

DOI: 10.22034/AS.2022.40923.1576

پاسخ ایمنی هومورال و سلولی جوجه‌های گوشتی به تغذیه درون تخم‌مرغی بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات و دکستروزین و زمان دسترسی به اولین خوراک

رضا مسیب زاده^۱، مجید متقی طلب^۲ و حامد احمدی^۳

تاریخ دریافت: ۹۹/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۴۰۰/۱۱/۲۰

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

^۲ استاد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

^۳ استاد یار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

*مسئول مکاتبه: Email: mmotaghi@guilan.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: تزریق درون تخم‌مرغی مواد مغذی و اولین زمان دسترسی به خوراک ازجمله روش‌های ارتقای سیستم ایمنی (پاسخ‌های هومورال و سلولی) در جوجه‌های گوشتی محسوب می‌شود. هدف: به منظور تعیین پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی به تزریق درون تخم‌مرغی بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات (HMB) و دکستروزین و اولین زمان دسترسی به خوراک با استفاده از طرح باکس-بنکن این مطالعه انجام شد. روش کار: در روز ۱۸ جنینی، ۱۵۰۰ عدد تخم‌مرغ بارور سویه راس ۳۰۸ به ۱۵ تیمار آزمایشی حاصل از طرح باکس-بنکن به ۴ تکرار و ۳ سطح تغذیه درون تخم‌مرغی HMB (۰، ۰/۵ و ۱ درصد)، دکستروزین (۰، ۲۰ و ۴۰ درصد) و ۳ سطح زمان دسترسی به اولین خوراک (۶، ۲۷ و ۴۸ ساعت) اختصاص داده شدند. اندازه‌گیری ایمنی هومورال با تزریق عضلانی محلول ۲۵ درصد گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در روزهای ۷ و ۲۱ و تعیین عیار آنتی‌بادی کل علیه SRBC در روزهای ۱۴ و ۲۸ پرورش از طریق آزمایش آگلوتیناسیون انجام شد. ارزیابی ایمنی سلولی با تزریق داخل پوستی فیتوهمگلوتنین (PHA-P) در چین پوستی بال (روز ۱۵) و اندازه‌گیری ضخامت پوست بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. **نتایج:** افزایش زمان گرسنگی بعد از تفریح موجب کاهش پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شد ($P < 0.05$). تغذیه درون تخم‌مرغی HMB و دکستروزین منتج به بهبود پاسخ ایمنی هومورال اولیه ($P < 0.05$) و تزریق HMB، همزمان با اعمال گرسنگی، ایمنی هومورال اولیه و ثانویه را ارتقا داد ($P < 0.05$). با افزایش زمان گرسنگی اولیه، تزریق درون تخم‌مرغی دکستروزین و HMB موجب افزایش شاخص ازدیاد حساسیت بازوفیلی زیرجلدی در هر دو مرحله تزریق PHA-P (۲۴ و ۴۸ ساعت) و فقط تزریق دوم PHA-P (۴۸ ساعت) شد. **نتیجه گیری نهایی:** دسترسی به خوراک در کوتاه‌ترین زمان بعد از تفریح از عوامل موثر در جلوگیری از کاهش عملکرد سیستم ایمنی پرنده ارزیابی و در شرایط تأخیر در دسترسی به آب و خوراک پس از تفریح به دلایل مختلف (واکسیناسیون، تعیین جنسیت و انتقال به مزرعه)، تغذیه درون تخم‌مرغی HMB و دکستروزین می‌تواند در بهبود پاسخ ایمنی هومورال و سلولی موثر باشند.

واژگان کلیدی: پاسخ ایمنی، تغذیه درون تخم‌مرغی، جوجه گوشتی، دسترسی به اولین خوراک، طرح باکس-بنکن

مقدمه

در مراکز جوجه‌کشی تجاری، فرآیند شکسته شدن پوسته و خروج جوجه‌ها از تخم‌مرغ بطور همزمان انجام

نشده و اغلب جوجه‌ها با تأخیر تفریخ می‌شوند (توایید ۲۰۰۵). مدت زمان لازم جهت خروج تمام جوجه‌ها از تخم‌مرغ^۱ ۴۸-۲۴ ساعت است (دکاپیری و همکاران ۲۰۰۱). این زمان به اضافه سایر عملیات مربوط مانند تعیین جنسیت، واکسیناسیون و انتقال به مزرعه پرورشی منجر به افزایش بیشتر دوره گرسنگی در جوجه‌ها، حتی تا ۷۲ ساعت می‌شود (ویلسمن و همکاران ۲۰۱۰). مقدار مواد مغذی موجود در کیسه زرده برای رشد جوجه‌های تازه تفریخ شده محدود می‌باشد. به دلیل ناکافی بودن مواد ذخیره‌ای کیسه زرده و از آنجائی که سیستم ایمنی جوجه‌ها در این زمان کامل نشده، عدم دسترسی سریع به آب و خوراک طی چند روز اول بعد از خروج از تخم-مرغ موجب تلفات بالای جوجه، رشد پایین در هفته اول و کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شود. این محدودیت را می‌توان از طریق تزریق درون تخم مرغی مواد مغذی جبران کرد (ژای و همکاران ۲۰۰۸). تأخیر در دسترسی به اولین خوراک علاوه بر کاهش وزن جوجه-ها، توسعه بافت‌های ضروری مانند روده و سیستم ایمنی را محدود نموده (قناعت پرست رشتی و همکاران a, b ۲۰۱۸) که نتیجه آن بروز تلفاتی در حدود ۵ درصد در روزهای ابتدایی پرورش است (شریعتمداری ۲۰۱۲). پروتئین زرده منبع آنتی‌بادی‌های مادری است. نتایج تحقیقات نشان داده است که تغذیه آغازین موجب افزایش ایمنوگلوبولین‌ها، وزن بورس فابریسیوس و تکثیر سلول‌های لنفوسیتی در ۲۸ روزگی می‌شود (دیبینر و همکاران ۱۹۹۸). به علاوه افزودن گلوکز در آب آشامیدنی موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های گلوکونوزونیک می‌شود. به بیان دیگر تجزیه پروتئین و آنتی‌بادی‌های مفید کاهش می‌یابد (دونالدسون ۱۹۹۵).

ارزیابی چگونگی و مقدار تاثیر مواد مغذی بر پاسخ جوجه‌ها، بستگی به نوع آزمایش طراحی شده و روش‌های ریاضی-آماري مورد استفاده دارد. در اکثر مطالعات

معمولاً یک ماده منفرد مورد بررسی قرار گرفته، سایر عوامل ثابت فرض شده و از نتایج آزمایش برای تهیه ترکیب مناسب استفاده می‌شود. در واقع در چنین آزمایش‌هایی بر همکنش عوامل مورد مطالعه در نظر گرفته نمی‌شود. لذا طراحی آزمایش‌هایی با استفاده از شیوه‌های نوین ریاضی-آماري به منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش و حصول نتایج دقیق‌تر سودمند خواهد بود (احمدی و گلیان ۲۰۱۰). روش رویه پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی است که رابطه بین یک پاسخ با چندین متغیر مستقل مورد مطالعه را تعیین می‌کند. در این روش علاوه بر بررسی تأثیر هر عامل، کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند (باکس و هانتز ۱۹۵۷). طرح باکس-بنکن به عنوان یک جایگزین مناسب برای طرح فاکتوریل پیشنهاد می‌شود. این طرح اطلاعات تقریباً یکسانی را نسبت به آزمایش فاکتوریل کامل با ۳ سطح ارائه داده، در حالیکه به آزمایش‌های (تیمارهای) کمتری نیاز دارد. این مزیت کمک می‌کند تا هزینه کمتری صرف شده و شرایط آزمایشی قابل کنترل‌تر باشد (باکس و هانتز ۱۹۵۷). هدف از این تحقیق استفاده از طرح باکس-بنکن برای بررسی تأثیر تزریق درون تخم مرغی بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات و دکستروز و زمان دسترسی به اولین خوراک بر پاسخ ایمنی هومورال و سلولی جوجه‌های گوشتی است.

مواد و روش‌ها

۱۸۰۰ عدد تخم‌مرغ از مرغ مادر سویه راس ۳۰۸ (سن ۶۵ هفته) به ۶۰ گروه با میانگین وزنی $1/3 \pm 66/4$ گرم تقسیم شدند. تخم‌مرغ‌ها قبل از ورود به دستگاه جوجه‌کشی^۲ با گاز فرم آلدئید ضد عفونی و سپس توزین شدند. به منظور انجام فرآیند جوجه‌کشی، تخم‌مرغ‌ها از روز ۱ تا ۱۷ دوره جنینی در دمای ۳۷/۵ درجه سانتیگراد

³ Petersime, Zulte, Belgium

¹ Hatch window

² RSM= Response Surface Methodology

رسیده و تا ۴۲ روزگی ادامه یافت. شدت نور برای هر مترمربع تا روز دوم، ۲۰ لوکس به صورت ۲۴ ساعته و سپس به ۵ لوکس به صورت ۲۳ ساعت نور و یک ساعت خاموشی تا پایان دوره (۳ تا ۴۲ روزگی) رسانده شد. دسترسی به آب و خوراک طی دوره آزمایش ۴۲ روزه به صورت آزاد بود. جوجه‌ها با سه جیره آغازین، رشد و پایداری بر اساس نیازهای سویه راس ۳۰۸ تغذیه شدند (راهنمای جوجه گوشتی راس ۲۰۱۴). در مرحله آغازین (۱ تا ۱۰ روزگی) دان به شکل کرامبل (انرژی متابولیسمی ۲۸۵۰ کیلوکالری در کیلوگرم، پروتئین خام ۲۱/۹۲ درصد) و در مرحله رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) به شکل پلت کوتاه (۳ میلی‌متر، انرژی متابولیسمی ۲۸۸۰ کیلوکالری در کیلوگرم، پروتئین خام ۱۹/۹۷ درصد) و در مرحله پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) به شکل پلت بلند (۶ میلی‌متر، انرژی متابولیسمی ۲۹۵۰ کیلوکالری در کیلوگرم، پروتئین خام ۱۷/۹۸ درصد) استفاده گردید (قناعت پرست رشتی و همکاران ۲۰۱۸b).

برای ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال میزان ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۲۵ درصد گلبول قرمز (SRBC) در بافر فسفات در روزهای ۷ و ۲۱ دوره پرورش به عضله سینه تمام جوجه‌ها تزریق شد. در روزهای ۱۴ و ۲۸ از ورید بال دو قطعه جوجه گوشتی در هر تکرار خونگیری انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس با دور ۵۰۰۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و سرم آن‌ها پس از جداسازی تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به منظور تعیین عیار آنتی‌بادی تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند از روش هم‌گلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شد. در پایان عیار آنتی‌بادی کل سرم بدست آمده علیه گلبول قرمز براساس لگاریتم بر پایه ۲، عکس آخرین رقتی که در آن گلوتیناسیون قابل مشاهده بود، گزارش شد (اشرانک و همکاران ۱۹۹۹). به منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی

و رطوبت نسبی ۵۶ درصد در یک انکوباتور تجاری قرار گرفتند. در روز ۱۵ جنینی همه تخم‌مرغ‌ها نوربینی شده و تخم‌مرغ‌های ترک‌دار، بدون جنین و یا حاوی جنین مرده از ستر خارج شدند (کورنیزو و همکاران ۲۰۱۱). در روز ۱۸ جنینی بر اساس شیوه طرح باکس-بنکن (باکس و همکاران ۱۹۸۷) ۱۵۰۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار به ۱۵ تیمار با سه سطح تغذیه درون تخم‌مرغی بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات (صفر و ۰/۵ و ۱ درصد) و دکسترین^۲ (صفر و ۲۰ و ۴۰ درصد) در سرم نمکی استریل ۰/۹ درصد و نیز زمان دسترسی به اولین خوراک (۶، ۲۷ و ۴۸ ساعت) اختصاص داده شدند. تزریق بصورت دستی و از طریق سوراخ ایجاد شده در قسمت پهن تخم‌مرغ، با استفاده از سوزن شماره ۲۳ انجام و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌های تزریقی استریل به عمق ۱۷ میلی-متری مایع آمنیونی وارد شد (یونی و همکاران ۲۰۰۵). عمل تزریق تخم‌مرغ‌ها در اتاق جوجه‌کشی و در دمای مشابه دمای ستر صورت گرفت. بلافاصله پس از تزریق، سوراخ تخم‌مرغ‌ها با استفاده از چسب پوشانده شده (وگا و همکاران ۲۰۱۴)، تخم‌مرغ‌ها به دستگاه هچر منتقل و در دمای ۳۶/۸ سانتیگراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد تحت شرایط استاندارد تجاری قرار گرفتند (ویرا و همکاران ۲۰۰۵).

از جوجه‌های تفریخ شده هر تکرار، ۱۴ قطعه جوجه (نسبت مساوی نر و ماده) به صورت تصادفی انتخاب، توزین و به مزرعه منتقل و براساس طرح باکس-بنکن در قالب ۱۵ تیمار آزمایشی (هر تیمار دارای ۴ تکرار)، در مجموع با ۶۰ واحد آزمایشی پرورش یافتند. هر واحد آزمایشی مجهز به یک دانخوری و دو آبخوری پستانکی بوده و بستر با استفاده از تراشه چوب به ضخامت ۵ سانتی‌متر پوشانده شد. دمای هفته اول پرورش ۳۳ درجه سانتیگراد و با افزایش سن به صورت تدریجی کاهش داده شده تا به دمای ۲۲ درجه سانتیگراد در ۲۱ روزگی

³ - Sheep red blood cell (SRBC)

¹ Karen Pharma and Food Supplement Co. Iran

² Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Korea

نتایج و بحث

نتایج مربوط به اثر تزریق درون تخم مرغی مواد مورد استفاده بر قابلیت جوجه درآوری و عملکرد قبلا گزارش شده است (قناعت پرست رشتی و همکاران ۲۰۱۸a, b). بطور خلاصه، تزریق درون تخم مرغی دکستترین موجب کاهش قابلیت جوجه درآوری شد (قناعت پرست رشتی و همکاران ۲۰۱۸a). به علاوه تزریق درون تخم مرغی دکستترین و بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات در شرایط عدم دسترسی به آب و خوراک پس از تفریح موجب بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی در سن کشتار می‌شود (قناعت پرست رشتی و همکاران ۲۰۱۸a, b). نتایج مطالعات نشان داده که بر همکنش مواد مورد استفاده در تغذیه درون تخم مرغی، غلظت‌های مورد استفاده و گرسنگی بعد از تفریح بر عملکرد جوجه گوشتی تأثیرگذار بود و این برهمکنش می‌تواند سطوح بهینه تعیین شده در یک آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد (تاکو و همکاران ۲۰۰۴ و کرنیزیو و همکاران ۲۰۱۱).

مقادیر پاسخ‌های آزمون مربوط به ایمنی هومورال و سلولی بر پایه طرح باکس-بنکن در جدول ۱ و مدل‌های رویه پاسخ در جداول ۲ و ۳ توصیف شده‌اند. سطوح تغذیه درون تخم مرغی بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات و دکستترین و زمان دسترسی به اولین خوراک، ایمنی هومورال و سلولی را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۲ و ۳؛ $P < 0.05$). شایستگی برازش مدل رویه پاسخ با میزان R^2 بیان شده برای مدل پاسخ ایمنی هومورال اولیه و ثانویه به ترتیب ۰/۴۱ و ۰/۳۵ (جدول ۲) و برای مدل شاخص ازدیاد حساسیت بازوفیلی زیر جلدی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق فیتوهمگلوتنین (PHA-P) به ترتیب برابر ۰/۷۵ و ۰/۵۵ بدست آمد (جدول ۳). این اعداد نشان می‌دهند که چند درصد از واریانس موجود در پاسخ‌های ایمنی مشاهده شده توسط متغیرهای ورودی قابل توجیه است. مقدار انواع اثرات خطی، توان دوم و متقابل مربوط به متغیرهای ورودی نشان می‌دهد که در مدل پاسخ

سلولی در روز ۱۵ پرورش، از هر تکرار دو قطعه جوجه انتخاب و ۰/۲ میلی لیتر از محلول فیتوهمگلوتنین (PHA-P) با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر و ۰/۲ میلی لیتر از بافر فسفات بترتیب به چین پوستی بال چپ و بال راست به صورت داخل پوستی تزریق و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت ضخامت پوست به وسیله کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد. اختلاف در ضخامت ایجاد شده نشان دهنده شاخص ازدیاد حساسیت بازوفیلی زیرجلدی بود (روستائی‌علی-مهر و همکاران ۱۳۹۱).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایشی مطابق آزمایش بهینه طرح باکس-بنکن جمع آوری شد. براساس مدل آماری رویه پاسخ معادله پایه مورد استفاده برای صفات، مدل استاندارد چند جمله‌ای توان دوم به شکل زیر بود (باکس و همکاران ۱۹۸۷):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon$$

در معادله بالا $\bar{y}$ پاسخ مورد مطالعه یا خروجی مدل، k تعداد متغیرهای ورودی ($k=3$)، x_i و x_j متغیرهای ورودی، β_0 عرض از مبدا یا ضریب ثابت، β_i ضریب خطی بر متغیر، β_{ij} ضریب اثر متقابل بر متغیرها، β_{ii} ضریب توان دوم بر متغیر و ε نشان‌دهنده مقدار باقیمانده مدل است. مجموعه کل داده‌های آزمایشی (۱۲۰ خط داده) با استفاده از رویه RSREG در نرم‌افزار SAS برازش داده شد (۲۰۱۱). از جدول تجزیه واریانس به منظور رتبه بندی متغیرها (بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات و دکستترین و زمان دسترسی به اولین خوراک پس از تفریح) از نظر اهمیت آنها بر خروجی مدل ساخته شده استفاده شد. هرکدام از اجزا (شامل اثر خطی، توان دوم و یا اثر متقابل مربوط به متغیرهای ذکر شده) که t محاسبه شده بیشتری دارند اهمیت بیشتری در خروجی مدل دارند (باکس ۱۹۸۷).

ایمنی هومورال اولیه و ثانویه اجزا مربوط به اثر توان دوم ($R^2 = 0.24$) و اثر خطی ($R^2 = 0.17$) به ترتیب بیشترین اثر را دارند (جدول ۲). در مدل شاخص حساسیت بازوفیل‌های زیر جلدی اجزا مربوط به اثر خطی بیشترین اثر را طی ۲۴ ($R^2 = 0.60$) و ۴۸ ($R^2 = 0.38$) ساعت پس از تزریق فیتوهمگلوتنین (PHA-P) نشان داد (جدول ۳). آزمون فرضیه، اهمیت استفاده از متغیرها

و ضرایب‌ها را بیان می‌کند. براساس جداول ۲ و ۳ مقادیر مربوط به عدم برازش برای هر چهار صفت معنی دار بود ($P < 0.05$). این امر نشان می‌دهد که روش مدل‌سازی پیچیده‌تر و یا متغیرهای آزمایشی بیشتری برای رسیدن به مدل‌های قوی‌تر و نتایج دقیق‌تر به منظور رسیدن به نتیجه‌گیری بهتر و کلی‌تر مورد نیاز است (بکس ۱۹۸۷).

Table 1- Box-Behnken design points and values of results on broiler's humoral and cellular immune response (mean $\pm$ SD*)

Treatment no.	No. of Replication	Input factors			Humoral immune response (log ₂)		Cellular immune response (mm)	
		HMB** (%)	Dextrin (%)	fasting (hour)	primary response (14 days)	Secondary response (28 days)	24 hour post-inject (PHA-P)	48 hour post-inject (PHA-P)
1	8	0.5	0	6	2.5 $\pm$ 0.54	5.5 $\pm$ 0.54	0.79 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.14
2	8	0.5	40	6	3.38 $\pm$ 0.52	4.75 $\pm$ 0.46	0.97 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.13
3	8	0.5	0	48	3.25 $\pm$ 0.46	4.75 $\pm$ 0.46	0.62 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.06
4	8	0.5	40	48	3.88 $\pm$ 0.84	5.25 $\pm$ 0.46	0.97 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.13
5	8	0	0	27	2.5 $\pm$ 0.54	4.25 $\pm$ 0.46	0.5 $\pm$ 0.11	0.43 $\pm$ 0.08
6	8	1	0	27	2.38 $\pm$ 0.52	5.5 $\pm$ 0.76	0.87 $\pm$ 0.13	0.72 $\pm$ 0.14
7	8	0	40	27	2.88 $\pm$ 0.64	4.88 $\pm$ 0.35	0.83 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.10
8	8	1	40	27	3.5 $\pm$ 0.76	5.88 $\pm$ 0.64	1.05 $\pm$ 0.12	0.71 $\pm$ 0.12
9	8	0	20	6	3 $\pm$ 0.76	5.63 $\pm$ 0.64	0.92 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.08
10	8	0	20	48	3.13 $\pm$ 0.64	5 $\pm$ 0.76	0.55 $\pm$ 0.07	0.57 $\pm$ 0.06
11	8	1	20	6	3.63 $\pm$ 0.64	5.38 $\pm$ 0.32	1.25 $\pm$ 0.10	0.99 $\pm$ 0.17
12	8	1	20	48	2.38 $\pm$ 0.52	6.13 $\pm$ 0.64	0.83 $\pm$ 0.09	0.67 $\pm$ 0.10
13	24	0.5	20	27	3.96 $\pm$ 0.62	5.29 $\pm$ 0.62	0.70 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.08

*Standard Error of mean

**Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

Table 2- ANOVA for response surface models of broiler's humoral immune response at 14-28 days of age

Humoral immune response model							
Source of variation	df	primary response (14 days)			Secondary response (28 days)		
		Sum of squares	of R2	P-value	Sum of squares	R2	P-value
Linear	3	9.156	0.111	0.0003	10.344	0.166	< 0.0001
Quadratic	3	19.565	0.238	< 0.0001	4.198	0.067	0.0129
Cross-product (interaction)	3	5.031	0.061	0.0124	7.031	0.113	0.0006
Total model (regression)	9	33.752	0.410	< 0.0001	21.573	0.345	< 0.0001
Lack of fit	3	6.031		0.0026	3.594		0.0196
Pure error	107	42.583			37.333		
Total error	110	48.615			40.927		

Table 3-ANOVA of results from response surface models of broilers cellular immune response at 16 and 17 days of age

(PHA-P) Cellular immune response model	
--	--

Source of variation	df	24 hours after phytohemagglutinin injection (16 days)			48 hours after phytohemagglutinin injection (17 days)		
		Sum of squares	R2	P-value	Sum of squares	R2	P-value
Linear	3	3.038	0.596	< 0.0001	1.274	0.375	< 0.0001
Quadratic	3	0.644	0.126	< 0.0001	0.300	0.088	0.0002
Cross-product (interaction)	3	0.143	0.028	0.0083	0.279	0.082	0.0004
Total model (regression)	9	3.825	0.750	< 0.0001	1.853	0.545	< 0.0001
Lack of fit	3	0.282		< 0.0001	0.322		< 0.0001
Pure error	107	0.994			1.227		
Total error	110	1.276			1.550		

Table 4- Estimated parameters of second-order response surface models for broiler's humoral immune response at 14 and 28 days of age

Humoral immune response at 14 days of age					Humoral immune response at 28 days of age					
Quadratic model Term	Estimated parameter from raw data	SE*	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data	Estimated parameter from raw data	SE*	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data
Intercept	1.631	0.341	4.78	< 0.0001	3.958	5.588	0.313	17.84	< 0.0001	5.292
Fasting	0.0501	0.017	2.88	0.0048	0.0156	-0.043	0.016	-2.68	0.0084	-0.0156
Dextrin	0.060	0.016	3.72	0.0003	0.375	0.020	0.015	1.32	0.1891	0.0938
HMB**	3.332	0.643	5.18	< 0.0001	0.0469	-0.582	0.590	-0.99	0.3263	0.3906
Fasting × Fasting	-0.0006	0.0003	-2/00	0.0478	-0.2448	0.0002	0.0003	0.79	0.4319	0.0885
Fasting × Dextrin	-0.0002	0.0003	-0.53	0.5959	-0.0625	0.0007	0.0003	2.90	0.0045	0.3125
Fasting × Dextrin	-0.001	0.0003	-3.79	0.0002	-0.4635	-0.0008	0.0003	-2.83	0.0055	-0.3177
HMB × Fasting	-0.033	0.011	-2.93	0.0042	-0.3438	0.033	0.010	3.19	0.0019	0.3438
HMB × Dextrin	0.019	0.012	1.60	0.1135	0.1875	-0.006	0.011	-0.58	0.5634	-0.0625
HMB × HMB	-2.729	0.4893	-5.58	< 0.0001	-0.6823	0.604	0.449	1.35	0.1811	0.151
Beta-hydroxy beta-methylbutyrate **					Standard Error of mean*					

ضرایب برآورده شده برای مدل پاسخ ایمنی هومورال در ۲۸ روزگی (جدول ۴) می‌توان نشان داد که اثر خطی گرسنگی و اثرات متقابل دکسترتین × گرسنگی و HMB × گرسنگی و اثر توان دوم دکسترتین × دکسترتین بر مدل پاسخ ایمنی هومورال در ۲۸ روزگی معنی‌دار ($P < 0.05$) و بیشترین تأثیر در برازش اصلی مدل مربوط به اثر HMB × گرسنگی بود ($|t - value| = 3.19$). با توجه به جدول ۵، معادله چند جمله‌ای درجه دوم برازش شده بر اساس داده‌های آزمایشی خام برای صفت عیار آنتی‌بادی کل (ایمنی هومورال) در ۱۴ و ۲۸ روزگی به صورت زیر قابل بیان است:

برآورد ضرایب رگرسیون و مقادیر t در جداول ۴ و ۵ نشان داده شده است. شاخص‌های برآورده شده از مدل پاسخ ایمنی هومورال در ۱۴ روزگی (جدول ۴) نشان داد که تأثیر اجزای خطی گرسنگی، دکسترتین، HMB، اثرات توان دوم گرسنگی × گرسنگی، دکسترتین × دکسترتین و HMB × HMB و اثر متقابل HMB × گرسنگی بر مدل معنی‌دار بوده ($P < 0.05$)، همچنین با بررسی مقدار قدر مطلق t می‌توان پی برد که بیشترین تأثیر در برازش نهایی مدل مربوط به اثر توان دوم HMB × HMB می‌باشد ($|t - value| = 5.58$).

$$\begin{aligned} 0.059 = & \text{ایمنی هومورال در ۲۸ روزگی (لگاریتم در مبنای ۲)} \\ & - (0.058 \times \text{HMB}) - (0.02 \times \text{دکستروز}) + (0.04 \times \text{گرسنگی}) \\ & + (0.0002 \times \text{گرسنگی} \times \text{گرسنگی}) + (0.0007 \times \text{دکستروز} \times \\ & \text{دکستروز}) + (0.03 \times \text{دکستروز} \times \text{دکستروز}) - (0.0008 \times \text{گرسنگی} \\ & \text{HMB} \times \text{گرسنگی}) - (0.006 \times \text{HMB} \times \text{دکستروز}) + (0.60 \\ & \times \text{HMB} \times \text{HMB}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{پاسخ ایمنی هومورال در ۱۴ روزگی (لگاریتم در مبنای ۲)} \\ = & 1/63 + (0.05 \times \text{گرسنگی}) + (0.06 \times \text{دکستروز}) + (3/33 \\ & \times \text{HMB}) - (0.0006 \times \text{گرسنگی} \times \text{گرسنگی}) - (0.0002 \times \\ & \text{دکستروز} \times \text{دکستروز}) - (0.001 \times \text{گرسنگی} \times \text{دکستروز}) - \\ & (0.03 \times \text{HMB} \times \text{گرسنگی}) + (0.02 \times \text{HMB} \times \text{دکستروز}) - \\ & (2/73 \times \text{HMB} \times \text{HMB}) \end{aligned}$$

Table 5- Estimated parameters of second-order response surface models for broilers Cellular immune response at 16 and 17 days of age

Quadratic model Term	Cellular immune response at 16 days of age					Cellular immune response at 17 days of age				
	Estimated parameter from raw data	SE*	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data	Estimated parameter from raw data	SE*	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data
Intercept	0.850	0.055	15.37	< 0.0001	0.6942	0.528	0.061	8.66	< 0.0001	0.5764
Fasting	-0.020	0.003	-7.08	< 0.0001	-0.108	-0.011	0.003	-3.66	0.0004	-0.0340
Dextrin	0.003	0.003	1.25	0.2143	0.1290	0.004	0.003	1.43	0.1563	0.8593
HMB**	0.065	0.104	0.62	0.5338	0.1386	0.345	0.115	3.01	0.0033	0.1066
Fasting × Fasting	0.0003	0.00005	6.02	< 0.0001	0.1193	0.0002	0.00005	4.38	< 0.0001	0.0956
Dextrin × Fasting	0.00010	0.00005	2.17	0.0318	0.0414	0.00007	0.00005	1.47	0.1437	0.0309
Dextrin × Dextrin	0.000006	0.00005	1.21	0.2304	0.0239	0.00002	0.00006	0.34	0.7353	0.0074
HMB × Fasting	-0.004	0.002	-1.95	0.0541	0.0371	-0.007	0.002	-3.44	0.0008	-0.0722
HMB × Dextrin	-0.004	0.002	-1.95	0.0536	0.0372	-0.005	0.002	-2.41	0.0176	-0.0506
HMB × HMB	0.382	0.079	4.82	< 0.0001	0.0954	0.155	0.087	1.77	0.0789	0.0387

*Standard Error of mean

**Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

دکستروز × گرسنگی و اثرات متقابل HMB × گرسنگی و اثر توان دوم دکستروز × دکستروز بر مدل پاسخ ایمنی سلولی در ۱۷ روزگی معنی‌دار بوده ($P < 0.05$) و با توجه به مقادیر قدر مطلق t بیشترین تأثیر در برازش اصلی مدل مربوط به اثر توان دوم گرسنگی بود ($= 4/38$) $|t - value|$.

شاخص ازدیاد حساسیت بازوفیلی زیرجلدی بعد از ۲۴ ساعت (۰/۰۰۳ + (گرسنگی × ۰/۰۲) - ۰/۸۵ = (میلی متر) × گرسنگی × ۰/۰۰۰۳ + (HMB × ۰/۰۷) + (دکستروز × ۰/۰۰۰۱) + (گرسنگی × دکستروز × ۰/۰۰۰۱) + (گرسنگی

ضرایب برآورده شده برای مدل پاسخ ایمنی سلولی در ۱۶ روزگی و مقادیر قدر مطلق t نشان می‌دهد (جدول ۵) که در میان متغیرهای مورد بررسی اثر خطی گرسنگی و اثرات متقابل دکستروز × گرسنگی و اثر توان دوم HMB و اثر توان دوم گرسنگی در بین نتایج تیمارها معنی‌دار بودند ($P < 0.05$) و بیشترین تأثیر در برازش اصلی مدل مربوط به اثر گرسنگی می‌باشد ($= 7/08$) $|t - value|$. همچنین با مطالعه ضرایب برآورده شده برای مدل پاسخ ایمنی سلولی در ۱۷ روزگی (جدول ۵) می‌توان پی برد که اثر خطی گرسنگی و اثرات متقابل

در تخم‌های بوقلمون در روز ۲۵ انکوباسیون، عیار آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن گلوبول قرمز گوسفندی (ایمنی هومورال) را در روز ۲۸ پس از تفریح افزایش داده، اما اثری بر ایمنی سلولی نداشت (باتاچاریا و همکاران ۲۰۰۷). در مقابل، محققان دیگر گزارش دادند که تغذیه درون تخم‌مرغی کربوهیدرات‌هایی مثل فروکتوز یا ریبوز پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را در جوجه‌های گوشتی بهبود و در عین حال نوع کربوهیدرات‌ها می‌تواند اثرات متفاوتی بر ایمنی طیور داشته باشد (بهانجا و همکاران ۲۰۱۴). فویه و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش کردند که تزریق HMB و کربوهیدرات‌ها در تخم بوقلمون منجر به تأثیر مثبت بر روی پاسخ ایمنی هومورال شد که با یافته‌های تحقیق حاضر انطباق دارد. نتایج مطالعه تاکو و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که استفاده از HMB سبب افزایش پاسخ ایمنی شده است. تحقیقات اومرهاکان و همکاران (۲۰۱۶) نیز حاکی از آن است که تزریق HMB مقاومت جوجه‌ها را در برابر بیماری‌های عفونی افزایش داده و در افزایش سطح آنتی‌بادی در ۸ هفته دوره زندگی مرغ گوشتی اثر مثبت داشته است.

نتیجه گیری کلی

تغذیه آغازین در کوتاه‌ترین زمان بعد از تفریح از متغیرهای مهم در معادله سیستم متوازن ایمنی پرنده محسوب می‌شود. در صورت تأخیر در دسترسی به اولین زمان مصرف آب و خوراک که ممکن است ناشی از واکسیناسیون، تعیین جنسیت و حمل و نقل به مزرعه پرورش باشد، تغذیه درون تخم‌مرغی بتا‌هیدروکسی بتامتیل بوتیرات و دکستروزین می‌تواند موجب کاهش اثرات منفی و بهبود پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شود. به علاوه طرح باکس - بنکن برای انجام آزمایش‌های با کمترین تیمار، به عنوان روشی مناسب برای توضیح نوع رابطه بین تغذیه درون تخم‌مرغی مواد مغذی و دسترسی به اولین خوراک بر پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی محسوب می‌شود.

- (گر سنجی $\times$ HMB $\times$ ۰/۰۰۴) - (دکستروزین $\times$ دکستروزین $\times$ HMB) + (دکستروزین $\times$ HMB $\times$ ۰/۰۰۴)
شاخص ازدیاد حساسیت بازوفیلی زیرجلدی بعد از ۴۸
۰/۰۰۴ + (گر سنجی $\times$ ۰/۰۱) - ۰/۵۳ = ساعت (میلی متر)
 $\times$ گرسنجی $\times$ ۰/۰۰۰۲ + (HMB $\times$ ۰/۳۵) + (دکستروزین $\times$ گرسنجی $\times$ ۰/۰۰۰۰۷) + (گر سنجی $\times$ HMB $\times$ ۰/۰۰۰۰۲) - (دکستروزین $\times$ دکستروزین $\times$ ۰/۰۰۰۰۲) + (HMB $\times$ ۰/۱۶) + (دکستروزین $\times$ HMB $\times$ ۰/۰۰۵) - (گر سنجی $\times$ HMB)
افزایش گرسنجی اولیه موجب کاهش پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شد ($P < ۰/۰۵$). گزارش محققان حاکی است که عوامل تغذیه‌ای در طیور با بررسی سیستم ایمنی هومورال حاصل از تزریق SRBC مرتبط است (مقصودی و همکاران ۲۰۲۰). محرومیت جوجه‌ها از خوراک پس از تفریح موجب بروز تنش و ترشح کورتیکواستروئیدها در آن‌ها شده و مانع رشد مناسب سلول‌های ایمنی می‌گردد. بنابراین افزایش ایمنی در جوجه‌ها با اولین زمان مصرف خوراک وابسته بوده، موجب تکامل ایمنی اکتسابی شده و پرنده را در برابر عوامل بیماری‌زا از طریق دستگاه تنفسی که از جمله راه‌های اصلی ورود آلودگی است، محافظت می‌نماید (ایی و همکاران ۲۰۰۵). تغذیه با جیره‌های نامتعادل، پاسخ اولیه به SRBC را کاهش داده و پاسخ ثانویه به SRBC را در ۸ هفته‌گی در پرنده‌گانی که تا ۵ هفته دارای کمبود غذایی بودند را سرکوب می‌کند (کید ۲۰۰۴).

تغذیه درون تخم‌مرغی HMB و دکستروزین موجب بهبود پاسخ ایمنی هومورال اولیه شده ($P < ۰/۰۵$)، در شرایط اعمال گرسنجی اولیه، تزریق درون تخم‌مرغی HMB هر دو پاسخ ایمنی هومورال اولیه و ثانویه را ارتقا می‌دهد ($P < ۰/۰۵$). در صورت افزایش زمان گرسنجی اولیه، تزریق درون تخم‌مرغی دکستروزین و HMB موجب افزایش شاخص ازدیاد حساسیت بازوفیلی در هر دو مرحله تزریق (۲۴ و ۴۸ ساعت) و زیرجلدی فقط در تزریق دوم (۴۸ ساعت) شد. نتایج تحقیقات نشان داده است که تغذیه درون تخم‌مرغی یک میلی‌لیتر محلول گلوکز ۱۰ درصد

منابع مورد استفاده

- Ahmadi H and Golian A, 2010. The integration of broiler chicken threonine responses data into neural network models. *Poultry Science* 89: 2535-2541.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS and Escalera LA, 2008. Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977.
- Bhanja SK, Goel A, Pandey N, Mehra M, Majumdar S and Mandal AB, 2014. In ovo carbohydrate supplementation modulates growth and immunity related genes in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99: 163-173.
- Bhattacharyya A, Majumdar S, Bhanja SK, Mandal AB, Dash BB and Agarwal SK, 2007. In ovo injection of glucose supports immune competence and development of digestive organs in turkey poults. 16th European Symposium on Poultry Nutrition 147-150.
- Box GE and Hunter JS, 1957. Multi-Factor experimental design for exploring response Surfaces. *Annals Mathematical Statistics* 28(1):195-241.
- Box GEP, Hunter WG and Hunter JS, 1987. *Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis and model building*. Wiley, New York.
- Decuyper E, Tona K, Bruggeman V and Bamelis F, 2001. The day-old chick, a crucial hinge between breeders and broilers. *World's Poultry Science Journal* 57: 127-138.
- Dibner JJ, Knight CD, Kitchell ML, Atwell CA, Downs AC and Ivey FJ, 1998. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *Applied Poultry Research* 7: 425-436.
- Donaldson WE, 1995. Carbohydrate, hatchery stressors affect poult survival. *Feedstuffs* 67: 6-17.
- Foye OT, Uni Z and Ferket PR, 2006. Effects of in Ovo feeding egg white protein, β -hydroxy β -methyl butyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poultry Science* 85: 1185-1192.
- Ghanaatparast Rashti M, Mottaghitalab M and Ahmadi H, 2018a. In ovo feeding of nutrients and its impact on post hatching water and feed deprivation up to 48 hr, energy status and jejunal morphology of chicks using response surface models. *Animal Physiology and Animal Nutrition* 102(2): 806-817.
- Ghanaatparast Rashti M, Mottaghitalab M and Ahmadi H, 2018b. In ovo feeding of betahydroxy beta-methylbutyrate and dextrin optimized growth performance of broiler for preplacement holding time using the BoxBehnken response surface design. *Animal Physiology and Animal Nutrition* 102(6): 1543-1552.
- Kidd MT, 2004. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science* 83: 650-657.
- Kornasio R, Halevy O, Kedar O and Uni Z, 2011. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. *Poultry Science* 90:1467-1477.
- Roustai Ali Mehr M, Haghighian Roudsari M, Mansori B and Nikbakht Broujeni GR, 2012. Effects of oral levamisole hydrochloride on cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Journal of Veterinary Research* 67: 235-241. (In Persian).
- Montgomery DC, 1997. *Design and Analysis of Experiments*. Wiley. New York.
- Ömer Hakan M, Salman M, Gacar A, Akdag F, Yavuz Gulbahar M, Ciftci A, Emek Onuk E, Karadas F and Eseceli H, 2016. In ovo feeding with β -hydroxy β -methyl butyrate and broiler performance, intestinal health, and immunity status. *Veterinary and Animal Sciences (Turkish)* 40: 28-33.
- Maghsoudi A, Vaziri E, Feizabadi M and Mehri M, 2020. Fifty years of sheep red blood cells to monitor humoral immunity in poultry: a scientometric evaluation. *Poultry Science* 99: 4758-4768.
- Ross, 2014. Ross 308 Broiler Nutrition Specifications. Pp. 6. (1sted.). Ross Broiler Ltd., Scotland, UK.
- SAS Institute, 2011: *SAS statistics user's guide*. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schrank-Candy S, Cook-Mark E, Hansen-Wallace R, 1999. Immune response of mallard ducks related with immunosuppressive agents: antibody response to erythrocytes and in vivo response to phytohemagglutinin-P. *Wildlife Diseases* 26: 307-315.
- Shariatmadari F, 2012. Plans of feeding broiler chicken. *World's Poultry Science Journal* 68: 21-30.
- Tako E, Ferket PR and Uni Z, 2004. Effects of In ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poultry Science* 83: 2023-2028.
- Tweed S, 2005. *The Hatch Window*. Cobb-Vantress Technical Focus. Vol. 2. Siloam Springs, Arkansas.

- Uni Z, Ferket PR, Tako E and Kedar O, 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science* 84: 764-770.
- Vega RS, Remoral DMS, Lontoc CAA, Octura JER, Iranzo MFM and Capitan SS, 2014. Effects of betabenzene hexachloride in-ovo on the embryonic growth and development of domestic mallard ducks (*Anas platyrhynchos domesticus* L.). *Veterinary Medicine and Animal Sciences* 2: 1-6.
- Vieira SL, Almeida JG, Lima AR, Conde ORA and Olmos AR, 2005. Hatching distribution of eggs varying in weight and breeder age. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 7: 73-78.
- Willemsen H, Debonne M, Swennen Q, Everaet N, Careghi C, Han H, Bruggeman V, Tona K and Decuypere E, 2010. Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. *World Poultry Science Journal* 66:177-188.
- Yi G, Allee G, Knight C and Dibner J, 2005. Impact of glutamine and oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. *Poultry Science* 84(2): 283-293.
- Zhai W, Neuman S, Latour MA and Hester PY, 2008. The Effect of in ovo injection of L- carnitine on hatchability of white leghorns. *Poultry Science* 87: 569-572.

Effect of *in-ovo* feeding of beta-hydroxy beta-methylbutyrate, dextrin and first access to feed on humoral and cellular immune responses of broilers

R Mosayebzadeh¹, M Mottaghtalab^{2*} and H Ahmadi³

Received: July 23, 2020 Accepted: February 9, 2022

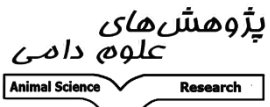
Received: July 23, 2020 Accepted: February 9, 2022

¹MSc student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran

³Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Moddares, Iran

Corresponding author: E mail: mmotaghi@guilan.ac.ir

 پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research	Journal of Animal Science/vol.31 No.4/ 2022/pp 59-71 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	 OPEN ACCESS
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2022.40923.1576		

Introduction: The time between the first and the last chick hatching is called the hatch window and the time required for all eggs to hatch is between 24 and 48 hours (Decuyper et al. 2001). In addition, processes such as sex determination, vaccination, and on-farm transfers require more time, resulting in hatched chicks not being able to access water and feed for 72 hours (Willemsen et al. 2010). Post-hatch fasting leads to high chicken mortality, low growth in the first week and a reduction in disease resistance, due to insufficient storage of yolk sac and incomplete immune system of birds in this period. Zhai et al. suggested the use of *in-ovo* feeding (IOF) to overcome the issues (Zhai et al. 2008). The *in-ovo* injection of nutrients around days of 17 to 18, called *in-ovo* feeding (Foye et al 2006), supplies the embryo with additional nutrients via amniotic fluid prior hatching and those nutrients continue to be utilized by the chick post-hatch during this fasting period. Yolk protein is a source of maternal antibodies. The results of the research suggest that IOF increases immunoglobulins, weight of bursa of fabricius, and lymphocyte proliferation on 28 days of age (Dibnere et al 1998). Studies have reported that drinking glucose containing water leads to decrease in gluconeogenic enzymes thus reducing the proteins breakdown as well as beneficial antibodies (Donaldson 1995). In most studies, egg is inoculated with a single nutrient, while assuming other factors to be constant. In such studies, the interrelationships between factors are ignored. Therefore, designing experiments using modern statistical mathematical methods to optimize test conditions and obtain more accurate results will be useful (Ahmadi and Golian 2010). Response surface methodology (RSM), a useful set of statistical and mathematical procedures, can be employed 1) to survey responses from the combinations of factors for searching optimum results, 2) to optimize the interactions between factors and their levels, and 3) to reduce investigation costs. Additionally, not only that the effect of each factor can be examined by RSM but also all coefficients of the quadratic regression model and the interaction of factors can be estimated. Box-Behnken design (BBD) is a multivariate experimental design, where multiple factors are studied simultaneously. The BBD is considered to be more efficient than full factorial designs, because it requires a significantly smaller number of treatments and allows researchers to estimate and optimize processes (Box and Hunter 1957). In this study, we aimed to determine the immune response of broilers to *in-ovo* feeding of beta-hydroxy beta-methylbutyrate (HMB) and dextrin and the first time of access to feed using Box-Behnken design.

Material and methods: A total of 1800 fertile eggs of 65 weeks-old broiler breeders were obtained from a commercial broiler breeder flock (Ross 308, Sepidrood, Rasht, Iran) and stored under commercial conditions for two days before incubation. Eggs were weighed, and those within a similar weight distribution (66.4 ± 1.3 g) were randomly distributed into 60 groups of 30 eggs. Eggs were then incubated in a commercial hatchery at 37.5°C and 56% relative humidity. On the 15th day of incubation all eggs were candled and cracked. Then, unfertilized or dead embryo containing eggs were discarded (Kornasio et al. 2011). On the 18th day, 1500 eggs were randomly assigned into 15 treatments based on a Box-Behnken design (Box et al. 1987) with four replicates and three levels of *in-ovo* administration of beta-hydroxy beta-methylbutyrate (0, 0.5 and 1.0%) and dextrin (0, 20 and 40%) in a 0.9% saline, along with the first feeding (6, 21 and 48 h). The injection was performed manually through a hole made in the wide part of the egg, using needle number 23 and injection of 0.5 mL of sterile solution, which was inserted to a depth of 17 mm of amniotic fluid (Uni et al. 2005). From the hatched chicks of each replication, 14 chicks (equal ratio of male and female) were randomly selected, weighed, and transferred to the farm. According to box-Benken design, chicks were allocated in one of 15 experimental treatments (each treatment with four replications, rearing 60 experimental units). Access to water and food was free during the 42-day trial period. Chickens were fed three diets of starter, grower, and finisher based on the Ross 308 strain nutrients requirement (Ross Broiler Guide 2014). Feed form and its composition were used in the form of crumble with a 2850 kcal/kg metabolizable energy and 21.92% crude protein) during starter period (1 to 10 days), in pellet form (3 mm) with 2880 kcal/kg metabolic energy and 19.97% crude protein during grower period (11 to 24 days) and in pellet form (6 mm) with 2950 kcal/kg metabolic energy and 17.98% crude protein during finisher (25 to 42 days) period (Ghanaatparast et al. 2018 a,b). Experimental data (60 data lines) gained by BBD were fitted to the second-order polynomial equation by SAS through the RSREG procedure. A ridge analysis (Draper, 1963, SAS Institute 2011) was used to compute the optimal response for TPB and PPB maximization (RIDGE MAX procedure in SAS). Using ANOVA and corresponding absolute *t*-value of the model parameters, a process of the sensitivity analysis was performed on developed RSM models to find which model term is considered more important throughout the modeling process (Box et al. 1987).

Results and discussion: Increasing the time of the first access to feed and post hatch fasting reduced the humoral and cellular immunity ($P < 0.05$). *In-ovo* feeding of HMB and dextrin improved primary humoral immune response ($P < 0.05$). *In-ovo* feeding of HMB and dextrin resulted in improved primary humoral immune response ($P < 0.05$), and *in-ovo* injection of HMB enhanced primary and secondary humoral immune response simultaneously with fasting. By increasing fasting time, *in-ovo* feeding of HMB and dextrin increased the cutaneous basophilic hypersensitivity response in both times of PHA-P injection (24 and 48 hours) and the second injection of PHA-P (48 hours), respectively. Limited access to the post-hatch feed causes stress and corticosteroid secretion and prevents the proper growth of immune cells. Therefore, increased immunity in chickens depends on the first access to feed, during which the acquired immunity is strengthened, and the bird is protected against pathogens through the respiratory tract, known as the source of infection (Yi et al. 2005). The interaction between inoculated nutrients and their concentrations in egg, as well as post hatch starvation affected broiler's performance and such interactions can affect the optimal levels determined in an experiment (Tako et al. 2004; Kornasio et al. 2011). In general, injections of carbohydrates such as fructose or ribose have shown to improve the humoral and cellular immune response in broilers, and of course the extent of the effect on the poultry immune system depends on the type of carbohydrate (Bhanja et al. 2014).

Conclusion: The first access of day-old chick to feed is considered as effective factor to prevent declined bird's immune system function. If access to water and feed is delayed during post-hatch (for reasons such as vaccination, sex determination, and transport to farm), *in-ovo* feeding of HMB and dextrin can effectively improve the humoral and cellular immune response. The Box-Benken design

for minimally invasive experiments is a good method to explain the relationship between *in-ovo* feeding of nutrients and the first access to feed on the immune response of broilers.

Keywords: Broilers, Box-Behnken design, first feeding access, Immune response, *In-ovo* feeding