

University of Mosul
College of Veterinary Medicine



Evaluation of Some Immunological Parameters Associated with Infectious Bronchitis Vaccines in Broilers

Nashwan Burhan Kareem Murad

MSc. / Thesis

Veterinary Medicine / Microbiology

Supervised by

Professor

Dr. Ammar Mahmood Al-Aalim

Abstract

Avian infectious bronchitis virus (IBV) continues to cause serious economic losses in global chicken production. Concurrent circulation of both classic and variant IBVs have been identified in most parts of the world, raising major challenges to global prevention and control efforts. Which mostly affects chickens and targets their respiratory system, kidneys, and reproductive tract.

This study compares the immunological responses of broiler chickens inoculated with two types of IB vaccines. First, we examined for the antibody titers to the IB virus in the vaccinated broilers to confirm the humoral immune response. Second, the expression of Toll-like receptors 3 (TLR3) and Toll-like receptors 7 (TLR7) was measured in addition to the housekeeping gene β -actin in several tissues to assess preferential activation of the innate immune system. Third, IL-6 (interleukin 6), which is a pro-inflammatory cytokine, was also determined as a cytokine-mediated response. Finally, the gene expression patterns were compared in tissues to dissect the tissue-specific immune responses induced by each vaccine. The 160-day-old Ross 308 broiler chicks were divided into four groups, with 40 chicks in each group. The groups analyzed include G1, which is the control group; G2, which was vaccinated with the classical Ma5 strain; G3, which was vaccinated with the variant 4/91 strain; and G4, which was vaccinated with the combination of Ma5 and 4/91 strains. Vaccines were given on day one and boosted on day fourteen. All blood samples were collected to obtain serum on days 1, 7, 14, 21, and 28 pre and post-vaccination blood samples were used to detect IBV antibodies and chicken (chIL6). All experimental groups were tested for variation of IB antibody and IL-6 levels by using ELISA. Then trachea and kidney samples were taken at 1, 3, 7, 14, 16, and 21 days' pre and post vaccination

to measure TLR3 and TLR7 gene expression with qPCR using specific primers.

There was a substantial rise in IBV-specific antibody titers on day 28 after vaccination, especially in group G3 (variant 4/91) and group G4 (combined vaccine), which reach up to 3765 ± 2.12 and 2876.2 ± 1.91 respectively. Significantly, chIL6 levels in vaccinated groups increased further; on day 14, group G2 reached a peak of 63.49 ± 3.12 , indicating a critical role in the shift from humoral to cellular immunity after booster administration.

All vaccination protocols effectively enhanced antibody production; however, the combination of classical and variant vaccines (G4) offered robust immune protection while maintaining the immune response. Gene expression analysis indicated an upregulation of TLR3 and TLR7 in the kidneys and trachea on days 3 and 16 post-vaccination, with G4 in the trachea showing the highest TLR3 expression levels (20.0 on day 3 and 9.61 on day 16).

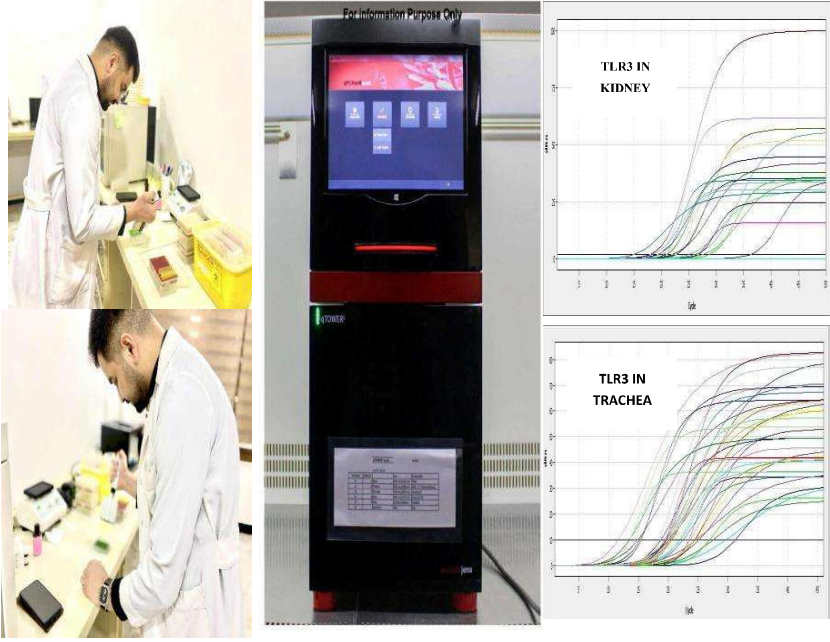
The findings emphasize the immune stimulatory potential of combining IBV vaccine strains, illustrating the significance of TLR signaling in improving vaccine efficacy and advocating for the strategic application of combined vaccines to enhance protection in broiler chickens.

The effect of using several infectious bronchitis vaccines on the expression of TLR3 in the broiler trachea and kidney

Author: Nashwan Burhan Kareem

Advisor: Ammar M. Al-Aalim

Publisher: University of Mosul

HIGHLIGHTS	GRAPHICAL ABSTRACT
<ul style="list-style-type: none"> Evaluation of some cell immune parameters (TLR3, TLR7, β-actin) in different tissue from vaccinated broiler. Detection of IB antibody titers from broilers vaccinated with two types of vaccines (classical Ma5 strain and variant 4/91 strain). Determination cytokine (IL6) response in broilers. Compare the gene expression in different tissue (Trachea and Kidney). 	 <p>The graphical abstract consists of four panels. On the left, two photographs show a researcher in a white lab coat working at a laboratory bench with various equipment and samples. On the right, two line graphs show qPCR results. The top graph is titled 'TLR3 IN KIDNEY' and the bottom graph is titled 'TLR3 IN TRACHEA'. Both graphs plot 'Relative Expression' on the y-axis (ranging from 0 to 30) against 'Day' on the x-axis (ranging from 0 to 15). Multiple colored lines represent different experimental groups, showing an increase in TLR3 expression over time for most groups.</p>
<p>Keywords:</p> <p>Broiler</p> <p>IBV</p> <p>qPCR</p> <p>TLR3</p> <p>Vaccine</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>The poultry sector is a relatively recent yet rapidly growing industry, having been established in the early twentieth century, and it provides a protein source for the human population. Infectious bronchitis virus is the most rife virus in the poultry sector, which causes titanic economic loss with mortality rates reaching up to 90%, resulting from severe nephritis. During IBV infection, TLR3, TLR7 are believed to recognize viral RNA, triggering immune responses that restrict viral replication and dissemination. To protect poultry from IBV, inactivated or live-attenuated vaccines are administered. However, the presence of diverse mutant serotypes poses challenges in vaccine design and efficacy. Our study aimed to evaluate the protective efficacy of different IBV vaccines by assessing TLR3 gene expression following immunization with either variant or classical IBV vaccine strains. This was achieved through the use of 160 one-day-old Ross 308 broiler chicks divided into four different groups (N=40) and vaccinated with either the variant or classical IBV vaccine or with both at distenic vaccination programs. Then the trachea and kidney were collected 1, 3, 7, 14, 16, and 21 days post-vaccination to assess TLR3 gene expression by using qPCR with specific primers. The results show that all vaccinated groups increased TLR3 gene expression on the third and sixteenth day post-vaccination this lead to concluded that the use of variant or classical IBV vaccine strains in broilers causes an increase in TLR gene expression in the kidney and the trachea, and the combination of variant or classical IBV can increase the efficacy of vaccination due to increased TLR3 expression in broilers.</p> <p>2025 M.Sc. Thesis @Univ. of Mosul, College of Veterinary., Department of microbiology (https://www.uomosul.edu.iq/).</p>



جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

تقييم بعض المؤشرات المناعية المرتبطة بلقاحين التهاب الشعب الهوائية المعدي في فروج اللحم

نشوان برهان كريم مراد

رسالة ماجستير
الطب البيطري / احياء المجهرية

بإشراف
الأستاذ الدكتور
عمار محمود احمد العالم

الخلاصة

لا يزال فيروس التهاب الشعب الهوائية المعدي الطيري (IBV) يُسبب خسائر اقتصادية فادحة في إنتاج الدواجن العالمي. وقد لوحظ انتشار متزامن لكل من فيروس التهاب الشعب الهوائية المعدي الطيري (IBV) التقليدي والمتحور في معظم أنحاء العالم، مما يُشكل تحديات كبيرة لجهود الوقاية والمكافحة العالمية. يُصيب هذا الفيروس الدجاج بشكل رئيسي، مُستهدفاً أجهزته التنفسية والكلوية والتناسلية.

تُقارن هذه الدراسة الاستجابات المناعية لدجاج اللحم المُلقَّح بنوعين من لقاحات التهاب المعدي. أولاً، فحصنا مستويات الأجسام المضادة لفيروس التهاب المعدي في دجاج اللحم المُلقَّح لتأكيد الاستجابة المناعية الخلطية. ثانياً، قيسَت مستويات التعبير عن مستقبلات تول الشبيهة ٣ (TLR3) ومستقبلات تول الشبيهة ٧ (TLR7)، بالإضافة إلى جين بيتا-أكتي (β -actin) المُنظَّم للتكاثر في عدة أنسجة لتقييم التنشيط التفضيلي للجهاز المناعي الفطري. ثالثاً، تم تحديد الإنترلوكين ٦ (IL-6)، وهو سيتوكين مُحفِّز للالتهابات، كاستجابة بوساطة السيتوكين. وأخيراً، قورنت أنماط التعبير الجيني في الأنسجة لتحليل الاستجابات المناعية الخاصة بكل نسيج والمُحفَّزة من قِبَل كل لقاح. قُسمَت كتاكيت دجاج التسمين من نوع روس 308، بعمر 160 يوماً، إلى أربع مجموعات، تضم كل منها ٤٠ كتكوتاً. وشملت المجموعات التي تم تحليلها المجموعة G1، وهي المجموعة الضابطة؛ وG2، التي لُقِّحت بسلالة Ma5 الكلاسيكية؛ وG3، التي لُقِّحت بسلالة 4/91 المتحورة؛ وG4، التي لُقِّحت بمزيج من سلالتي Ma5 و4/91. أُعطيت اللقاحات في اليوم الأول، وجُعِدَت جرعات مُعزَّزة في اليوم الرابع عشر. جُمِعت جميع عينات الدم للحصول على مصل في الأيام ١، ٧، ١٤، ٢١، و٢٨. واستُخدمت عينات الدم قبل التطعيم وبعده للكشف عن أجسام مضادة لفيروس (IBV) والدجاج (chIL-6) واختُبرت جميع المجموعات التجريبية لتباين مستويات أجسام مضادة لفيروس (IBV) ومستويات IL-6 باستخدام اختبار الإليزا (ELISA). ثم تم أخذ عينات من القصبة الهوائية والكلَى في الأيام ١، ٣، ٧، ١٤، ١٦، و٢١ قبل وبعد التطعيم لقياس التعبير الجيني TLR3 وTLR7 باستخدام qPCR باستخدام بادئات محددة.

سُجِّلَت زيادة ملحوظة في مستويات الأجسام المضادة الخاصة بفيروس (IBV) في اليوم الثامن والعشرين بعد التطعيم، وخاصةً في المجموعة G3 (اللقاح المتحور 4/91) والمجموعة G4 (اللقاح المُركَّب)، حيث وصلت إلى $3765 \pm 2,12$ و $2876,2 \pm 1,91$ على التوالي. ومن اللافت للنظر أن مستويات chIL6 في المجموعات المُلقَّحة ارتفعت بشكل أكبر؛ ففي اليوم الرابع

عشر، وصلت المجموعة G2 إلى ذروة بلغت $63,49 \pm 3,12$ ، مما يشير إلى دور حاسم في التحول من المناعة الخلطية إلى المناعة الخلوية بعد إعطاء الجرعة المُعززة.

عززت جميع بروتوكولات التطعيم إنتاج الأجسام المضادة بفعالية؛ إلا أن الجمع بين اللقاحات التقليدية والمتغيرة (G4) وفّر حماية مناعية قوية مع الحفاظ على الاستجابة المناعية. أشار تحليل التعبير الجيني إلى ارتفاع في مستويات TLR3 و TLR7 في الكلى والقصبة الهوائية في اليومين الثالث والسادس عشر بعد التطعيم، حيث أظهر اللقاح G4 في القصبة الهوائية أعلى مستويات التعبير عن TLR3 (٢٠,٠) في اليوم الثالث و (٩,٦١) في اليوم السادس عشر.

وتؤكد النتائج على الإمكانيات التحفيزية المناعية من خلال الجمع بين سلالات لقاح فيروس (IBV)، مما يوضح أهمية إشارات TLR في تحسين فعالية اللقاح والدعوة إلى التطبيق الاستراتيجي للقاحات المركبة لتعزيز الحماية في دجاج التسمين.