УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње Сандре Степановић, мастер биохемичара, пријављене под насловом **„Развој и оптимизација индиректног ЕЛИСА теста заснованог на рекомбинантним антигенима вируса у циљу детекције инфекције изазване борнавирусом“**

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Авијарни борнавируси су РНК вируси који представљају значајне вирусне патогене птица. Инфекција може бити повезана са развојем различитих клиничких манифестација, али се јавља и код птица без видљивих симптома. Њихова детекција представља дијагностички изазов због неуротропизма вируса и ограничења постојећих дијагностичких метода.

Директна детекција вируса најчешће се заснива на методи ланчане реакције полимеразе (*Engl***.** Polymerase Chain Reaction, PCR), којом се открива присуство вирусног генома. Међутим, осетљивост ове методе зависи од врсте узорка и присуства вирусне РНК у тренутку узорковања. Пошто излучивање вируса може бити повремено, постоји ризик од лажно негативних резултата. Додатно ограничење представља и отежано узорковање одговарајућег нервног ткива код живих птица.

Серолошка дијагностика омогућава детекцију специфичних IgY антитела у серумима птица, укључујући јединке без клиничких симптома. Овај приступ погодан је и за испитивање већег броја узорака и скрининг популација птица.

Имајући у виду наведена ограничења, предмет научног истраживања у оквиру ове докторске дисертације обухвата добијање, пречишћавање и карактеризацију рекомбинантних протеина борнавируса, нуклеокапсида (N) и матриксног протеина (M) борнавируа, као и њихову примену у развоју и оптимизацији индиректног ELISA теста за одређивање IgY антитела специфичних према борнавирусу у серумима птица.

3. Основне хипотезе

Птичји борнавируси (Avian bornaviruses, ABV) представљају генетички разнолику групу од најмање 15 вируса који припадају роду *Orthobornavirus* у оквиру породице *Bornaviridae*. Међу њима, највећи ветеринарски значај имају борнавируси папагаја (PaBV), који су препознати као узрочници **болести провентрикуларне дилатације (*Engl. Proventricular dilatation disease PDD*)**. Ова хронична и често фатална болест се клинички испољава кроз веома широк спектар симптома, као што су неуролошки поремећаји и дисфункције гастроинтестиналног тракта. Хистопатолошке налазе ове болести карактерише појава негнојног енцефалитиса и ганглионеуритиса са мононуклеарним инфилтратима, што потврђује вирусно порекло болести (1,5).

Геном вируса је изграђен од једног молекула РНК негативног поларитета, величине приближно 8,9 kb који укључује шест отворених оквира читања. Главни структурни протеини вируса су нуклеопротеин (Н), фосфопротеин (П), матриксни протеин (М), гликопротеин (Г) и РНК-зависни протеин РНК полимеразе (Л); неструктурни мали полипептид (Х/p10) који је обилно експримиран у инфицираним ћелијама, а одсутан је у вирусним честицама (1,6,7).

Природа саме инфекције значајно отежава дијагностику. Борнавируси се одликују ниским вирусним титром и малим бројем вирусних копија у организму и ниском концентрацијом генетског материјала у крви и цереброспиналној течности (1,3).

Због тога директна детекција вируса методом RT-PCR често даје непоуздане резултате. Са друге стране, серолошке методе омогућавају потврду претходне изложености вирусу, али не представљају недвосмислен доказ активне инфекције. Додатни изазов у дијагностици представља и велика генетска варијабилност ABV-а**,** као и чињеница да птице које су перзистентно заражене не морају стално излучивати вирус или развити специфичан имуни одговор (1,3).

Историјски гледано, ABV је први пут откривен 2008. године код птица као узрочник PDD-а (1), али и других неуропатских стања.

Методе детекције ABV-а обухватају директне и индиректне приступе.

- **Директна детекција** се најчешће заснива на откривању вирусне РНК методом RT-PCR у реалном времену. Као узорци користе се брисеви клоаке, ждрела, пуне крви, као и узорци

пера, док се постмортем највеће количине вирусне РНК налазе у мозгу, оку и надбубрежним жлездама (1,3). Иако TaqMan RT-PCR тестови су широко примењени и високо осетљиви, њихово ограничење је што често детектују само један или неколико блиско сродних генотипова, што захтева примену комбинованих приступа. Изолација вируса из ткива или узорака живих птица такође је могућа, али је поступак дуготрајан и захтева специјализоване лабораторијске услове, због чега није погодна за рутинску примену (1).

- **Индиректна детекција** подразумева серолошке методе за доказивање специфичних антитела. У том контексту најчешће се примењују тест индиректних флуоресцентних антитела (ИФА), ЕЛИСА тестови који користе рекомбинантне вирусне протеине, и Western blot анализа (1,2,3). Као имунодоминантни антиген у Western blot тестовима препознат је N-протеин авианборна вируса, што указује на његов посебан значај у дијагностици (1,3). Међутим, иако серологија представља вредно средство за откривање инфекције, ограничења попут могућности лажно негативних резултата и чињенице да неке инфициране птице не развијају детектујући имуни одговор захтева да се ове методе увек комбинују са директном детекцијом вируса.

Рекомбинантни нуклеокапсидни и матриксни протеини борнавируса могу се применити као антигени за детекцију специфичних антитела у серумима птица. Досадашња истраживања указују на значај детекције антитела у серолошкој дијагностици инфекције авијарним борнавирусом и могућност примене рекомбинантног нуклеопротеина у развоју индиректног ELISA теста (1,2,3). Такође, матриксни протеин борнавируса може се користити као циљни антиген у имунолошким методама детекције (9). На основу ових сазнања, испитивањем биохемијских и антигенских својстава рекомбинантних N и M протеина, као и њихове реактивности са специфичним IgY антителима у серумима птица, могуће је утврдити њихову погодност за развој и оптимизацију индиректног ELISA теста. Упоредном проценом дијагностичких перформанси теста применом различитих антигена могуће је одабрати најпогоднији антиген или комбинацију антигена за серолошку детекцију изложености птица авијарном борнавирусу.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

У оквиру ове докторске дисертације формулисано је неколико циљева:

1. Оптимизација протокола за експресију рекомбинантног нуклеокапсида борнавируса у *E.coli*

2. Оптимизација протокола за експресију рекомбинантног мембранског протеина борнавируса у *E.coli*

3. Пречишћавање експримираних рекомбинантних протеина

4. Имунолошка и биохемијска карактеризација рекомбинантних протеина

5. Развој и оптимизација индиректног ЕЛИСА теста, базираног на N и M протеину борнавируса за квантификацију IgY антитела из серума птица

6. Аналитичка валидација развијеног ЕЛИСА теста

7. Детекција борнавирус специфичних антитела у серуму птица применом индиректног ЕЛИСА теста

Први део истраживања биће усмерен на оптимизацију експресије и пречишћавање рекомбинантног N протеина борнавируса, а потом на његову биохемијску и имунохемијску карактеризацију. У истраживање ће бити укључен и M протеин, за који ће бити примењен одговарајући поступак експресије, пречишћавања и карактеризације. Посебна пажња биће посвећена оптимизацији услова производње рекомбинантних протеина, са циљем добијања антигена одговарајуће чистоће, стабилности и имунореактивности, погодних за примену у серолошким дијагностичким методама.

Оптимизација производње рекомбинантних N и M протеина представља значајан корак у развоју поузданог и стандардизованог дијагностичког система. Избор одговарајућег вирусног антигена, као и његове структурне и имунолошке карактеристике, могу значајно утицати на осетљивост и специфичност серолошког теста. Стога ће добијени рекомбинантни протеини бити детаљно окарактерисани пре њихове примене у развоју ELISA теста.

Други део истраживања биће усмерен на развој и оптимизацију индиректног ELISA теста заснованог на рекомбинантно произведеним N и M протеинима као антигенима за детекцију специфичних IgY антитела у серумима птица. У истраживање ће бити укључени серуми различитих

врста птица, укључујући и егзотичне врсте, као и домаћу живину, са циљем испитивања применљивости развијеног теста у различитим врстама домаћина.

У оквиру развоја ELISA теста биће оптимизовани кључни параметри методе, укључујући концентрацију рекомбинантног антигена за облагање микротитарских плоча, услове блокирања, разблажење серума, услове инкубације и избор одговарајућег секундарног анти-IgY коњугата (4). Добијени резултати биће коришћени за процену аналитичких карактеристика развијеног теста и поређење имунореактивности N и M протеина као потенцијалних дијагностичких антигена.

Посебан значај истраживања огледа се у могућности идентификовања протеина који показује најбоље карактеристике за примену у серолошкој дијагностици инфекције изазване борнавирусом.

Крајњи предмет истраживања представљаће интеграција резултата добијених током производње и карактеризације рекомбинантних протеина са резултатима њихове примене у ELISA тесту, како би се проценио њихов дијагностички потенцијал. Развој оваквог теста могао би да представља основу за даља сероепидемиолошка истраживања инфекције авијарним борнавирусом, праћење изложености различитих популација птица вирусу и унапређење дијагностичких поступака у ветеринарској медицини (1,3,5).

На тај начин, истраживање ће обухватити целокупан развојни пут од производње и карактеризације рекомбинантних вирусних антигена до њихове примене у серолошкој дијагностици, са циљем успостављања поузданог и стандардизованог приступа за детекцију специфичног хуморалног имунског одговора на инфекцију авијарним борнавирусом.

5. Методе истраживања

У току израде ове докторске дисертације биће коришћене следеће експерименталне методе:

- Методе рекомбинантне технологије: креирање конструкта, трансформација рекомбинантног плазмида у компетентне ћелије, индукција експресије рекомбинантног протеина

- Биохемијске методе: одређивање концентрације протеина; електрофоретска метода анализе протеина (SDS PAGE); спектрометрија циркуларног дихроизма за карактеризацију рекомбинантног протеина, спектрофлуориметрија

- Хроматографске технике: афинитетна хроматографија са имобилизованим јоном метала (енг. Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)

- Имунохемијске технике: ЕЛИСА тестови и имуноблот за имунолошку карактеризацију рекомбинантних протеина и пречишћених антитела, као и за развој и валидацију ЕЛИСА теста за квантификацију IgY антитела

- Методе протеомике: исецање трака са SDS PAGE гела и њихова дигестија у гелу, течна хроматографија-масена спектроскопија (LC-MS) у циљу биохемијске карактеризације рекомбинантних протеина

5. Литература:

1- Rubbenstroth, D. (2022). Avian bornavirus research—a comprehensive review. *Viruses*, *14*(7), 1513.

2- Suksai, P., Jala, S., Meetipit, P., Kongmakee, P., & Lertwatcharasarakul, P. (2026). Development and validation of an indirect ELISA based on recombinant NP fusion protein for detecting antibodies against parrot bornavirus in psittacine birds. The Veterinary Journal, 106641.

3- de Kloet, A. H., Kerski, A., & de Kloet, S. R. (2011). Diagnosis of Avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(3), 421-429.

4- Escandon, P., Heatley, J. J., Berghman, L. R., Tizard, I., & Musser, J. M. (2019). Comparison of four anti-avian IgY secondary antibodies used in Western blot and dot-blot ELISA to detect avian bornavirus antibodies in four different bird species. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 141-150.

5- Honkavuori, K. S., Shivaprasad, H. L., Williams, B. L., Quan, P. L., Hornig, M., Street, C., ... & Lipkin, W. I. (2008). Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. Emerging infectious diseases, 14(12), 1883.

6- Rubbenstroth, D., Briese, T., Dürrwald, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Kuhn, J. H., ... & ICTV Report Consortium. (2021). ICTV virus taxonomy profile: Bornaviridae. *Journal of General Virology*, *102*(7), 001613.

7- Kuhn, J. H., Dürrwald, R., Bào, Y., Briese, T., Carbone, K., Clawson, A. N., ... & Nowotny, N. (2015). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Archives of virology*, *160*(2), 621-632.

8-Neumann, B., Angstwurm, K., Linker, R. A., Knoll, G., Eidenschink, L., Rubbenstroth, D., ... & Bauswein, M. (2022). Antibodies against viral nucleo-, phospho-, and X protein contribute to serological diagnosis of fatal Borna disease virus 1 infections. *Cell Reports Medicine*, *3*(1).

9- McHugh, J. M., & de Kloet, S. R. (2021). The detection of bornavirus in birds, mammals and snakes by sandwich ELISA of bornaviral matrix protein. *Archives of Veterinary Science and Medicine*, *4*(4), 85-102.