



Life and Medical Sciences

Tıbbi Önemi Olan Alfavirusların (*Togaviridae*) Temel Karakteristikleri Basic Characteristics of Medically Important Alphaviruses (*Togaviridae*)

Fatih ŞAHİNER¹ [ID]

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

Article Info: Received; 10.09.2021. Accepted; 20.09.2021. Published; 21.09.2021.

Correspondence: Fatih Şahiner; MD, Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey. E-mail: fsvirol@gmail.com

Cite as: Şahiner F. Basic Characteristics of Medically Important Alphaviruses (*Togaviridae*). Life Med Sci 2022; 1(1): 1-13.

Özet

Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (*International Committee on Taxonomy of Viruses*; ICTV) tarafından yayımlanan raporlara göre tür düzeyinde tanımlanan virüslerin sayısı son birkaç yılda 5.561'den (ICTV 2018b) 9.110'a (ICTV 2020) ulaşmıştır. Yeni geliştirilen moleküler biyoloji teknikleri ve yaygınlaşan saha çalışmaları yanında, virüslerin sadece enfeksiyöz patojenler olarak görüldüğü ve tanımlandığı geleneksel bakışın aksine virüslerin aşı çalışmaları veya genetik temelli tedaviler için biyolojik araçlar olarak da incelendiği günümüzün yeni anlayışı tanımlanan tür sayısındaki hızlı artışın önemli bir nedeni olmuştur. Son yıllarda viral enfeksiyonların epidemiyolojisindeki hızlı değişimler ve pandemik virüslerin küresel düzeydeki yıkıcı etkileri de bilim dünyasının salgın potansiyeli olan virüsler başta olmak üzere viroloji alanına karşı ilgisinin artmasına yol açmıştır. Tüm dünyaya yayılmış türleri ile insanlarda ve hayvanlarda salgınlara neden olan ve bazı türleri yüksek mortaliteli enfeksiyonlarla ilişkili olan alfaviruslar başlıca sivrisinekler aracılığı ile bulaştırılmaktadır. İnsanlarda başlıca artritojenik ve ensefalitik enfeksiyonlarla ilişkili olan alfavirusların bazı türleri ise insanlar için enfeksiyöz veya patojen değildir. Alfavirus cinsinin üyeleri arasında suda yaşayan böcek parazitler aracılığı ile balıklar ve foklar gibi deniz canlılarını enfekte eden türler olduğu gibi, sadece sivrisinekleri enfekte edebildikleri için deneysel çalışmalarda güvenli araçlar olarak öne çıkan türler de bulunmaktadır. Dahası rekombinan alfaviruslar ve alfaviral replikazlar replikatif mRNA'ların tasarlanmasında ve mRNA temelli aşılarda geliştirilmesinde biyolojik araçlar olarak kullanılmaktadır. Ensefalit etkeni alfavirusların yaygın görülen türleri için başlıca atlarda kullanılmak üzere geliştirilen zayıflatılmış ve inaktive aşılarda mevcut iken, farklı alfavirus türleri için insanlarda kullanılabilecek aşı ve antiviraller için geliştirme çalışmaları halen devam etmektedir. Alfavirusları, tarihçelerinden başlayarak biyolojik ve genomik özellikleri, konak dağılımları ve neden oldukları hastalıklar yönünden güncel literatür verilerine dayalı olarak inceleyen bu makale bu virüslerin temel virolojik karakteristiklerini özetlemektedir.

Anahtar Kelimeler: Alfavirus, Sınıflandırma, RNA virüsleri, Arboviruslar, İnsan enfeksiyonları.

Abstract

According to the reports published by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), the number of viruses defined at the species level has increased from 5,561 (ICTV 2018b) to 9,110 (ICTV 2020) in the last few years. In addition to newly developed molecular biology techniques and widespread field studies, today's new understanding in which viruses are also examined as biological tools for vaccine studies or genetic-based treatments, contrary to the traditional view that viruses are seen and defined only as

infectious pathogens, has been an important reason for the rapid increase in the number of defined species. In recent years, the rapid changes in the epidemiology of viral infections and the devastating effects of pandemic viruses at the global level have led to an increase in the scientific world's interest in the field of virology, especially viruses with epidemic potential. Alphaviruses, which have spread all over the world, cause epidemics in humans and animals, and some species are associated with high-mortality infections, are mainly transmitted by mosquitoes. Alphaviruses are primarily associated with arthritogenic and encephalitic infections in humans, but some species are not infectious or pathogenic to humans. Among the members of the genus Alphavirus, there are species that infect sea creatures such as fish and seals through aquatic insect parasites, as well as species that stand out as safe tools in experimental studies because they can only infect mosquitoes. Moreover, recombinant alphaviruses and alphaviral replicases are used as biological tools in the design of replicative mRNAs and in the development of mRNA-based vaccines. While there are available attenuated and inactivated vaccines developed mainly for use in horses for common encephalitic alphavirus species, development studies are still ongoing for vaccines and antivirals that can be used in humans for different alphavirus types. This article, which examines alphaviruses starting from their history, based on current literature data in terms of biological and genomic features, host distribution and diseases they cause, summarizes the basic virological characteristics of these viruses.

Keywords: Alphavirus, Classification, RNA Viruses, Arboviruses, Human infections.

Giriş

Duyarlı konaklara başlıca sivrisinekler aracılığı ile bulaştırılan alfaviruslar tıbbi önemi olan artropod kaynaklı virüsler (*arthropod-borne viruses*) arasında yer alırlar [1,2]. Arbovirus ifadesi sivrisinekler, keneler ve tatarcık sinekleri (kum sinekleri ve *midges*) gibi kan emen artropodlar aracılığı ile bulaştırılan virüsleri tanımlamak için kullanılan genel bir isimlendirmedir [3]. Tıbbi önemi olan arbovirusların çoğu *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* ve *Togaviridae* familyalarında sınıflandırılmaktadır [2]. Taksonomik olarak *Togaviridae* ailesinin üyeleri olan (ICTV 1974) alfaviruslar geçmişte ayrıca "Grup A arboviruslar" olarak da gruplanmıştır [1,2]. Pozitif polariteli segmentsiz RNA genomuna sahip zarflı virüsler olan alfaviruslar geniş insan epidemileri ve ayrıca insan ve hayvanlarda bölgesel salgınlar ile ilişkili sivrisinek kaynaklı önemli zoonotik patojenler olarak dünyanın farklı bölgelerinde insan sağlığını etkilemeye devam etmektedir [4,5]. Son yıllarda yeni geliştirilen tekniklerin de yardımı ile alfavirusların genomik ve replikatif özellikleri, yeni türlerinin tanımlanması, immünopatogeneze mekanizmaları ve tedavi seçenekleri ile ilgili çalışmalar devam ederken alfaviral enfeksiyonların epidemiyolojisinde de önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. İklim değişiklikleri ve düzensiz insan yerleşimleri-hareketlilikleri yanında uluslararası seyahatlerin yaygınlaşmasının da bir sonucu olarak zoonotik

viral enfeksiyonlar kontrolü güç bir şekilde Amerika, Afrika, Asya, Avrupa ve Okyanusya'yı kapsayan geniş bir coğrafyada ve bazen de daha önce hiç görülmedikleri farklı bölgelere yayılmaya devam etmektedir [4,6-8].

Tarihçe

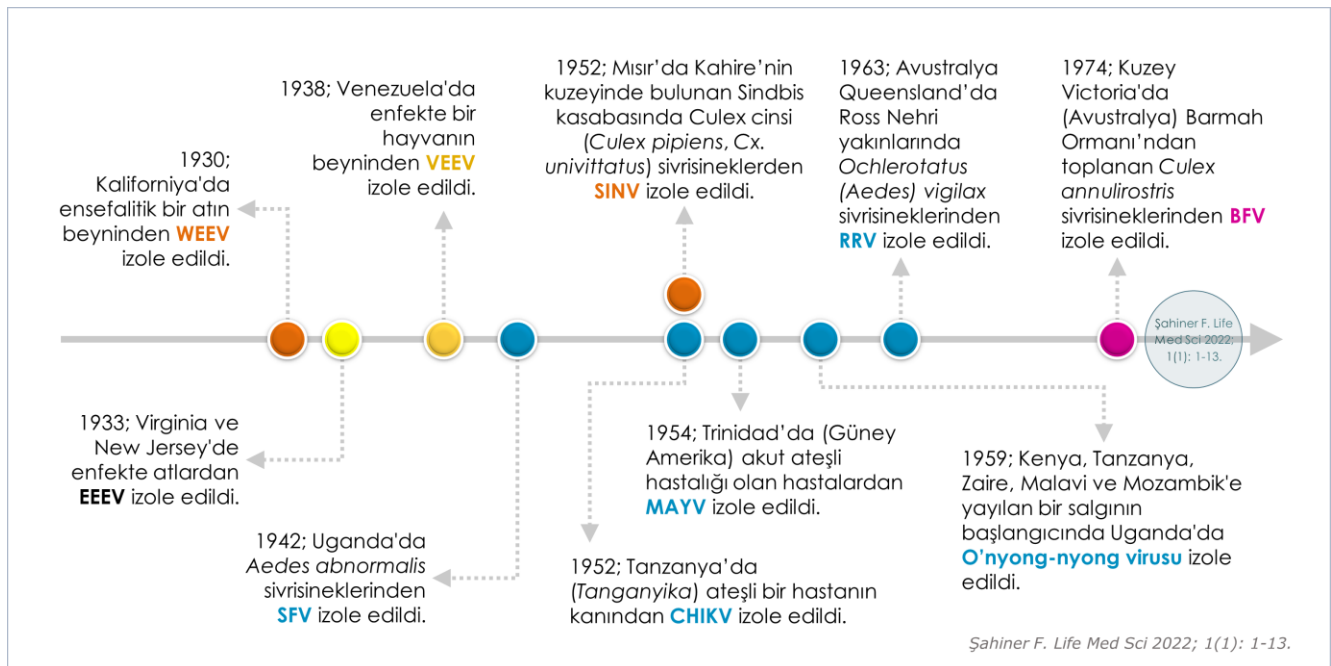
Tıbbi önemi olan alfavirusların ilk tanımlanması 1930 yılında ensefalitik bir atın beyin dokusundan Batı at ensefalit virusunun (*Western equine encephalitis virus*, WEEV) izole edilmesi ile başlamıştır [9]. WEEV 20. yüzyılda belgelenmiş çok sayıda epizootik salgına neden olmuştur, etkenin keşfedilmesinin önünü açan 1930 yılındaki salgında yaklaşık 6000 at enfekte olmuş ve salgın %50 vaka-ölüm oranıyla seyretilmiştir [6]. Sonraki yıllarda ise (1933-1974) ateşli hastalığı olan insanlardan, enfekte hayvanlardan ve sivrisineklerden (tarama çalışmaları ile) çok sayıda ensefalitik, artritojenik veya nonpatojenik alfavirus türü izole edilmiştir (Şekil 1). Tıbbi öneme sahip bir diğer alfavirus türü olan Doğu at ensefalit virusunun (*Eastern equine encephalitis virus*, EEEV) 1831 gibi erken bir tarihte Kuzey Amerika'da atlarda salgınlara neden olduğunu gösteren kanıtlar bulunmakla beraber, virüs ilk olarak 1933 yılında Maryland, Delaware, Virginia, New Jersey gibi eyaletlerde çok sayıda (>1000) atın etkilendiği büyük ölçekli bir salgında New Jersey'de enfekte bir atın beyninden izole edilmiştir [6]. Venezuela at ensefalit virusu (*Venezuelan equine encephalitis virus*, VEEV) ise ilk olarak 1938'de Venezuela'da

enfekte bir atın beyninden izole edilmiştir [10], bununla beraber VEEV salgınlığının etken virüs henüz tam olarak tanımlanmadan on yıllar önce (1920'lerde) başlamış olabileceği değerlendirilmektedir [6]. Trinidad'da ortaya çıkan 1943 salgınında ise VEEV ilk kez bir insan patojeni olarak tanımlanmıştır [11].

Ensefalit etkeni alfaviruslardan sonra başlıca Afrika'da görülen ateşli artritojenik enfeksiyonlarla ilişkili alfaviruslar tanımlanmaya başlamıştır. Bu virüslerden biri olan Chikungunya virus (CHIKV) ilk olarak 1952'de şu anda Tanzania olarak bilinen Tanganyika'da ateşli bir hastanın kanından izole edilmiştir [7]. Dünya geneline en çok yayılmış alfaviruslardan biri olan CHIKV 2004'te Kenya'da başlayan bir salgında Hint Okyanusu üzerinden Hindistan ve Güneydoğu Asya'ya yayılmış ve 2010 yılında Myanmar'a ulaşmıştır [7]. Bu salgından en çok etkilenen bölgelerden biri olan Reunion Adasında 2005'ten 2006'ya kadar yaklaşık 265.000 klinik vaka ve 237 ölüm raporlanmıştır [7]. Bir diğer yaygın alfavirus olan Sindbis virus (SINV) ise ilk olarak 1952 yılında Kahire'nin kuzeyinde (Mısır) bulunan Sindbis kasabasında *Culex* cinsi sivrisineklerden izole edilmiş ve 1963 ve 1974'te Güney Afrika'da ve 1981-1982, 1988, 1995, 2002 ve 2013 yıllarında Kuzey Avrupa'daki ateş, döküntü ve

artralji ile seyreden hastalık salgınlılarıyla ilişkilendirilmiştir [8]. Güney Amerika kıtasının artritojenik alfavirusu olan Mayaro virus (MAYV) ise ilk olarak 1954'te Trinidad ve Tobago'nun güneybatısındaki Mayaro kasabasında ateşli hastalığı olan insanlardan alınan kan örneklerinden izole edilmiştir [12], bununla beraber ilk kayıtlı MAYV salgını 1955'te Brezilya'nın Pará eyaletinde meydana gelmiştir [6]. Sonraki yıllarda Avustralya'da yeni alfavirus türleri tanımlanmıştır. Okyanusya'da endemik olan Ross River virus (RRV) 1928'den 1956'ya Avustralya ve Papua Yeni Gine'de de ortaya çıkan bazı salgınlardan sorumlu tutulmaktadır [6]. Bununla beraber RRV ilk olarak 1963'te Ross Nehri (Queensland, Avustralya) yakınlarından toplanan *Ochlerotatus (Aedes) vigilax* türü sivrisineklerden izole edilmiştir [7]. İnsan örneklerinden RRV'nin ilk izolasyonu ise 1971'de Avustralya'da bir yerli çocukta yapılmıştır [6].

Türkiye'de doğrulanmış ilk (*importe*) Chikungunya vakası 2012 yılında Yeni Delhi'den (Hindistan) Ankara-Türkiye'ye gelen 55 yaşındaki bir kadın hasta olmuştur [13]. CHIKV'un 2013 yılının sonlarında Amerika kıtasında (Karayip adaları) ilk kez raporlanması da yine bir diğer önemli epidemiyolojik değişim olarak kayıtlara geçmiştir [7].



Şekil 1. Tıbbi önemi olan alfavirusların keşifleri ve ilk izole edildikleri yerler [6,7,14,15]. (Çizim: Fatih Şahiner) BFV; Barmah Forest virus. CHIKV; Chikungunya virus. EEEV; Eastern equine encephalitis virus. MAYV; Mayaro virus. RRV; Ross River virus. SFV; Semliki Forest virus. SINV; Sindbis virus. VEEV; Venezuelen equine encephalitis virus. WEEV; Western equine encephalitis virus.

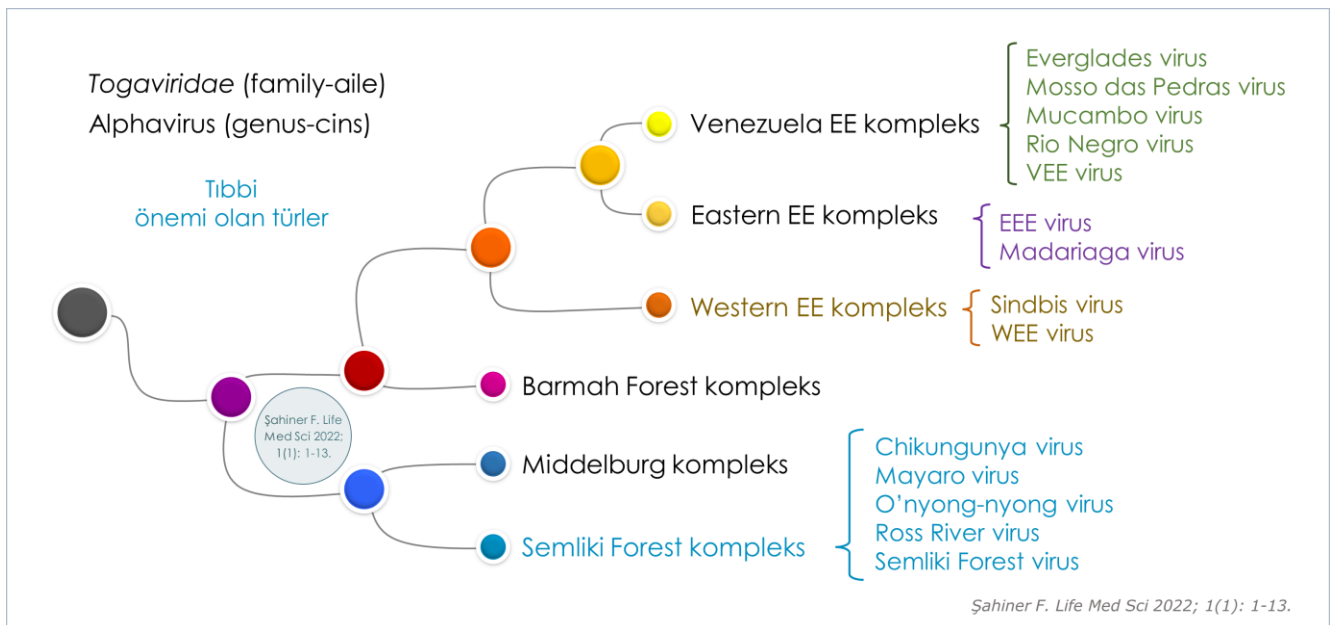
İsimlendirme

Alfavirus türlerinin isimlendirilmesinde bir sistematik bulunmamaktadır ve genel olarak neden oldukları hastalıklar ve keşfedildikleri coğrafi bölgeleri simgeleyen isimler kullanılmıştır. Alfa, Yunanca "α" harfinden türetilmiş olup orijinal kökeni Grup A arboviruslardan gelir. Toga, Latince "toga" kelimesinden türetilmiş olup "cloak= pelerin veya roma mantosu" anlamına gelir ve kapsidi sıkı bir şekilde çevreleyen viral zarfı temsil eder [16]. Chikungunya, Kimakonde/Makonde dilinde (Afrika) "eğrilmek-bükülmek" anlamına gelir ve eklem ağrıları olan hastaların görünümünü açıklar [16], Türkçe'de kullanılan acıdan iki büküm olmak deyimi ile benzer anlamdadır. Onyong-nyong, Nilotic dilinde (Uganda ve Sudan) "eklemlerin güçsüzleşmesi, zayıflaması" anlamlarına gelir [16,17]. Başka bir kaynakta O'nyong-nyong kelimesinin Doğu Afrika'daki Acholi halkının dilinde "ciddi eklem ağrısı" anlamına geldiği belirtilmektedir [18]. Sindbis (kasaba), Ross River (nehir), Barmah Forest (orman) ve Venezuela At Ensefaliti (ülke ve klinik hastalık tablosu) gibi isimler ise virüslerin ilk izole edildikleri ve tanımlandıkları coğrafi bölgeleri (Şekil 1) veya neden oldukları hastalıkları (Tablo 1) ifade etmektedir [6].

Sınıflandırma

ICTV tarafından 2020 yılında yapılan sınıflandırmaya göre *Togaviridae* ailesinin tek cinsi

olan *Alfavirus* cinsi içerisinde 32 farklı virüs türü yer almaktadır [2]. Alfaviruslar geçmişte ayrıca antijenik özelliklerine dayalı olarak Grup A arboviruslar (*flaviviruslar* ise Grup B) olarak sınıflandırılmışlardır [19]. Flaviviruslar bazı biyolojik ve virolojik özellikleri yönünden alfaviruslara benzediği için geçmişte flaviviruslar da *Togaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmıştır [16]. Bir alfavirus E1 proteininin atomik çözünürlüklü kristal yapısı ile flavivirusların E proteini arasındaki benzerliklerin ortaya konduğu bir çalışma bu ailelerde bazı genler arasında benzerlikler (homoloji) bulunduğunu göstermektedir [16,20]. Bununla birlikte, genomik organizasyonları ve replikasyon stratejilerindeki farklılıklar nedeni ile 1984 yılında bu gruplar nihai olarak ayrılmış ve *Flaviviridae* ailesi kurulmuştur [21]. Benzer şekilde geçmişte (1975-2018) virion yapısı, korunmuş gen bölgelerindeki sınırlı dizi benzerliği ve gen ekspresyon stratejisindeki benzerlikler nedeni ile *Togaviridae* ailesinde sınıflandırılan bir diğer virüs olan Rubella virus (*Rubivirus* cinsi) ise antijenik olarak *Alfavirus* cinsi üyelerinden oldukça farklı olup, aralarında saptanabilir bir serolojik çapraz reaktivite bulunmamaktadır [16]. Ek olarak, bulaşma modları, genom organizasyonu, genom dizisi ve virion yapısı bakımından alfaviruslardan önemli derecede farklılıkları da olan *Rubivirus* cinsi 2019 yılında (ICTV 2018) yeni kurulan *Matonaviridae* ailesine taşınmıştır [22].



Şekil 2. Zarf proteini geni nükleotit sekanslarının korunmuş bir bölgesinden (2184 nt) üretilen filogenetik sınıflandırma temelinde tıbbi önemi olan alfaviruslara genel bakış [16,23,24]. (Çizim: Fatih Şahiner)

Alfaviruslar için spesifik serolojik testler kullanılarak, antijenik olarak birbiriyle yakın ilişkili belirli türlerin yer aldığı antijenik kompleksler önerilmiştir, Semliki Forest kompleks ve WEEV kompleks gibi. [16]. Serokomplekslerin tanısal virolojideki önemi konakçı immün sistemleri tarafından viral antijenlere karşı üretilen antikorların serolojik tanı testlerinde aynı

kompleks içerisinde yer alan virüsler için (örneğin CHIKV ve MAYV) çapraz reaktivite göstermesi nedeni ile antikorların özgüllüğünü göstermek için kullanılan seronötralizasyon testleri gibi doğrulayıcı tanı testlerine gereksinim duyulmasıdır [25].

Bu kompleksler çoğunlukla genetik olarak da kümelenmiştir (Şekil 2) [16].

Tablo 1. ICTV 2020 sınıflandırmasına [2] göre alfavirus türleri ve neden oldukları hastalıklar.

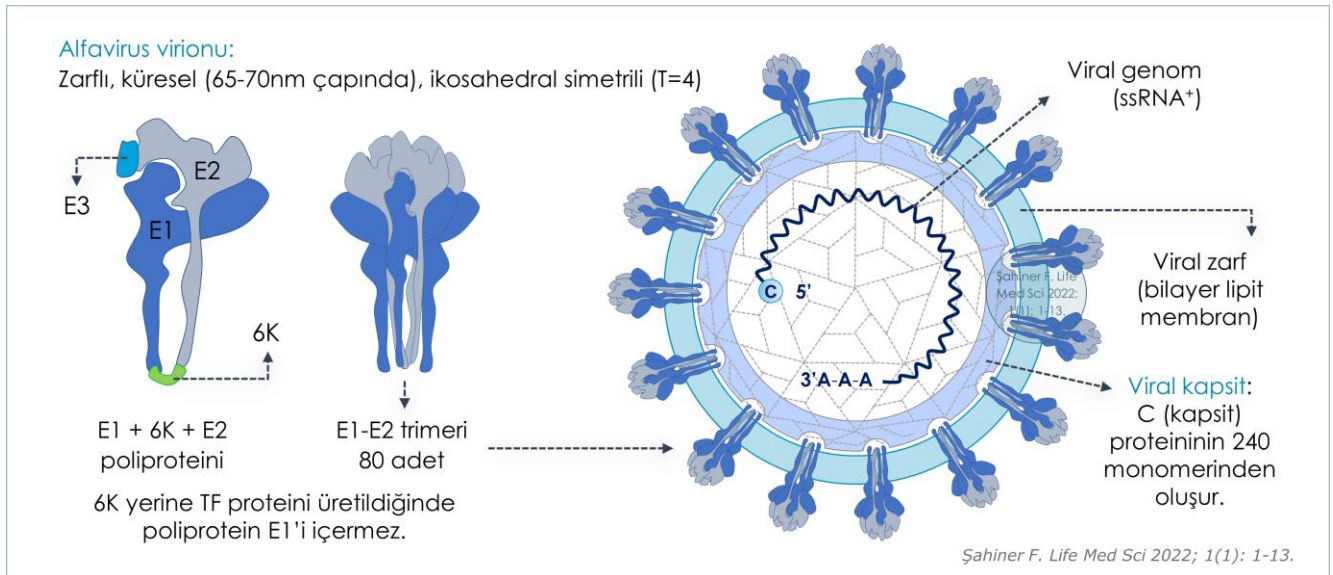
Riboviria > Orthornavirae > Kitrinoviricota > Alsuviricetes > Martellivirales > Togaviridae (ICTV 2020)			Kaynaklar
<i>Alphavirus</i> (cins)	Aura virus	sivrisinek > nonpatojenik*	[26,27]
	Barmah Forest virus	sivrisinek > insan > ateş, artrit-artralji, miyalji, baş ağrısı, döküntü.	[17,28]
	Bebaru virus	sivrisinek > nonpatojenik*, kanıt yok**	[29]
	Caaingua virus	sivrisinek > insan mononükleer hücrelerinin in-vitro enfeksiyona duyarlı olduğu gösterilmiş, ancak insanlarda hastalık etkeni olduğuna dair bir kanıt yok.	[30]
	Cabassou virus	sivrisinek > nonpatojenik*, kanıt yok**	[24,31]
	Chikungunya virus	sivrisinek > insan > ateş, poliartriküler ağrı (artrit ile veya artrit olmaksızın), miyalji, lenfopeni, döküntü, baş ağrısı.	[17]
	Eastern equine encephalitis virus	sivrisinek > insan > ensefalit, ateş, baş ağrısı, lenfopeni, miyalji, halsizlik.	[32,33]
	Eilat virus	sivrisinek spesifik virüs > nonpatojenik*	[23,34]
	Everglades virus	sivrisinek > insan > ensefalit, ateş, halsizlik, miyalji, baş ağrısı, farenjit, lenfadenopati.	[35,36]
	Fort Morgan virus	sivrisinek > nonpatojenik*	[37]
	Getah virus	sivrisinek > insan > nonpatojenik* (insanda Ig saptanmış)	[29,38]
	Highlands J virus	sivrisinek > nonpatojenik*	[37]
	Madariaga virus	sivrisinek > insan > ateş, uykusuzluk.	[39]
	Mayaro virus	sivrisinek > insan > ateş, artralji ve eklem ödemi, miyalji, baş ağrısı, döküntü, retrooküler ağrı.	[17,39]
	Middelburg virus	sivrisinek > insan > (?), ateş, nörolojik. (nadir)	[40]
	Mosso das Pedras virus	sivrisinek > insan > laboratuvar kaynaklı enfeksiyon, doğal enfeksiyon nadir.	[41,42]
	Mucambo virus	sivrisinek > insan > ateş, (laboratuvar kaynaklı enfeksiyon)	[24,43]
	Ndumu virus	sivrisinek > insan > nonpatojenik* (insanlarda maruziyetin serolojik kanıtları mevcut, ancak virüsün patojenitesi belirsiz).	[44,45]
	Onyong-nyong virus	sivrisinek > insan > ateş, büyük eklemlerde ağrı (artrit ile veya artrit olmaksızın), miyalji, makülopapüler döküntü, baş ağrısı.	[17]
	Pixuna virus	sivrisinek > insan > nonpatojenik* (insanda Ig saptanmış)	[41,46]
	Rio Negro virus	sivrisinek > insan > ateş, baş ağrısı, miyalji.	[41,47]
	Ross River virus	sivrisinek > insan > ateş, makülopapüler döküntü, periferik eklemlerde artrit, artralji, miyalji, baş ağrısı, halsizlik.	[17]
	Salmon pancreas disease virus	balıklarda su teması ile horizontal bulaş, somon biti? *** > nonpatojenik*	[48,49]
	Semliki Forest virus	sivrisinek > insan > ateş, ensefalit.	[40]
	Sindbis virus	sivrisinek > insan > döküntü, periferik eklem semptomları, artralji, ateş, miyalji, baş ağrısı, halsizlik.	[17,23]
	Southern elephant seal virus	Antarktika'daki deniz memelilerinin arbovirusu, fok bitleri ile bulaşır > nonpatojenik*	[49]
	Tonate virus	sivrisinek > nonpatojenik*, kanıt yok**	[24,31]
	Trocar virus	sivrisinek > kanıt yok**	[50]
	Una virus	sivrisinek > insan > nonpatojenik* (insanda Ig saptanmış)	[39,41]
	Venezuelan equine encephalitis virus	sivrisinek > insan > ensefalit, ateş, baş ağrısı, lenfopeni, miyalji, halsizlik, uykusuzluk.	[33,39]
	Western equine encephalitis virus	sivrisinek > insan > ensefalit, ateş, baş ağrısı, lenfopeni, miyalji, halsizlik.	[33]
	Whataroa virus	sivrisinek > kanıt yok**	[51]

*İnsanlar için patojenik değil, yani insanlarda bilinen bir hastalık tablosuna neden olmuyor. ** İnsanlarda hastalık etkeni olduğuna dair herhangi bir kanıt yok. *** Vektör bulaşı olmayan akuatik alfaviruslar.

Virion Yapısı

Alfavirus virionları yaklaşık 65-70 nm çapında, zarflı ve küreseldir [16]. T=4 ikosahedral simetriye sahip olan nükleokapsit kor kapsit (C) proteininin 240 monomerinden oluşurlar [52]. İki tabakalı (*bilayer*) lipid yapılı viral zarf yeni virionlar konakçıdan ayrılırken tomurcuklanma bölgelerinden (hücre membranı veya eklemabacaklılarda internal veziküller) elde edilir [16]. Zarf 80 spike proteini içerir ve her bir spike proteini E1 ve E2 glikoproteinlerinin trimerik yapılarından (3×E1/E2 heterodimeri) oluşur [52]. Bu trimerik yapılar zarf içerisine gömülü olarak bulunurlar (Şekil 3). E1 ve E2 proteinlerinin her ikisi de bir transmembran bölgesi içerir. E2 proteininin transmembran bölgesi daha uzundur

(30 amino asitten fazla) ve C proteinini üzerindeki bir hidrofobik cep ile etkileşir [16]. Alfavirus C proteinleri iki alana (*domain*) sahiptir; birincisi viral RNA ile etkileşime giren N-terminal domaini (NTD) ve ikincisi C-C etkileşimlerini oluşturan ve E2 spike sitoplazmik alanı ile etkileşime giren C-terminal domain (CTD) proteindir (cdE2) [16,53]. E2 ve C proteinini etkileşimlerinin kor yapısının oluşmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir [53]. Kapsit, E2 ve E1 proteinleri, enfeksiyöz bir virion için gerekli olan minimum proteinlerdir [16]. Alfaviruslar ayrıca 6K geni üzerinden 6K proteini ve bir çerçeve kayması ürünü olan TF (*TransFrame*) proteini olmak üzere işlevleri halen araştırılan iki yapısal protein daha kodlamaktadır [54].



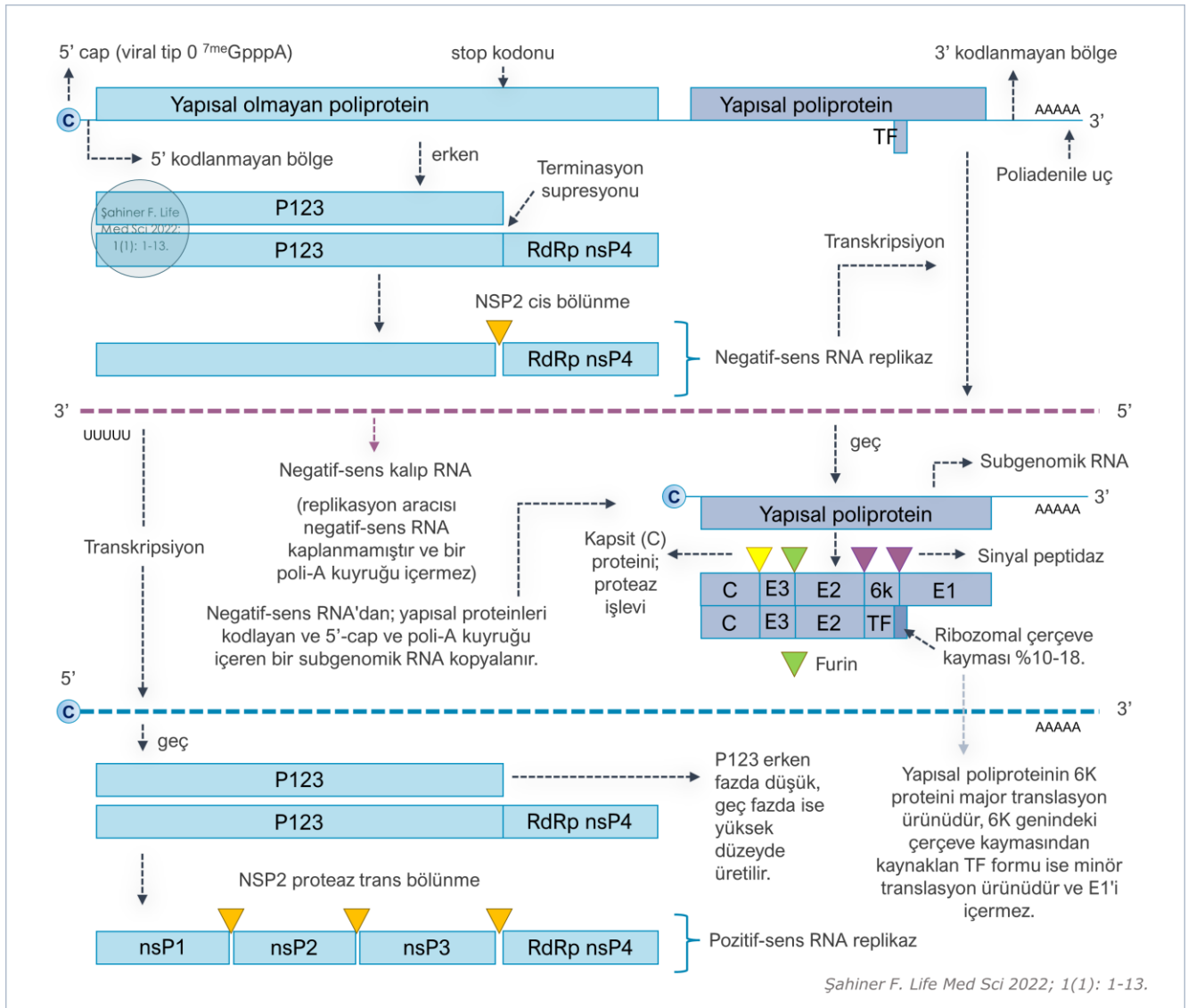
Şekil 3. Alfavirus virionu ve yapısal proteinler. (Çizim: Fatih Şahiner)

Togaviruslar üre, formaldehit, beta-propiolakton, deterjanlar ve asitler dahil olmak üzere çeşitli kimyasallarla muamele edilerek fiziksel olarak denatüre edilebilirler. Togavirusların enfektivitesi ayrıca ısı inaktivasyonu ve ultraviyole ışığa maruz kalma ile de azalmaktadır. Yukarıda bahsedilen enfektivite azaltma ve denatüre etme yöntemlerine ek olarak, alfavirusların enfektivitesi, lipid veziküllerin yokluğunda düşük pH'ye maruz bırakılarak da azaltılabilir [16].

Genomik Özellikler

Alfaviruslar tek iplikçikli (*ss*, *single-stranded*), segmentsiz (*monopartite*), doğrusal (*linear*), pozitif-sens (+ polariteli) RNA genomuna sahiplerdir. Genomları kapaklı ve poliadeniledir.

Genom uzunlukları türler arasında 9.700 ila 11.800 nükleotid arasında değişir [16]. Virion RNA'sı enfeksiyözdür ve hem genom hem de viral mRNA (mesajcı RNA) olarak görev yapar. Genom RNA'sı sırasıyla; 5'-cap (viral tip 0^{7me}GpppA), kodlanmayan bölge, yapısal olmayan proteinleri ve yapısal proteinleri kodlayan bölgeler, 3'-kodlanmayan bölge ve poliadenile uç kısımlarından oluşur (Şekil 4). Genomun iki ORF'sinden yapısal ve yapısal olmayan iki poliprotein sentezlenir. Genoma programlanmış olan dizilerin sırasına göre yapısal olmayan proteinler NSP1, NSP2 (*proteaz*), NSP3 ve NSP4 (RNA bağımlı RNA polimeraz) iken, yapısal proteinler kapsit proteini (C) ve zarf glikoproteinleridir (E3, E2, 6K-TF ve E1) [16,52].



Şekil 4. Alfavirus genom organizasyonu [5,52,54]. (Çizim: Fatih Şahiner)

Tablo 2. Alfavirus proteinleri ve görevleri [4,16,52,55–57].

Öncül pp.	Protein	Proteinlerin görevleri
Yapısal pp.	C	C proteininin monomerleri ikozahedral kapsidi oluşturur (240 monomer) ve proteaz işlevi vardır.
	E1	Endozomal membranlarla pH-bağımlı füzyona aracılık eder. Glikoprotein yapılı bir proteindir. Üç adet "E1 ve E2 heterodimeri" bir araya gelerek bir trimer oluşturur.
	E2	Hücre yüzeyi tutunma reseptörleri ile etkileşir. Glikoprotein yapısındadır. E1 ve E2 heterodimerler oluşturmuş şekilde ve bir ucu membrana gömülü haldedir. Virüs yüzeyinde 80 trimerik çıkıntı bulunur.
	E3	E2'nin hücre proteaz furin ile kesilmesi ile oluşur. Prematüre füzyonun önlenmesinde görev aldığı düşünülmekte.
	6K / TF	6K: Tomurcuklanmada görevli olduğu düşünülmekte. Viroporin aktivitesi var. TF: Kesin görevi bilinmemekle beraber, tomurcuklanma ve hayvan konaklarda yayılımı ilgili olabileceği düşünülmekte.
NSP pp.	P123 NSP 1	mRNA capping reaksiyonunda görevli metiltransferaz. Ayrıca guanilil-transferaz özelliği bulunmaktadır. Negatif zincirli RNA transkripsiyonunda görev alır.
	P123 NSP 2	NSP poliproteinini kesmekle görevli proteaz. Diğer görevleri helikaz, NTPase, 5' trifosfataz (nükleozit trifosfataz) aktivitesi, konakçı transkripsiyon yollarının inhibisyonudur.
	P123 NSP 3	Makrodomain. Negatif zincirli RNA transkripsiyonu ve pregenomik RNA transkripsiyonunda görevli olabileceği düşünülmekte.
	NSP 4	RNA bağımlı RNA polimeraz. Adeniltransferaz.

pp: poliprotein. NSP: Yapısal olmayan protein (*non-structural protein*).

Tablo 3. Alfavirus proteinlerinin virülans özellikleri [5].

Protein	Virülans özellikleri
C	Nükleer sitoplazmik taşıma blokajı, nükleer import inhibisyonu (VEEV). Konak gen ekspresyonu inhibisyonu, IFN duyarlılığı (EEEV). PRR yolu inhibisyonu (WEEV). RNAi engelleme (SFV).
E1	Nörovirülans (SINV). Enfektivite, farelerde/sivrisineklerde yayılma, vektör tropizmi, kolesterol bağımlılığı (<i>dependence</i>) (CHIKV). Kolesterol bağımlılığı (SFV, SINV).
E2	Nörovirülans, heparan sülfat bağlanması (SINV). GAG bağlanması, hastalık şiddeti (CHIKV). Nörovirülans, GAG bağlanması (EEEV).
E3	PE2 işleme (SINV).
6K / TF	6K: Farelerde uygunluk (CHIKV, RRV, VEEV). TF: IFN-I antagonizması, TF palmitoilasyon.
NSP 1	Nörovirülans (SINV). IFN-I modülasyonu (SINV, RRV). Kas-iskelet inflamasyonu (RRV).
NSP 2	IFN-I modülasyonu; JAK-STAT inhibisyonu (SINV, CHIKV). IFN-I modülasyonu; RIG-I, IRF3 ekspresyonu (RRV). Transkripsiyon inhibisyonu (CHIKV). UPR inhibisyonu (SINV).
NSP 3	Nörovirülans (SFV, SINV, EEEV). Farelerde patogeneze (SINV, SFV, CHIKV). Makrodomain aktivitesi, farelerde patogeneze (SINV).
NSP 4	EIF2α fosforilasyonu, UPR blokajı (CHIKV, SINV).

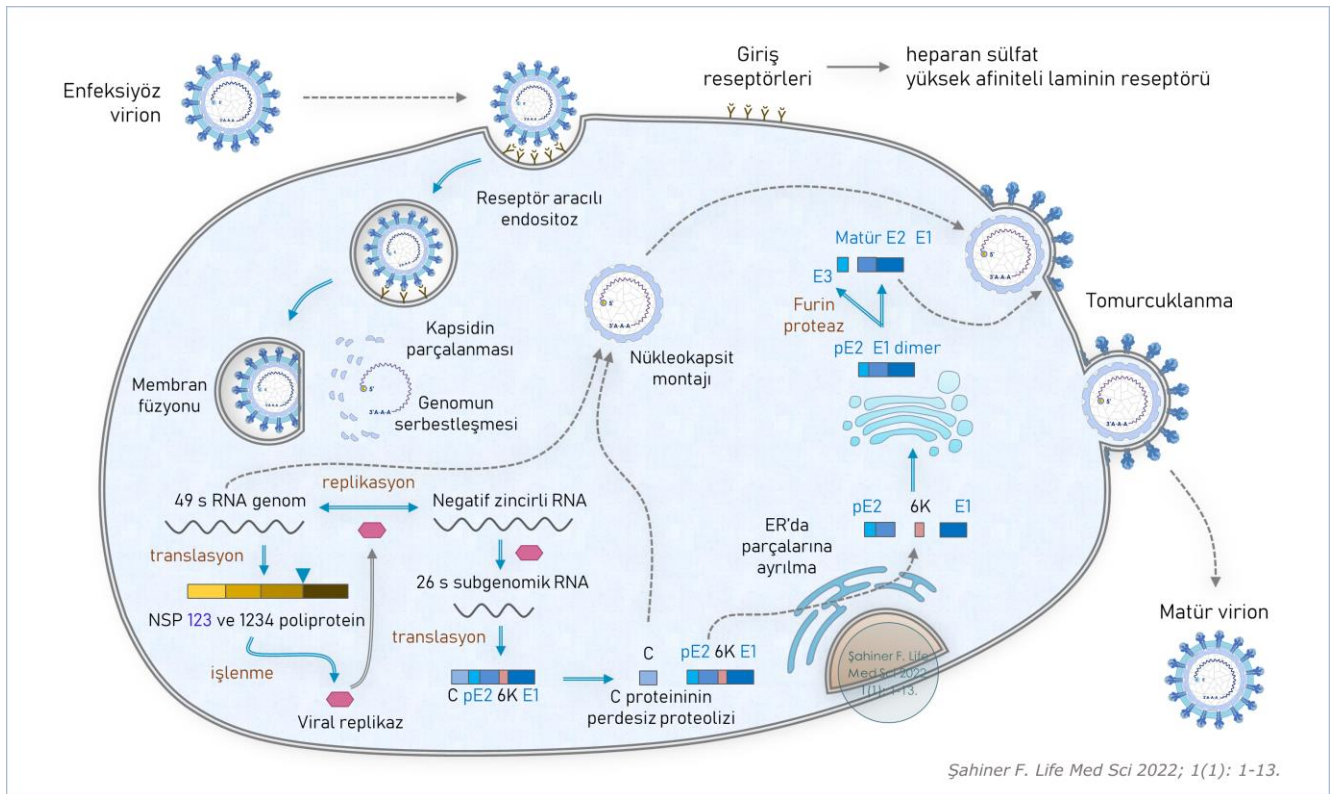
NSP: Yapısal olmayan protein (*non-structural protein*).

Replikasyon döngüsü

Alfaviruslarda replikasyonun tüm basamakları sitoplazmada gerçekleşir (Şekil 5). İlk olarak viral E glikoproteini konakçı hücre reseptörlerine (heparan sülfat, yüksek afiniteli

laminin reseptörü) bağlanır ve virus klatrin aracılı endositoz ile hücreye alınır.

Virüs membranı endozomal membran ile birleşir (füzyon) ve RNA genom sitoplazmaya salınır [16,52].



Şekil 5. Alfaviruslarda hücresel replikasyon döngüsü. (Çizim: Fatih Şahiner)

Replikasyon, endozomların yüzeyindeki sitoplazmik viral fabrikalarda gerçekleşir. Pozitif-sens genomik ssRNA'dan bir poliprotein ve bir çift iplikçikli RNA (dsRNA, *double-stranded*)

sentezlenir. Poliprotein, bölünmesiyle RNA sentezi için (replikasyon ve transkripsiyon) gerekli olan yapısal olmayan proteinler meydana gelir. Yeni sentezlenen dsRNA genom ise yeni viral

mRNA'ları elde etmek için transkripte edilir veya yeni ssRNA+ genomları elde etmek (üretmek) için kopyalanır. Yapısal proteinler ise subgenomik RNA'nın (sgRNA) ifadesi (ekspresyonu) ile üretilir. Kapsit montajı (*assembly*) sitoplazmada gerçekleşir. Kapsit plazma zarından zarflanarak tomurcuklanır ve olgun virion hücreden ayrılır [16,20,52,58]. Alfavirus replikasyon sistemleri biyoteknoloji alanında ilgi çekici araçlar olarak replike olabilen mRNA sistemlerinin (SAM, *self-amplifying mRNA*) geliştirilmesinde denenmektedir. Genetik hastalıkların ve mRNA temelli aşılarda tasarımı SINV ve rekombinan SFV temelli mRNA sistemleri üzerinde çalışmalar yürütülmüştür [59].

Antiviral Hedefler

Alfavirus enfeksiyonlarında RNA interferensi (RNAi) en güçlü antiviral mekanizmadır, çünkü virüsün konakçı hücrelerine çoğalabilmesi için bu engeli aşması gerekmektedir [60]. Antiviral RNAi yanıtının, sivrisineklerde alfaviral replikasyonu sınırlandırdığı gösterilmiştir [61]. Alfavirusların yapısal olmayan proteinleri viral replikasyonun primer mediyatörleridir ve viral enfeksiyon sürecinde çeşitli intrasellüler fonksiyonları yerine getirirler ve bu özellikleri onları antiviral tedaviye yönelik farmasötik tasarımlar için çekici hedefler haline getirmiştir [57]. Alfavirus proteinlerinin bilinen fonksiyonları ve enzimatik aktiviteleri Tablo 2 ve Tablo 3'te listelenmiştir. Diğer virüslerde antiviral ilaçların geliştirilmesi için hedeflenmiş olan bu enzimatik aktiviteler VEEV, EEEV, WEEV ve CHIKV gibi alfavirusların NSP'leri için de doğrulanırsa bu proteinlerin ilgi çekici antiviral hedefler olabilecekleri değerlendirilmektedir [58,62,63].

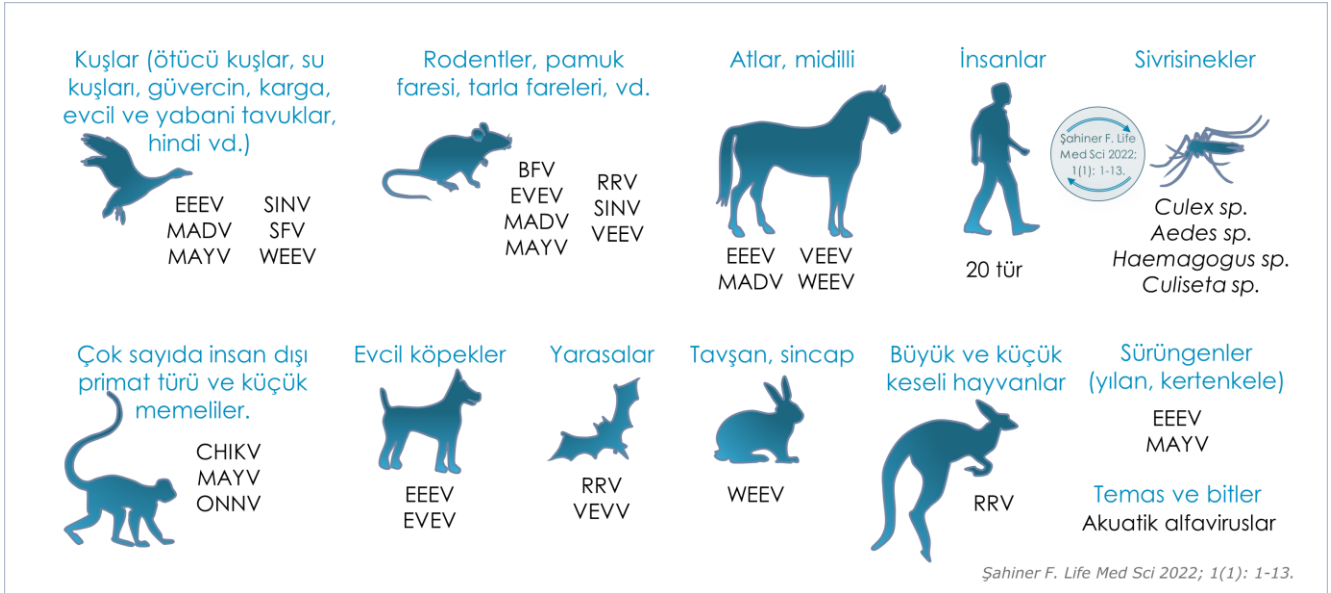
CHIKV için direkt veya konakçı üzerinden etkili çok sayıda antiviral mekanizma üzerinde çalışılmaktadır [58,63]. CHIKV için direkt etkili antivirallerden; klorokin endozomal pH'ı yükselterek viral E1 proteininin endozomal membran ile füzyonunu inhibe etmesi, arbidolün virüsün reseptörlere bağlanmasını ve membranlarla etkileşerek hücreye girişini engellemesi, flavaglinlerin CHIKV inhibitin-1'inin bağlanmasını engellemesi, NSP1 ve E2'yi hedefleyen siRNA'ların ve harringtonin ve homoharringtonin alkaloidlerinin protein sentezini inhibe etmesi, arilalkiliden türevlerinin CHIKV NSP2 proteaz aktivitesini inhibe etmesi, ribavirinin

guanozin trifosfat (GTP) havuzlarının tükenmesi yoluyla viral genom replikasyonunu inhibe etmesi ve favipiravirin viral genom replikasyonunu inhibe etmesi gibi mekanizmalar üzerinden bu moleküllerin antiviral etkilerinden faydalanılabileceği öngörülmektedir [58]. Suramin, novobiosin, telmisartan, sofosbuvir ve diğer birçok antiviral seçenek üzerinde de çalışılmalar yürütülmüştür [63]. Çeşitli monoklonal antikorların (C9, E8, IM-CKV063) CHIKV enfeksiyonunu engelleyebileceği de değerlendirilmektedir [64,65]. CHIKV'e karşı konakçı üzerinden etkili antiviral mekanizmalar ve yollar arasında ise; hücresel furinlerin inhibisyonu (dec-RVCR-cmk) yoluyla virüs olgunlaşmasının engellenmesi, protein kinaz C aktivatörleri (prostratin ve TPA-*tetradecanoylphorbol acetate*) ile viral replikasyonun inhibisyonu, kinaz inhibitörleri ile apoptoza karışan kinazların inhibisyonu, CHIKV NSP3 ve NSP4 ile etkileştiği bilinen HSP-90 inhibitörlerinin (HS-10 ve SNX-2112) kullanılması, poli-inosinik asit (polisitidilik asit) ile IFN-a, IFN-b ve antiviral genlerin (OAS ve MxA gibi) uyarılması ve yine RIG-I agonistleri ile immün yanıtın uyarılması gibi farklı potansiyel hedefler üzerinde çalışılmaktadır [58].

Konak ve Doku Tropizmi

İnsan, memeliler, keseli hayvanlar, kuşlar, sivrisinekler alfavirusların doğal konaklarıdır [52,66]. *Alfavirus* cinsi esas olarak sivrisinek kaynaklı virüslerden oluşur, ancak keneler, bitler ve diğer bazı kan emici böcekler de bulaşma ile ilişkilendirilmiştir [16]. Omurgalı konakçıları arasında insanlar, insan dışı primatlar, at türleri (*equids*), kuşlar (su kuşları, ötücü kuşlar ve kümes hayvanları), amfibianlar, sürüngenler (kertenkele), kemirgenler ve domuzlar bulunur (Şekil 6) [6,16,67].

Southern elephant seal virus ve Salmon pancreas disease virus türleri ise sırasıyla deniz memelileri ve balıkları enfekte eden iki akuatik alfavirustur [48,49]. Alfaviruslar içinde konak kısıtlılığı olan bir kompleksi temsil eden Eilat virüsü ise sadece böcek hücrelerini enfekte edebilmektedir, bu virüsün omurgalı hücrelerinde replike olamadığı gösterilmiştir [16]. Bu konak kısıtlılığı özelliği avantajlı bir güvenlik profili sağladığı için bu virüsü çekici bir ekspresyon platformu haline getirmiştir [34].



Şekil 6. Tıbbi önemi olan bazı alfavirus türleri için rezervuar veya potansiyel konaklar (konaklar burada belirtilenlerle sınırlı değildir, şekil yaygın bilinen örnekleri içermektedir) [6,17,67,68]. (Çizim: Fatih Şahiner) BFV; Barmah Forest virus. CHIKV; Chikungunya virus. EEEV; Eastern equine encephalitis virus. EVEV; Everglades virus. MADV; Madariaga virus. MAYV; Mayaro virus. ONNV; Onyong-nyong virus. RRV; Ross River virus. SFV; Semliki Forest virus. SIN; Sindbis virus. VEEV; Venezuelen equine encephalitis virus. WEEV; Western equine encephalitis virus.

Alfavirus cinsinin üyeleri, hastalık özelliklerine ve birincil endemite bölgelerine göre Yeni Dünya ve Eski Dünya grupları olarak sınıflandırılmıştır [4,69]. Bu iki grupta yer alan virüsler insan enfeksiyonları sırasında patogeneizde dikkate değer farklılıklar sergilemektedir; istisnaları olmakla beraber Eski Dünya virüsleri (Semliki Forest virus-SFV, CHIKV, O'nyong-nyong virus, RRV) başlıca ateşli ve artritojenik hastalıklar ile ilişkili iken, Yeni Dünya virüsleri (WEEV, EEEV, VEEV) daha çok ensefalit tablolarına neden olmaktadır [4,40,70]. Sivrisineklerin kan emmesi sırasında deriden subkutanöz olarak inoküle edilen virüs bölgesel lenf nodlarına ulaşarak viremiye neden olur. Virüs ektranöral dokulara (bağ dokusu, kas dokusu, pankreas, dalak gibi) yayılırken, virüsün türüne göre değişmek üzere viral enfeksiyon olfaktör epitel ve vasküler endoteli enfekte ederek nöral parankime ulaşabilmekte ve enfeksiyon ve inflamasyon nöronlar ve glial hücrelerde disfonksiyona ve hücre lizisine neden olabilmektedir [4,71]. Alfaviruslar sivrisinek ve böcek vektörler dışında vertikal yol (transplasental, intrapartum) ve laboratuvar kaynaklı bulaş gibi vektör aracılığı olmayan yollar ile de bulaşabilmektedir [72]. Organ nakli ve kan transfüzyonu diğer olası bulaş yolları olarak

raporlanmış ve endemik bölgelerde (özellikle salgın dönemlerinde) kan transfüzyonlarının güvenliği için risk analizleri yapılmıştır [73-75]. Enfeksiyonun temizlenmesinde doğuştan gelen bağışıklık yanıtı, alfaviral hastalığın akut fazını kontrol etmede kritiktir ve bu yanıtta tip I interferon (IFN) indüksiyonu esastır [76]. Öyle ki, bu virüsler omurgalılarda büyük miktarlarda IFN üreten doğuştan gelen, güçlü bir in vivo immün cevap tarafından genellikle temizlenirler [60]. Alfavirusların çoğunda enfeksiyonlar yaşam boyu bağışıklığa neden olabilir. İnsanlar için onaylı erişilebilir bir aşı olmamakla beraber, VEEV, WEEV ve EEEV at ensefaliti epizootikleri attenüe ve inaktive aşılardan atlara uygulanması ile başarılı bir şekilde kontrol altına alınmıştır [6]. Şu anda, Eski Dünya alfavirus enfeksiyonlarının herhangi birine karşı etkili olan ve insanlarda kullanılmak üzere tasarlanmış bir aşı veya bir antiviral bileşik bulunmamaktadır, bununla birlikte klinik öncesi (*preklinik*) araştırmalar bazı bileşiklerin klinik testler için potansiyel moleküller olabileceğini göstermektedir [60]. İnsan enfeksiyonlarının önlenmesi için canlı zayıflatılmış CHIKV aşılı üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Nispeten düşük üretim maliyetleri ve tek bir bağışıklama ile koruyucu bağışıklığı ortaya çıkarma yetenekleri ile bu aşılarda dünya genelinde büyük salgınlara neden

olan CHIKV enfeksiyonları ile mücadelede umut vaat etmektedir [77].

Sonuç

Bu makalenin hedefleri alfavirusların güncel sınıflandırmalarına, konak dağılımlarına, genomik özelliklerine, replikasyon stratejilerine ve virolojik

özelliklerine güncel ve genel bir bakış sağlamak ve bu virüslerle ilişkili enfeksiyonların epidemiyolojisi, klinik özellikleri, laboratuvar tanısı, tedavi seçenekleri, risk faktörleri ve korunma yolları hakkında detay bilgiler içeren literatür okumaları için temel bir basamak oluşturmaktır.

Çıkar beyanı: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazar sorumludur. **Finansal destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Dalrymple JM, Vogel SN, Teramoto AY, Russell PK. Antigenic components of group A arbovirus virions. J Virol. 1973 Nov;12(5):1034-42. [Crossref] [PubMed]
2. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, DC. Virus Taxonomy: 2020, October. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Accessed September 16, 2021].
3. Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. Adv Virus Res. 2014;89:201-75. [Crossref] [PubMed]
4. Ryman KD, Klimstra WB. Host responses to alphavirus infection. Immunol Rev. 2008 Oct;225:27-45. [Crossref] [PubMed]
5. Rangel MV, Stapleford KA. Alphavirus Virulence Determinants. Pathogens. 2021 Aug 3;10(8):981. [Crossref] [PubMed]
6. Azar SR, Campos RK, Bergren NA, Camargos VN, Rossi SL. Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. Microorganisms. 2020 Aug 1;8(8):1167. [Crossref] [PubMed]
7. Lwande OW, Obanda V, Bucht G, Mosomtai G, Otieno V, Ahlm C, et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. Infect Ecol Epidemiol. 2015 Dec 18;5:29853. [Crossref] [PubMed]
8. Kurkela S, Rätti O, Huhtamo E, Uzcátegui NY, Nuorti JP, Laakkonen J, et al. Sindbis virus infection in resident birds, migratory birds, and humans, Finland. Emerg Infect Dis. 2008 Jan;14(1):41-7. [Crossref] [PubMed]
9. Meyer KF, Haring CM, Howitt B. The Etiology of Epizootic Encephalomyelitis of Horses in the San Joaquin Valley, 1930. Science. 1931 Aug 28;74(1913):227-8. [Crossref] [PubMed]
10. Kubes V, Ríos FA. The Causative Agent of Infectious Equine Encephalomyelitis in Venezuela. Science. 1939 Jul 7;90(2323):20-1. [Crossref] [PubMed]
11. Randall R, Mills JW. Fatal Encephalitis in Man due to the Venezuelan Virus of Equine Encephalomyelitis in Trinidad. Science. 1944 Mar 17;99(2568):225-6. [Crossref] [PubMed]
12. Anderson CR, Downs WG, Wattley GH, Ahin NW, Reese AA. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. Am J Trop Med Hyg. 1957 Nov;6(6):1012-6. [Crossref] [PubMed]
13. Yağcı Çağlayık D, Uyar Y, Korukluoğlu G, Ertek M, Unal S. An imported Chikungunya fever case from New Delhi, India to Ankara, Turkey: the first imported case of Turkey and review of the literature. Mikrobiyol Bul. 2012 Jan;46(1):122-8. [PubMed]
14. Tuittila MT, Santagati MG, Röyttä M, Määttä JA, Hinkkanen AE. Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence. J Virol. 2000 May;74(10):4579-89. [Crossref] [PubMed]
15. Lindsay M, Johansen C, Broom AK, Smith DW, Mackenzie JS. Emergence of Barmah Forest virus in Western Australia. Emerg Infect Dis. 1995 Jan-Mar;1(1):22-6. [Crossref] [PubMed]
16. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, DC. ICTV reports; Togaviridae. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/togaviridae [Accessed September 10, 2021].
17. Lopes Marques CD, Ranzolin A, Cavalcanti NG, Branco Pinto Duarte AL. Arboviruses related with chronic musculoskeletal symptoms. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2020 Aug;34(4):101502. [Crossref] [PubMed]
18. Bessaud M, Peyrefitte CN, Pastorino BA, Gravier P, Tock F, Boete F, et al. O'nyong-nyong Virus, Chad. Emerg Infect Dis. 2006 Aug;12(8):1248-50. [Crossref] [PubMed]
19. Schmaljohn AL, McClain D. Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae) (Chapter 54). In: Baron S (ed), Medical Microbiology (4th edition). 1996, University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas. [PubMed]
20. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. Future Microbiol. 2009 Sep;4(7):837-56. [Crossref] [PubMed]
21. Brinton MA. Replication of Flaviviruses. In: Schlesinger S, Schlesinger MJ (eds), The Viruses: The Togaviridae and Flaviviridae. 1986, Springer, Boston, Massachusetts. pp:327-74. [Crossref]
22. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, DC. Virus Taxonomy: 2018b, July 2018. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Accessed July 26, 2019].
23. Lello LS, Utt A, Bartholomeeusen K, Wang S, Rausalu K, Kendall C, et al. Cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases. PLoS Pathog. 2020 Sep 4;16(9):e1008825. [Crossref] [PubMed]
24. Forrester NL, Wertheim JO, Dugan VG, Auguste AJ, Lin D, Adams AP, et al. Evolution and spread of Venezuelan equine encephalitis complex alphavirus in the Americas.

PLoS Negl Trop Dis. 2017 Aug 3;11(8):e0005693. [Crossref] [PubMed]

25. Hassing RJ, Leparc-Goffart I, Tolou H, van Doornum G, van Genderen PJ. Cross-reactivity of antibodies to viruses belonging to the Semliki forest serocomplex. Euro Surveill. 2010 Jun 10;15(23):19588. [PubMed]

26. Toribio R, Díaz-López I, Berlanga JJ, Molina-Jiménez F, Majano P, Ventoso I. Naturally Occurring and Engineered Alphaviruses Sensitive to Double-Stranded-RNA-Activated Protein Kinase Show Restricted Translation in Mammalian Cells, Increased Sensitivity to Interferon, and Marked Oncotropism. J Virol. 2020 Jan 17;94(3):e01630-19. [Crossref] [PubMed]

27. Mosimann ALP, de Siqueira MK, Ceole LF, Nunes Duarte Dos Santos C. A new Aura virus isolate in Brazil shows segment duplication in the variable region of the nsP3 gene. Parasit Vectors. 2018 May 29;11(1):321. [Crossref] [PubMed]

28. Michie A, Ernst T, Chua IJ, Lindsay MDA, Neville PJ, Nicholson J, et al. Phylogenetic and Timescale Analysis of Barmah Forest Virus as Inferred from Genome Sequence Analysis. Viruses. 2020 Jul 6;12(7):732. [Crossref] [PubMed]

29. Tesh RB, Gajdusek DC, Garruto RM, Cross JH, Rosen L. The distribution and prevalence of group A arbovirus neutralizing antibodies among human populations in Southeast Asia and the Pacific islands. Am J Trop Med Hyg. 1975 Jul;24(4):664-75. [Crossref] [PubMed]

30. Tschá MK, Suzukawa AA, Gräf T, Piancini LDS, da Silva AM, Faoro H, et al. Identification of a novel alphavirus related to the encephalitis complexes circulating in southern Brazil. Emerg Microbes Infect. 2019;8(1):920-933. [Crossref] [PubMed]

31. Digoutte JP, Girault G. The protective properties in mice of tonate virus and two strains of cabassou virus against neurovirulent everglades Venezuelan encephalitis virus. Ann Microbiol (Paris). 1976 Oct;127B(3):429-37. [PubMed]

32. Hasan SS, Dey D, Singh S, Martin M. The Structural Biology of Eastern Equine Encephalitis Virus, an Emerging Viral Threat. Pathogens. 2021 Jul 31;10(8):973. [Crossref] [PubMed]

33. Smith DR, Schmaljohn CS, Badger C, Ostrowski K, Zeng X, Grimes SD, et al. Comparative pathology study of Venezuelan, eastern, and western equine encephalitis viruses in non-human primates. Antiviral Res. 2020 Oct;182:104875. [Crossref] [PubMed]

34. Tan L, Zhang Y, Wang X, Kim DY. A Productive Expression Platform Derived from Host-Restricted Eilat Virus: Its Extensive Validation and Novel Strategy. Viruses. 2021 Apr 11;13(4):660. [Crossref] [PubMed]

35. Burkett-Cadena ND, Blosser EM, Loggins AA, Valente MC, Long MT, Campbell LP, et al. Invasive Burmese pythons alter host use and virus infection in the vector of a zoonotic virus. Commun Biol. 2021 Jun 28;4(1):804. [Crossref] [PubMed]

36. Calisher CH, Murphy FA, France JK, Laznick JS, Muth DJ, Steck F, et al. Everglades virus infection in man, 1975. South Med J. 1980 Nov;73(11):1548. [PubMed]

37. Allison AB, Stallknecht DE, Holmes EC. Evolutionary genetics and vector adaptation of recombinant viruses of the western equine encephalitis antigenic complex provides

new insights into alphavirus diversity and host switching. Virology. 2015 Jan 1;474:154-62. [Crossref] [PubMed]

38. Zhai YG, Wang HY, Sun XH, Fu SH, Wang HQ, Attoui H, et al. Complete sequence characterization of isolates of Getah virus (genus Alphavirus, family Togaviridae) from China. J Gen Virol. 2008 Jun;89(Pt 6):1446-1456. [Crossref] [PubMed]

39. Carrera JP, Cucunubá ZM, Neira K, Lambert B, Pittí Y, Liscano J, et al. Endemic and Epidemic Human Alphavirus Infections in Eastern Panama: An Analysis of Population-Based Cross-Sectional Surveys. Am J Trop Med Hyg. 2020 Dec;103(6):2429-2437. [Crossref] [PubMed]

40. Venter M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. Curr Opin Virol. 2018 Feb;28:74-84. [Crossref] [PubMed]

41. Cardozo F, Königheim B, Albrieu-Llinás G, Rivarola ME, Aguilar J, Rojas A, et al. Alphaviruses: Serological Evidence of Human Infection in Paraguay (2012-2013). Vector Borne Zoonotic Dis. 2018 May;18(5):266-272. [Crossref] [PubMed]

42. Fernández Z, Moncayo AC, Carrara AS, Forattini OP, Weaver SC. Vector competence of rural and urban strains of Aedes (Stegomyia) albopictus (Diptera: Culicidae) from São Paulo State, Brazil for IC, ID, and IF subtypes of Venezuelan equine encephalitis virus. J Med Entomol. 2003 Jul;40(4):522-7. [Crossref] [PubMed]

43. Demucha Macias J, S'anchez Spindola I. Two Human Cases of Laboratory Infection with Mucambo Virus. Am J Trop Med Hyg. 1965 May;14:475-8. [PubMed]

44. Moolla N, Viljoen N, Patharoo V, Grobbelaar A, Ismail A, Weyer J. Near-Complete Genome Sequence of Ndumu Virus from Garissa, Kenya, 1997. Microbiol Resour Announc. 2021 Aug 26;10(34):e0055121. [Crossref] [PubMed]

45. Kokernot RH, McIntosh BM, Worth CB. Ndumu virus, a hitherto unknown agent, isolated from culicine mosquitoes collected in northern Natal. Union of South Africa. Am J Trop Med Hyg. 1961 May;10:383-6. [Crossref] [PubMed]

46. Pisano MB, Dantur MJ, Ré VE, Díaz LA, Fariás A, Sánchez Seco MP, et al. Cocirculation of Rio Negro Virus (RNV) and Pixuna Virus (PIXV) in Tucumán province, Argentina. Trop Med Int Health. 2010 Jul;15(7):865-8. [Crossref] [PubMed]

47. Pisano MB, Oria G, Beskow G, Aguilar J, Königheim B, Cacace ML, et al. Venezuelan equine encephalitis viruses (VEEV) in Argentina: serological evidence of human infection. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Dec 12;7(12):e2551. [Crossref] [PubMed]

48. Teige LH, Aksnes I, Røsaeg MV, Jensen I, Jørgensen J, Sindre H, et al. Detection of specific Atlantic salmon antibodies against salmonid alphavirus using a bead-based immunoassay. Fish Shellfish Immunol. 2020 Nov;106:374-383. [Crossref] [PubMed]

49. La Linn M, Gardner J, Warrilow D, Darnell GA, McMahon CR, Field I, et al. Arbovirus of marine mammals: a new alphavirus isolated from the elephant seal louse, Lepidophthirus macrorhini. J Virol. 2001 May;75(9):4103-9. [Crossref] [PubMed]

50. Travassos da Rosa AP, Turell MJ, Watts DM, Powers AM, Vasconcelos PF, Jones JW, et al. Trocara virus: a newly recognized Alphavirus (Togaviridae) isolated from

mosquitoes in the Amazon Basin. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Jan-Feb;64(1-2):93-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

51. Kramer LD, Chin P, Cane RP, Kauffman EB, Mackereth G. Vector competence of New Zealand mosquitoes for selected arboviruses. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jul;85(1):182-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

52. ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland. Available at: <https://viralzone.expasy.org/> [Accessed September 18, 2021].

53. Button JM, Mukhopadhyay S. Capsid-E2 interactions rescue core assembly in viruses that cannot form cytoplasmic nucleocapsid cores. *J Virol.* 2021 Sep 8;JV10106221. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

54. Ramsey J, Mukhopadhyay S. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. *Viruses.* 2017 Aug 18;9(8):228. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

55. Uchime O, Fields W, Kielian M. The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. *J Virol.* 2013 Sep;87(18):10255-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

56. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol.* 2015 Sep;96(9):2483-2500. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

57. Abu Bakar F, Ng LFP. Nonstructural Proteins of Alphavirus-Potential Targets for Drug Development. *Viruses.* 2018 Feb 9;10(2):71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

58. Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Res.* 2015 Sep;121:59-68. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

59. Şahiner F, Aygar İS. A New Era in Vaccine Technology: mRNA-Based Vaccine Design. *J Mol Virol Immunol* 2020; 1(3): 9-17. [[Crossref](#)]

60. Fros JJ, Pijlman GP. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. *Viruses.* 2016 Jun 11;8(6):166. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

61. Myles KM, Wiley MR, Morazzani EM, Adelman ZN. Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):19938-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

62. Reichert E, Clase A, Bacetty A, Larsen J. Alphavirus antiviral drug development: scientific gap analysis and prospective research areas. *Biosecur Bioterror.* 2009 Dec;7(4):413-27. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

63. Battisti V, Urban E, Langer T. Antivirals against the Chikungunya Virus. *Viruses.* 2021 Jul 5;13(7):1307. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

64. Jin J, Liss NM, Chen DH, Liao M, Fox JM, Shimak RM, et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies Block Chikungunya Virus Entry and Release by Targeting an Epitope Critical to Viral Pathogenesis. *Cell Rep.* 2015 Dec 22;13(11):2553-2564. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

65. Selvarajah S, Sexton NR, Kahle KM, Fong RH, Mattia KA, Gardner J, et al. A neutralizing monoclonal antibody targeting the acid-sensitive region in chikungunya virus E2 protects from disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Sep 12;7(9):e2423. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

66. Nowee G, Bakker JW, Geertsema C, Ros VID, Göertz GP, Fros JJ, et al. A Tale of 20 Alphaviruses; Inter-species Diversity and Conserved Interactions Between Viral Non-structural Protein 3 and Stress Granule Proteins. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Feb 11;9:625711. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

67. de Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2003 Oct;9(10):1326-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

68. Go YY, Balasuriya UB, Lee CK. Zoonotic encephalitis caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014 Jan;3(1):58-77. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

69. Kim DY, Reynaud JM, Rasaloukaya A, Akhrymuk I, Mobley JA, Frolov I, et al. New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FXR and G3BP Proteins, for Assembly of Viral Replication Complexes. *PLoS Pathog.* 2016 Aug 10;12(8):e1005810. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

70. Powers AM, Roehrig JT. Alphaviruses. *Methods Mol Biol.* 2011;665:17-38. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

71. Atkins GJ. The Pathogenesis of Alphaviruses. *ISRN Virol* 2013; (2013): 1-22. [[Crossref](#)]

72. Ferreira FCPADM, da Silva ASV, Recht J, Guaraldo L, Moreira MEL, de Siqueira AM, et al. Vertical transmission of chikungunya virus: A systematic review. *PLoS One.* 2021 Apr 23;16(4):e0249166. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

73. Pouch SM, Katugaha SB, Shieh WJ, Annambhotla P, Walker WL, Basavaraju SV, et al.; Eastern Equine Encephalitis Virus Transplant Transmission Investigation Team. Transmission of Eastern Equine Encephalitis Virus From an Organ Donor to 3 Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2019 Jul 18;69(3):450-458. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

74. Hoad VC, Speers DJ, Keller AJ, Dowse GK, Seed CR, Lindsay MD, et al. First reported case of transfusion-transmitted Ross River virus infection. *Med J Aust.* 2015 Mar 16;202(5):267-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

75. Appassakij H, Silpapojakul K, Promwong C, Rujirojindakul P. The Potential Impact of Chikungunya Virus Outbreaks on Blood Transfusion. *Transfus Med Rev.* 2020 Jan;34(1):23-28. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

76. Carpentier KS, Morrison TE. Innate immune control of alphavirus infection. *Curr Opin Virol.* 2018 Feb;28:53-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

77. Long KM, Heise MT. Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. *Curr Trop Med Rep.* 2015 Mar;2(1):13-21. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]