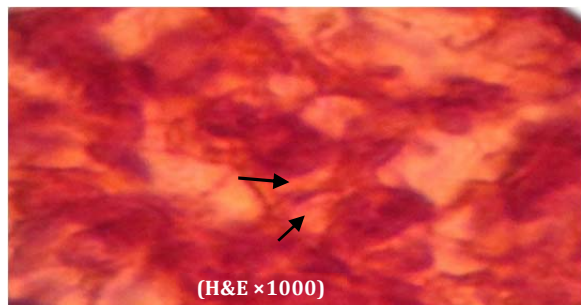
علامه -، +، ++ و +++ به ترتیب نشان‌دهنده عدم مشاهده، خفیف، متوسط و شدید تغییرات آسیب‌شناسی هستند



شکل ۱) آتروفی، به‌هم‌فشرده‌گی و ضخیم‌شدن رشته‌های آبششی (پیکان‌های سیاه) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار لوامیزول ۱۰۰ میلی‌گرم



شکل ۲) آنوریکسم و همجوشی نوک تیغه‌های ثانویه آبششی (پیکان سیاه) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار لوامیزول ۱۰۰ میلی‌گرم



شکل ۳) دژنراسیون و وجود واکوئل‌های چربی (پیکان‌های سیاه) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سلول‌های کبدی در تیمار شاهد (بدون لوامیزول)

منبع مهم تولید انواع ترکیبات بیوشیمیایی مانند پروتئین سرم، لیزوزیم، فاکتورهای کمپلمان و ایمونوگلوبولین‌ها هستند [30]. ویجندرا و پادیرتن افزایش قابل ملاحظه و معنی‌دار فعالیت لیزوزیم سرم را در کپور هندی تغذیه‌شده با ۵ میلی‌گرم لوامیزول به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره غذایی را گزارش کرده‌اند و نتایج آنها تاییدی بر نقش محرک ایمنی لوامیزول در مطالعه حاضر بود [13].

در برخی موارد استفاده از داروهای مختلف در غذای آبزیان باعث آسیب‌دیدگی بافت‌های مختلف ماهیان در مزارع پرورشی می‌شود [31]، لذا باید قبل از استفاده از داروها و افزودنی‌هایی که به جیره غذایی آبزیان اضافه می‌شود مطالعات لازم در زمینه آسیب‌شناسی بافتی آنها انجام شود [9]. در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که حضور لوامیزول در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان علاوه بر داشتن آثار محرک ایمنی همچون افزایش مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم و افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، دارای تأثیرات متفاوتی بر بافت‌های ماهی بود. به‌طوری‌که در این تحقیق ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذای قزل‌آلای رنگین‌کمان با داشتن بهترین اثر محرک ایمنی، بیشترین تأثیر را در کاهش آسیب‌های بافتی داشت که به‌ویژه در مورد آسیب‌های بافت آبشش و کلیه نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری در میزان آسیب‌های بافتی نشان داد. این موضوع نشان‌دهنده تأثیر مطلوب لوامیزول در کاهش آسیب‌های بافتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مزارع پرورش ماهی بود. محققان دیگر نیز تأثیر لوامیزول را در کاهش آسیب‌های بافتی در ماهیان گزارش کرده‌اند. در بررسی صورت‌گرفته توسط علی و همکاران گزارش شده است که مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم جیره غذایی گربه‌ماهی علاوه بر اینکه باعث ایجاد هیچگونه آسیب‌های بافتی نشده، بلکه موجب افزایش سطح پروتئین کل، افزایش مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم، افزایش معنی‌دار در تعداد لکوسیت‌ها و افزایش مقاومت ماهی در برابر باکتری *Aeromonas hydrophila* به میزان ۹۰٪ نسبت به گروه شاهد شده است [14].

ضایعات آبششی بیشتر به‌صورت پرخونی عروق، تورم لایه پایه‌ای رشته‌های ثانویه آبششی، هیپرپلازی، چسبندگی رشته‌های آبششی و در مواردی چماقی‌شدن رشته‌های آبششی ثانویه مشاهده شده است [32]. محققان تأثیر مواد مختلفی را بر بافت‌های آبزیان مورد بررسی قرار داده‌اند که برخی از آنها از قبیل کورتیزول مانند لوامیزول استفاده‌شده در این تحقیق بوده است و در کاهش ضایعات بافتی آبشش از جمله افزایش سلول‌های کلراید آبشش در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) موثر بوده‌اند [32]. در تحقیق حاضر ماهیان تیمار پنجم (۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا) کمترین تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش را به دنبال داشتند و بیشترین میزان این تغییرات آسیب‌شناسی در تیمار دوم (۱۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا) مشاهده شد.

جراحات کبدی در پژوهش حاضر عمدتاً به‌صورت نفوذ چربی داخل سلول‌ها و نکروز برخی سلول‌های کبدی مشاهده شد. نفوذ چربی در سلول‌های کبدی در بیشتر ماهی‌های نگهداری‌شده به‌صورت پرورشی دیده می‌شود که کبد بزرگ شده و لبه‌های تیز آن گرد و به رنگ قهوه‌ای یا زرد و با مقدار چربی زیاد ذخیره‌شده دیده می‌شود. در بافت کبد ماهیان مورد آزمایش کمترین میزان آسیب‌دیدگی در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول و بیشترین شدت صدمات بافتی در تیمارهای دیگر و گروه شاهد مشاهده شد. هر چند مطالعات چندان‌ی در زمینه نقش لوامیزول در ایجاد یا کاهش آسیب‌های



شکل ۴) تورم سلولی و نفوذ سلول‌های آماسی در بافت بینابینی توپول‌های کلیه (پیکان سیاه) در تیمار شاهد (بدون لوامیزول)

بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی آسیب‌شناسی بافتی و ایمنی‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه‌شده با لوامیزول بود. محرک‌های ایمنی فرصت‌های جدیدی برای توسعه بهداشت و کاهش بیماری‌ها و مرگ‌ومیر در برابر استرس‌های مختلف در آبی‌پروری به وجود آورده است و تأثیر محرک ایمنی تعداد زیادی از مواد شیمیایی و طبیعی (بیولوژیکی) روی گونه‌های مختلف آبزیان گزارش شده است [20, 22]. محرک‌های ایمنی با افزایش فعالیت سیستم کمپلمان خون، مقدار فعالیت لیزوزیم سرم و کبد [23]، تولید ایمونوگلوبولین‌های بیشتر توسط لنفوسیت‌های خون [24, 25] و تأثیر بر تعداد سلول‌های سفید خون [26] باعث افزایش مقاومت ماهیان در برابر استرس‌هایی نظیر تراکم، دما و شوری شده [27] و در تولید نهایی مزارع پرورش آبزیان نقش بسزایی دارند [8, 28]. در تحقیق حاضر تأثیر محرک ایمنی لوامیزول بر سیستم ایمنی و تغییرات آسیب‌شناسی بافتی گونه مهم و بارز قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت و به‌طور کلی نقش این ماده دارویی در تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد تأیید قرار گرفت. گزارشات محققان دیگر نیز تاییدکننده نقش محرک ایمنی لوامیزول در ماهیان و همچنین عدم تأثیر این ماده بر سیستم ایمنی برخی گونه‌های دیگر ماهیان بوده است. مقصود و همکاران افزایش معنی‌دار شاخص‌های ایمنی از جمله فعالیت لیزوزیم و کمپلمان سرم ماهی کپور معمولی تغذیه‌شده با ۲۵۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا را گزارش کرده‌اند و بیان کرده‌اند که افزایش این شاخص‌های ایمنی باعث بازمانی بالای ۸۹/۶ درصدی این ماهی در برابر آلودگی تجربی با *Aeromonas hydrophila* شده است [29]. در عین حال ویجندرا و پادیرتن با افزودن ۵ میلی‌گرم لوامیزول به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره غذایی کپور هندی بی‌تأثیر بودن این ماده را بر پروتئین کل، ایمونوگلوبولین و فعالیت کمپلمان سرم گزارش نموده‌اند [13]. بنابراین محرک‌های ایمنی می‌توانند در گونه‌های مختلف تأثیرات متفاوتی را ایجاد نمایند.

در مطالعه حاضر مقادیر مختلف لوامیزول باعث تفاوت معنی‌داری در مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم در تیمارهای مختلف شد که این امر به‌ویژه در مقادیر بالای لوامیزول محسوس‌تر بود، به‌طوری‌که بیشترین مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم در انتهای دوره و در تیمار تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول مشاهده شد که با بقیه تیمارها به‌ویژه گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد. همچنین مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول به‌ویژه در پایان دوره تحقیق (روز ۶۰ با تراکم دو برابر) باعث بروز تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان قزل‌آلا نسبت به گروه شاهد شد. براساس منابع موجود، دلیل این امر تحریک افزایش گلبول‌های سفید است که

کبد و همچنین ارتقای مقدار ایمونوگلوبولین تام و فعالیت لیزوزیم سرم می‌شود.

تشکر و قدردانی: از مسئولان و کارشناسان پژوهشکده آرتیمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه و کارکنان سالن تکثیر و پرورش آزیان این پژوهشکده برای همکاری در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این طرح پژوهشی با کد ۱۱/آ/۸۶ ثبت شده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

سهم نویسندگان: سعید مشکینی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۵٪)؛ علی‌اصغر تهرانی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ فرهاد فرهنگ‌پژوه (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۵٪)؛ علی‌اکبر طافی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری (۱۵٪)

منابع مالی: این طرح با حمایت مالی پژوهشکده آرتیمیا و آبی‌پروری دانشگاه ارومیه و از محل اعتبارات پژوهشی معاونت پژوهشی اجرا شده است.

منابع

- 1- Yunxia Q, Guoliang W, Jianzhong S. A review of principal bacterial diseases of mariculture fish. Trans Oceanol Limnol. 2001;2(2):78-87. [Chinese]
- 2- Sukhoverkhov FM. The effect of cobalt, vitamin, tissue preparations and antibiotics on carp production [Internet]. Rome: FAO; 2006 [cited 2017 Oct 15]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/005/66573T/66573T33.htm>.
- 3- Cerezuela R, Cuesta A, Meseguer J, Esteban M^aÁ. Effects of dietary vitamin D₃ administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 2009;26(2):243-8.
- 4- Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 1999;172(1-2):63-92.
- 5- Guz L, Sopinska A, Oniszczuk T. Effect of Echinacea purpurea on growth and survival of guppy (*Poecilia reticulata*) challenged with *Aeromonas bestiarum*. Aquac Nutr. 2011;17(6):695-700.
- 6- Bricknell L, Dalmo RA. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 2005;19(5):457-72.
- 7- Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol. 1999;21(4):283-95.
- 8- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. Physiol Rev. 1997;77(3):591-625.
- 9- Camargo MMP, Martinez CBR. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotrop Ichthyol. 2007;5(3):327-36.
- 10- Chandrasekara HU, Pathiratne A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquac Res. 2005;36(2):144-9.
- 11- Findlay VL, Munday BL. The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis. 2000;23(6):369-78.
- 12- Gopalakannan A, Arul V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the

بافتی ماهیان انجام نشده است، اما محققان تاثیر مواد محرک ایمنی دیگر را بر آسیب‌شناسی بافتی برخی گونه‌های ماهیان مورد بررسی قرار داده‌اند، به‌طوری که نتایج تحقیق هد/یتی و همکاران نشان داده است که تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با داروی محرک ایمنی ایمونوژن (به میزان ۲ گرم در کیلوگرم غذا) باعث کاهش آسیب‌های بافتی کبد از جمله نکروز هیاتوسیت‌ها، واکوئول‌زایی سیتوپلاسمی، دژنره‌شدن هسته و ادم بین سلولی نسبت به گروه شاهد شد. این موضوع نشان می‌دهد که محرک‌های ایمنی در برخی موارد علاوه بر نقش محرک ایمنی، در جلوگیری یا کاهش آسیب‌های بافتی در اندام‌های مهمی همچون کبد نیز موثر بوده‌اند [33].

ضایعات کلیوی در بسیاری از بیماری‌های ماهی از جمله بیماری‌های باکتریایی کلیه و بیماری‌های ارتشاحی (پرولیفراتیو) کلیه شایع هستند [34]. نفريت بينابینی بين ماهی‌های مورد بررسی در این تحقیق به‌صورت نفوذ منتشر سلول‌های تک‌هسته‌ای در بافت بینابینی کلیه مشاهده شد. این تغییرات همان طور که در شکل ۳ و ۴ دیده می‌شود، در گروه شاهد و گروه‌های تحت تیمار با مقادیر پایین‌تر لوامیزول شدیدتر از بقیه تیمارها بود. تغییرات توپول‌های کلیه به‌صورت تورم سلولی و نکروز سلول‌های اپی‌تلیال مشاهده شد که می‌تواند به‌علت پرخونی و وجود تورم در ناحیه گلوامولی پدید آید و مستقیماً به‌وسیله عوامل سمی یا دارویی ایجاد شود [26]. اما نکته بارزتری که باید به آن اشاره شود، این است که ماهی‌ها دارای سیستم خونی کبدی کلیوی هستند که به آنها کمک می‌کند تا شرایط آنوکسی ایجادشده ناشی از تورم کلیوی را بهتر از موجودات دیگر تحمل کنند [35]. در نتیجه با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر و همچنین نقش لوامیزول در ارتقای سطح پاسخ‌های ایمنی و پایین‌بودن تغییرات آسیب‌شناسی بافتی این محرک ایمنی در اندام مهم و حیاتی آبشش، کبد و کلیه نسبت به گروه شاهد، استفاده از این ماده به مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی به‌عنوان محرک ایمنی و برای کاهش ضایعات بافتی توصیه می‌شود.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به نبود شرایط و امکانات لازم برای بررسی و پایش طولانی‌تر پاسخ‌های ایمنی ماهیان در برابر لوامیزول اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود از آنجایی که مدت‌زمان استفاده از محرک‌های ایمنی در آزیان یکی از موارد مهم در مقدار و نوع پاسخ ایمنی به آنها است، پژوهشگران در مطالعات آینده مدت‌زمان بیشتری را به پایش رفتار سیستم ایمنی ماهیان در برابر محرک‌های ایمنی اختصاص دهند. به دلیل اهمیت بیشتر پیشگیری نسبت به درمان و تاثیر محرک‌های ایمنی در مقاومت کردن آزیان در برابر تنش‌های محیطی و بیماری‌ها پیشنهاد می‌شود تا تاثیر محرک‌های ایمنی مختلف دیگر نیز روی سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان و دیگر گونه‌های ماهیان با ارزش اقتصادی کشور مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌شود از این محرک ایمنی با مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی برای افزایش مقاومت و کاهش تلفات ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان هنگام افزایش تراکم آنها در سیستم‌های پرورشی متراکم و فوق متراکم استفاده شود.

نتیجه‌گیری

۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کمترین آسیب‌دیدگی بافت‌های آبشش، کلیه و

- humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. *J Fish Biol.* 1987;31(sA):87-91.
- 25- Chen D, Ainsworth AJ. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel Catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J Fish Dis.* 1992;15(4):295-304.
- 26- Zapata A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev Comp Immunol.* 1979;3:55-65.
- 27- Kitao T, Yoshida Y. Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Vet Immunol Immunopathol.* 1986;12(1-4):287-96.
- 28- Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 2006;20(2):137-51.
- 29- Maqsood S, Samoon MH, Singh P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turk J Fish Aquat Sci.* 2009;9(1):111-20.
- 30- Tavakoli H, Akhlaghi M. Study of lysozyme, immunoglobulin, blood cell and hematocrit changes following experimental infection with a pathogenic *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout. *J Vet Res.* 2009;64(2):157-62. [Persian]
- 31- Sharifpour I, Zorriehzadra SJ. Histopathology of mortality in cultured rainbow trout fry in some coldwater hatcheries and fish farms of Iran. *Iran Sci Fish J.* 2006;15(1):89-100. [Persian]
- 32- Khoshnood Z, Khodabandeh S, Mosafer S, Khoshnood R. Effects of cortisol on gill chloride cells in persian sturgeon, *acipenser persicus*, fry. *Yakhteh Med J.* 2010;11(4):424-31. [Persian]
- 33- Hedayati SA, Ghafari Farsani H, Gheshlaghi P, Chardeh Baladehi E. Protective effect of commercial prebiotic Immunogen on liver histopathological lesions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*. *Aquat Physiol Biotechnol.* 2015;3(3):63-81. [Persian]
- 34- Alidadi Soleimani T, Sattari A, Kheirandish R, Sharifpour I. Safety evaluation of chloramine-T on ornamental zebra fish (*Danio rerio*) using LC50 calculation and organ pathology. *Iran J Fish Sci.* 2017;16(1):26-37.
- 35- Germuth FG Jr, Rodriguez E, Lorelle CA, Trump EI, Milano LL, Wise O. Passive immune complex glomerulonephritis in mice: Models for various lesions found in human disease. II. Low avidity complexes and diffuse proliferative glomerulonephritis with subepithelial deposits. *Lab Investig, J Tech Methods Pathol.* 1979;41(4):366-71.
- immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture.* 2006;255(1-4):179-87.
- 13- Wijendra GDNP, Pathiratne A. Evaluation of immune responses in an Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with Levamisole incorporated diet. *J Sci Univ Kelaniya Sri Lanka.* 2011;3(0):17-28.
- 14- Aly S, Abd-Allah O, Mahmoud A, Gafer H. Efficiency of Levamisole in improving the immune response of Catfish (*Clarias gariepinus*) to *Aeromonas hydrophila* vaccine: Clinic-pathological studies. *Mediterr Aquac J.* 2011;4(1):18-26.
- 15- Bureau DP, Hua K, Cho CY. Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) growing from 150 to 600g. *Aquac Res.* 2006;37(11):1090-8.
- 16- Phule AS, Annapure US. Effect of coating of hydrocolloids on chickpea (*Cicer arietinum* L.) and green gram (*Vigna radiata*) splits during deep fat frying. *Int Food Res J.* 2013;20(2):565-73.
- 17- Meshkini S, Taky AA, Tukmechi A, Farhang Pajuh F. Effect of Chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Res Forum.* 2012;3(1):49-54.
- 18- Siwicki AK, Anderson DP, Rumsey GL. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994;41(1-2):125-39.
- 19- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
- 20- Kim DH, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 2006;21(5):513-24.
- 21- Clerton P, Troutaud D, Verlhac V, Gabaudan J, Deschaux P. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: Effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2001;11(1):1-13.
- 22- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquac.* 2011;317(1-4):1-15.
- 23- Engstad RE, Robertsen B, Frivold E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* 1992;2(4):287-97.
- 24- Kitao T, Yoshida T, Anderson DP, Dixon OW, Blanch A. Immunostimulation of antibody-producing cells and