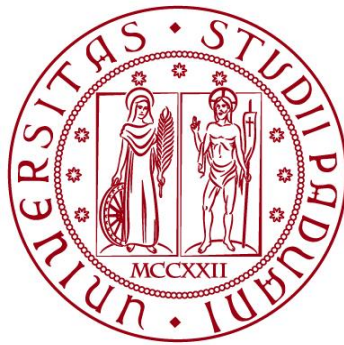


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in biologia molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Alongshanvirus: un rischio emergente per la salute pubblica

Tutor: Prof. Cristiano Salata
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Alessandra Moretton

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

*“Le donne che hanno cambiato il mondo
Non hanno mai avuto bisogno di mostrare nulla
Se non la loro intelligenza”*

Rita Levi Montalcini

Indice

Abstract

1.	La scoperta di ALSV	1
1.1.	La scoperta del virus Alongshan.....	1
1.2.	Isolamento del virus Alongshan	1
2.	Genoma.....	2
2.1.	Struttura del genoma.....	2
2.2.	Organizzazione funzionale del genoma.....	5
3.	Struttura e ciclo replicativo del virus.....	6
3.1.	Le proteine dell'envelope	8
3.2.	L'elicasi-proteasi NS2b-NS3 flavi-like	11
3.3.	La proteina NSP1 e il ruolo metiltransferasico	13
4.	Epidemiologia ed ecologia	16
5.	Diagnosi e sorveglianza	18
6.	Discussione	19
Bibliografia e sitografia		21

Abstract

Alongshanvirus è stato rilevato per la prima volta in Cina da una paziente con sintomi febbrili e una storia di punture da zecca.

Da lì ci sono stati poi rilevamenti in altre zone del globo come la Finlandia sud orientale, il canton Grigioni in Svizzera, la bassa Sassonia o le regioni di Chelyabinsk e le repubbliche di Altai e Tuva in Russia.

Si presenta come un virus segmentato a ssRNA a polarità positiva in cui il segmento 1 codifica la proteina non strutturale "NS5-like" con attività di RNA polimerasi RNA dipendente e di metiltransferasi, mentre il segmento 3 codifica la proteina "NS3-like" con attività di elicasi-proteasi. I segmenti 2 e 4 invece codificano le glicoproteine strutturali del capsido VP1, VP2 e VP3.

Le specie di zecca coinvolte nella trasmissione virale sono diverse e tra queste spiccano maggiormente *I. persulcatus* e *I. ricinus* che fungono da vettore per le specie serbatoio come animali addomesticati o selvaggina, che entrando a contatto con l'uomo possono rappresentare una minaccia per la salute pubblica. Per questo motivo è importante un'attività di sorveglianza e la disponibilità di metodi diagnostici efficaci per prevenire il rischio di potenziali epidemie.

1. La scoperta di ALSV

1.1. La scoperta del virus Alongshan

La paziente zero da cui nel 2019 è partita l'indagine per la scoperta dell'Alongshanvirus (ALSV) è stata una contadina di 42 anni del nord-est della Cina, nello specifico della regione della Mongolia interna, che presentava dei comuni sintomi febbrili, mal di testa e una storia di morsi di zecca.

Da una prima indagine diagnostica è stato escluso quale agente eziologico il virus della TBE (Tick Borne Encephalitis) in quanto non sono stati trovati né l'RNA del virus, né gli anticorpi contro di esso nei campioni di sangue raccolti dalla paziente.

Da analisi di sequenziamento è emerso che poteva trattarsi di un altro tipo di virus a RNA, rilevato poi anche in altri pazienti con febbre e mal di testa oltre che in zecche e zanzare raccolte nella regione. Tuttavia il rilevamento di un nuovo virus basato sul solo sequenziamento dell'acido nucleico è una condizione necessaria ma non sufficiente per determinare l'eziologia di un'infezione virale, in quanto è necessario anche riuscire ad isolare il virus (2).

1.2. Isolamento del virus Alongshan

Sospettando che la malattia fosse correlata ad un agente patogeno trasmesso dalle zecche, sono stati prelevati campioni di siero di tutti quei pazienti che nello stesso ospedale della paziente zero avevano una storia di morsi da zecca e sintomatologia febbrile, potendo così fare un'analisi comparata tra le sequenze virali dei pazienti e quelle rilevate nelle zecche e zanzare raccolte nella stessa regione.

I surnatanti dei campioni di sangue ottenuti sono stati processati e inoculati su monostrati di cellule Vero (linea cellulare isolata da cellule epiteliali di rene di scimmia), di U-87MG (linea cellulare isolata da glioma maligno umano) e di HFF (linea cellulare fibroblastica isolata da tessuto di prepuzio umano) monitorando la comparsa di un eventuale effetto citopatico, per poi poter effettuare l'analisi microscopica e procedere con l'isolamento del virus. ALSV ha effettivamente dimostrato effetto citopatico nelle linee cellulari in cui è stato coltivato, dimostrando un'avvenuta replicazione virale e da qui è stato possibile sequenziare e isolare il primo ceppo ALSV H3.

Questo primo ceppo è stato dunque caratterizzato sia a livello molecolare che filogenetico ed a livello epidemiologico.

Nonostante molti dei sintomi nei pazienti selezionati fossero associabili a infezioni da parte altri agenti eziologici come quelli della TBE, SFTSV (Sever Fever

with Trombocytopenia Syndrome Virus), rickettsiosi e leptospirosi, è stato possibile diagnosticare l'infezione da ALSV.

A differenza dei pazienti affetti da TBE, in quelli affetti da ALSV non ci sono implicazioni a livello del sistema nervoso centrale (meningite o encefalite) mentre condividono sintomi come febbre e mal di testa. Così come per ALSV, anche i pazienti con leptospirosi possono presentare febbre e mal di testa iniziali, con la differenza che i pazienti affetti da ALSV non presentano rash e ittero. I pazienti con SFTSV sono invece caratterizzati da leucopenia e trombocitopenia. Anche per i pazienti con rickettsiosi possono insorgere mal di testa e febbre, ma ad esempio in questo caso si osservano eruzioni cutanee su mani e piedi che invece per i pazienti infettati da ALSV si verificano in altre parti del corpo.

È emerso inoltre dagli studi come ALSV riesca ad infettare un ampio spettro di ospiti: mammiferi come l'uomo, bovini, capre, selvaggina, ecc, ma anche alcuni uccelli (1). In vitro è stato possibile studiare l'infezione anche su molte linee cellulari umane come ad esempio cellule di neuroblastoma, cellule amniotiche, cellule di epatoma e cellule monocitiche, riuscendo a provare che ALSV può essere realisticamente un potenziale agente eziologico della sintomatologia presentata dai pazienti (4).

2. Genoma

Mediante il confronto tra pazienti infettati dal ceppo ALSV H3 è stato possibile sequenziare il genoma del virus, lungo dai 9200 agli 11350 nucleotidi.

2.1. Struttura del genoma

ALSV si presenta come un virus a ssRNA segmentato a polarità positiva, costituito da quattro segmenti, dei quali i segmenti 1 e 3 sono monocistronici mentre i segmenti 2 e 4 sono bicistronici (6).

Il segmento 1 è costituito da 2995 nucleotidi ed ha un unico promotore che controlla il frame di lettura che codifica la proteina non strutturale NS1, di 914 amminoacidi. Il segmento 3 invece è costituito da 2811 nucleotidi con un unico promotore che controlla l'espressione della proteina non strutturale NS2, un'elicasi simile a quella nei *Flavivirus* (1). Questi due segmenti sono analoghi alle sequenze codificanti le proteine non strutturali NS5 e NS3 dei *Flavivirus* e sono relativamente conservati rispetto ad essi, mentre gli altri due segmenti hanno un antenato ancora sconosciuto a livello filogenetico e codificano proteine strutturali esclusive di ALSV (3).

La peculiarità del genoma segmentato caratterizza ALSV e lo distingue dal genere dei *Flavivirus*, tipici virus a RNA a singolo filamento a polarità positiva ma non segmentati, a cui è associato. Infatti, ALSV viene definito un virus flavi-like e fa

parte del gruppo dei Jingmenvirus (JMTV) che riunisce una serie di virus flavi-like segmentati.

In generale in tutti i membri del gruppo JMTV, ci sono regioni non tradotte 5' UTR e 3' UTR comuni a tutti i segmenti.

Il segmento 1 viene definito "NS5 like" in quanto codifica la metiltransferasi e la RNA polimerasi RNA dipendente che media la replicazione virale in modo analogo a NS5 dei flavivirus classici, mentre il segmento 3 è definito "NS3 like" in quanto codifica la serina proteasi e l'elicasi come per NS3 e NS2b nei classici flavivirus. I segmenti 2 e 4 invece non presentano omologie con i flavivirus, ma sembrano avere la funzione di codificare glicoproteine dell'envelope e proteine del capsido dei JMTV.

Questo tipo di osservazioni è estendibile anche ad ALSV appartenendo al gruppo dei JMTV e condividendo con essi il 75% degli amminoacidi del capsido per un totale del 93% di amminoacidi simili. (5)

Nei virus a RNA come ALSV, le regioni UTR sono importanti perché intervengono nella traduzione, replicazione, regolazione del ciclo vitale, stabilità dell'RNA e ciclizzazione del genoma, per cui si tratta solitamente di strutture conservate all'interno di un determinato gruppo di virus. Nonostante nei *Flavivirus* sia stato ampiamente studiato il ruolo degli UTR, nel gruppo dei JMTV non è stato ancora approfondito, però si è visto come siano conservate le sequenze 5'-GCAAGUGCA3' al 5' UTR e 5'-GGCAAGUGC-3' e 5'-CAAGUG-3' al 3'UTR. Questo aspetto comune a tutti e quattro i segmenti prova il fatto che appartengono allo stesso virus e non a più virus coinfectanti lo stesso ospite. Queste osservazioni supportano così la natura segmentata di questi virus.

Al 5' UTR è stato possibile studiare queste regioni partendo dall'analisi di tre ceppi di ALSV: i ceppi Miass527, Miass502 e Miass519 e di otto ceppi del virus YGTV sempre appartenente al gruppo dei *Jingmenvirus*.

Per questi studi, i virus sono stati mantenuti nelle linee cellulari di zecca HAE/CTVM8 o IRE/CTVM19 per un periodo dai sei mesi ai tre anni, successivamente è stato effettuato uno screening della carica virale presente nei surnatanti e sono state amplificate le estremità del cDNA tramite il metodo di PCR-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Tramite successivo sequenziamento e allineamento delle sequenze si sono potute quindi caratterizzare le sequenze terminali dei virus in questione.

Dai risultati è emerso che all'estremità 5'UTR di tutti i segmenti di ALSV e più in generale dei Jingmenvirus come ad esempio il virus della zecca Yanggou (YGTV), i primi sei nucleotidi hanno una sequenza 5'AGUAAA-3' conservata al 100% come si vede anche in *figura 1* (A). In figura sono rappresentate anche le strutture conservate degli UTR di ALSV e YGTV al 5' (B) oltre che le strutture conservate dei 5' UTR dei quattro segmenti di ALSV(C-D-E-F).

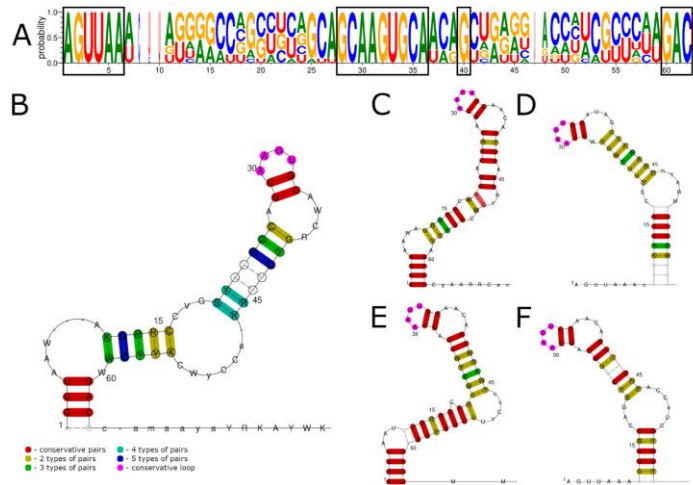


Figura 1: (A) Sequenze conservate al 5' dei segmenti di ALSV; (B) Sequenza conservata degli UTR dei vari segmenti per ALSV e YGTV; (C)(D)(E)(F) Conformazione delle strutture conservate del 5' UTR dei quattro segmenti di ALSV.

Da questi allineamenti sono state fatte delle previsioni di struttura: al 5' si ha una struttura ad anello-stelo, come si vede anche in *figura 1*, in cui i nucleotidi 28-35 formano due coppie GC alla base di un tetraloop AAGU. Si tratta di una regione ad alto tasso di conservazione tra ceppi virali diversi, ma che varia nei diversi segmenti e che è seguita da una struttura a stelo di forma simile ma molto meno conservata.

Un'altra sequenza consenso (*figura 1A*) conservata e interna al 5' è 5'-GCAAGUGCA-3', che forma un'altra struttura a stelo in cui due coppie GC supportano un tetraloop AAGU. Queste osservazioni sono state ottenute allineando separatamente le sequenze del segmento 2 e dei segmenti 1,3 e 4, in quanto altrimenti risultava un allineamento con omologia molto ridotta al 5', probabilmente a causa della differenza in lunghezza tra gli UTR dei segmenti.

La struttura conservata al 3' è invece stata determinata tramite l'analisi di cinque ceppi di ALSV e otto di YGTV. Dall'allineamento delle sequenze dei segmenti è emerso che tra le posizioni 282-298 c'è una regione ricca in A di lunghezza variabile, oltre la quale ad oggi non si conosce ancora la struttura genomica del 3' (*figura 2*).

Al 3' UTR sono presenti due sequenze conservate al 100%: 5'-CAAGUG-3' e 5'-GGCAAGUGC-3'. Queste sequenze vanno a formare assieme una struttura a manubrio grazie ad una coppia GC presente in ciascuna delle sequenze che

supporta un tetraloop AAGU, con la differenza che per il primo caso il loop è supportato da due/tre coppie di nucleotidi, mentre per il secondo ce ne sono sette/otto coppie.

Questo tipo di sequenze, sia 3'UTR che 5'UTR, trovano riscontro anche più in generale nei *Jingmenvirus*, a prova del fatto che si tratta di terminali conservati anche all'interno del gruppo di appartenenza di ALSV (6).

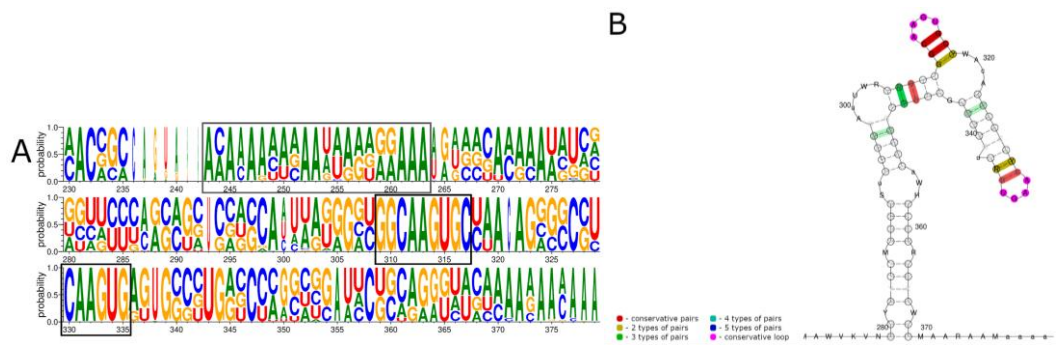


Figura 2: (A) Sequenza conservata al 3'; (B) Conformazione strutturale del terminale 3'.

2.2. Organizzazione funzionale del genoma

I segmenti analoghi a quelli che nei *Flavivirus* non segmentati codificano le proteine virali NS3 e NS5 e che sono comuni a tutti i virus della famiglia di *Jingmenvirus* alla quale ALSV appartiene, hanno però una struttura diversa sotto diversi punti di vista: mentre nei *Flavivirus* canonici il genoma viene trascritto come un'unica molecola di mRNA che codifica una poliproteina poi processata nelle singole proteine strutturali e non strutturali, nei *Jingmenvirus* alcuni segmenti possono essere policistronici ed avere delle ORF separate sovrapposte o non sovrapposte dalle quali originano le diverse proteine che in taluni casi possono originare anche da meccanismi di frameshifting ribosomiale in fase di traduzione.

In secondo luogo i *Jingmenvirus* come ALSV presentano delle sequenze di poliA a livello dell'estremità 3' NCR mentre nei *Flavivirus* canonici non è presente poliadenilazione. In figura 3 è possibile confrontare le strutture genomiche tipiche di flavivirus non segmentati (a) con quelle di flavivirus segmentati come ALSV o ad esempio anche Guaico Culex Virus (GCXV) trasmesso dalle zanzare che invece è costituito da cinque segmenti (b).

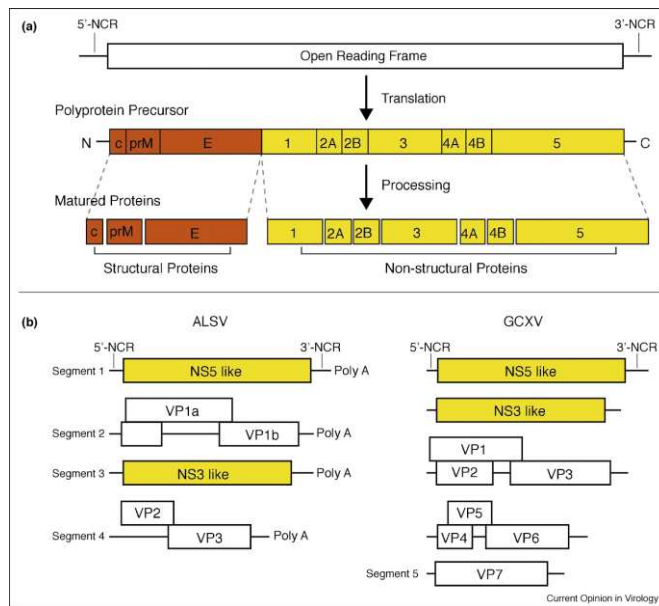


Figura 3: (A) Struttura genomica dei Flavivirus non segmentati; (B) Struttura genomica dei Flavivirus segmentati ALSV e GCXV.

Come è possibile notare in figura 3, è presente una ORF a livello del segmento 2, denominata VP4, che codifica una proteina di soli tre domini transmembrana che è stata riscontrata solo in Jingmenvirus isolati da zecche o mammiferi ma non zanzare o altri insetti.

Ad oggi non è però ancora noto che cosa comportino a livello funzionale queste variazioni genomiche estreme rispetto alla struttura dei Flavivirus tradizionali (4). Si può parlare di variazione

estrema in quanto il processo di segmentazione è il risultato di una divergenza sempre maggiore da un virus ancestrale comune ai Flavivirus. Questo aspetto è suggerito dal fatto che le proteine "NS5 like" e "NS3 like" sono più correlate alle proteine del genere Flavivirus che a quelle di altri generi per cui si deduce che abbiano un antenato comune. Alcuni virus della famiglia si sono poi evoluti ulteriormente come nel caso di ALSV, il quale presenta un frameshift nel gene del segmento 2, come è visibile anche in figura 3 (5).

3. Struttura e ciclo replicativo del virus

ALSV è un virus costituito sia da proteine non strutturali simili a quelle dei Flavivirus, come il complesso NS2b-NS3 codificante l'elicasi-proteasi e NS5 codificante la RNA polimerasi RNA dipendente, sia da proteine strutturali diverse da quelle dei flavivirus come VP1, VP2 e VP3.

VP1 è codificata dal segmento 2 e presenta due ORF sovrapposte (VP1a VP1b) oltre ad un peptide segnale, due siti di N-glicosilazione e tre regioni transmembrana (figura 4). In seguito all'allineamento dei codoni della regione VP1a di diversi ceppi di ALSV, è emerso come ci siano delle regioni di sequenza molto conservate a livello dell'ORF.

La porzione 3' terminale è conservata probabilmente grazie alla sua sovrapposizione con l'ORF VP1b ed è stato identificato anche un motivo di slittamento A AAA AAC sempre a livello dell'ORF VP1a tramite cui il ribosoma può effettuare un frameshift e andare a tradurre VP1b al posto di VP1a. Anche la porzione iniziale del segmento 2 è conservata: i primi 110 codoni dell'ORF VP1a.

Questo alto livello di conservazione è probabilmente dovuto alla presenza di una new upstream Open Reading Frame (nuORF) che si sovrappone alla sequenza di VP1 per i primi 365 nucleotidi su 399 da cui è costituita ed è un elemento presente in tutte le sequenze virali nel gruppo JMTV con il segmento 2 completo. In ALSV questa nuORF codifica 132 amminoacidi che vanno a costituire una piccola proteina di membrana mediante una sequenza segnale all’N-terminale e tre regioni transmembrana con una coda al C-terminale, diversamente invece dalla nuORF di JMTV che è più corta, non presenta la coda C-terminale e presenta il 50% di identità con quella di ALSV.

VP2 e VP3 invece sono codificate a partire dal segmento 4 del genoma dove VP2 è una proteina di piccole dimensioni e presenta un peptide segnale, mentre VP3 è una proteina con nove domini transmembrana e che viene espressa grazie ad un frameshifting del ribosoma 1 a livello di una sequenza di slittamento G GTT TTT sul DNA del segmento 4 (1)(7).

A partire dal segmento 1 viene codificata la proteina non strutturale NS5 che presenta domini polimerasici e metiltransferasici oltre ad un peptide segnale a livello dell’N-terminale mentre a partire dal segmento 3 invece viene codificata NS3 avente le funzioni di serina proteasi e RNA elicasi. Entrambe le proteine hanno regioni transmembrana analoghe a quelle presenti nel ceppo umano isolato dalla paziente zero in Cina (ceppo H3) (7).

In *figura 4* possiamo vedere schematizzata la struttura dei quattro segmenti e delle ORF che li caratterizzano con in giallo le regioni transmembrana, in blu le regioni sottoposte a frameshift ribosomale e in verde la sequenza nuORF, mentre gli asterischi segnalano i probabili siti di N-glicosilazione.

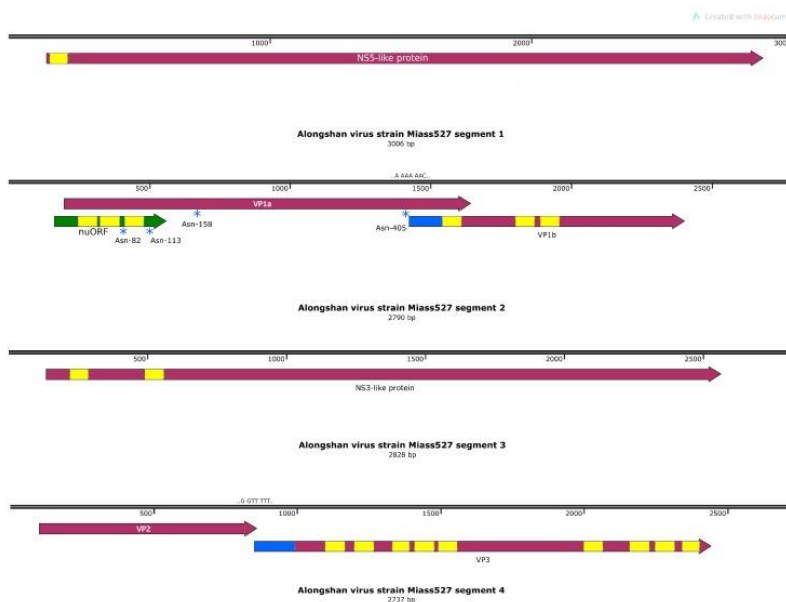


Figura 4: organizzazione dei quattro segmenti genomici di ALSV.

Come per tutti i *Flavivirus*, anche per ALSV il genoma viene tradotto in una poliproteina che poi viene scissa in proteine strutturali e non strutturali da parte di proteasi virali e dell'ospite. Le proteine strutturali vengono codificate a partire dal 5' del genoma così come anche alcune glicoproteine, mentre quelle non strutturali come NS2b-NS3 e NS5 vengono codificate dal 3'. La proteomica a questo proposito è risultata utile per effettuare allineamenti di sequenze che hanno permesso di andare a definire struttura secondaria, accessibilità ai solventi, presenza di eliche transmembrana, topologia, presenza di peptidi segnali, ecc. di proteine e glicoproteine che costituiscono il virione.

Se si confrontano le strutture genomiche dei *Flavivirus* non segmentati e di quelli segmentati e le relative proteine codificate, si può notare una correlazione importante tra le due tipologie di virus deducendo come le proteine codificate dai virus segmentati siano il risultato di scissioni proteolitiche della poliproteina dei virus non segmentati (esempio del virus della febbre gialla in *figura 5*).

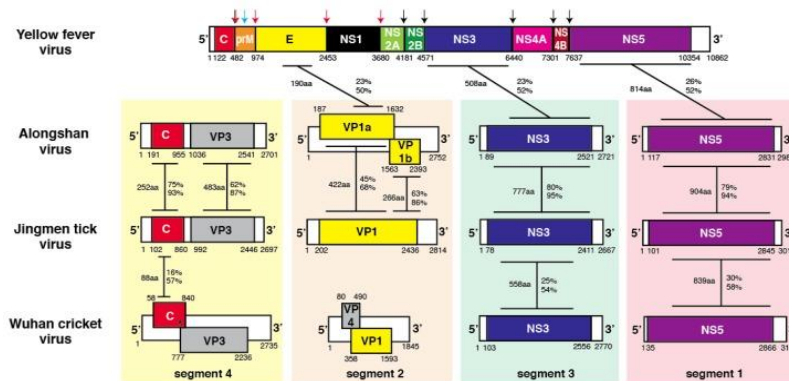


Figura 5: confronto tra struttura genomica di YFV non segmentato e i virus segmentati ALSV, JTV e WCV.

Si vede la struttura 5'-capside-PrM-envelope-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' del *Flavivirus* non segmentato e come a partire da questo si siano evoluti quelli segmentati. (8)

3.1. Le proteine dell'envelope

Il segmento 4 codifica una proteina del capsid e VP3 di membrana che però non hanno somiglianza con le medesime codificate nei *Flavivirus* non segmentati. Le proteine di membrana di ALSV e JMTV hanno un elevato grado di similarità tra loro, ma non sono strettamente correlate ad esempio ad altri virus flavi-like come WHCV (Wuhan Cricket Virus).

Il segmento 2 invece codifica le proteine dell'envelope e in particolare per ALSV codifica la proteina VP1 sotto forma di due peptidi VP1a e VP1b mentre nel JMTV la proteina è codificata come singolo peptide mostrando quindi allineamenti locali limitati e un'identità amminoacidica non particolarmente elevata rispetto a quella di ALSV. VP1a di ALSV e VP1 di JMTV condividono invece di più a livello

dell’N terminale del segmento e VP1b a livello del C terminale. Questo a differenza di WHCV, nel quale le proteine codificate dal segmento 2 sono molto diverse in quanto si tratta di un segmento più breve con due ORF sovrapposte codificanti dei peptidi segnale all’N terminale e un dominio transmembrana C terminale.

Analizzando la struttura delle glicoproteine VP1, VP1a e VP1b costituenti l’envelope del virus (*figura 6*), si possono notare tre domini transmembrana (porzioni viola) precedute da due motivi alfa-elica che formano complessivamente quello che viene caratterizzato come “stem domain”. Si nota inoltre che il terminale C è caratterizzato dalla presenza di due domini transmembrana seguiti da un dominio carico negativamente e uno positivamente, con la differenza che nella sequenza VP1a di ALSV è presente anche un terzo dominio transmembrana che ad esempio in YGTV non c’è.

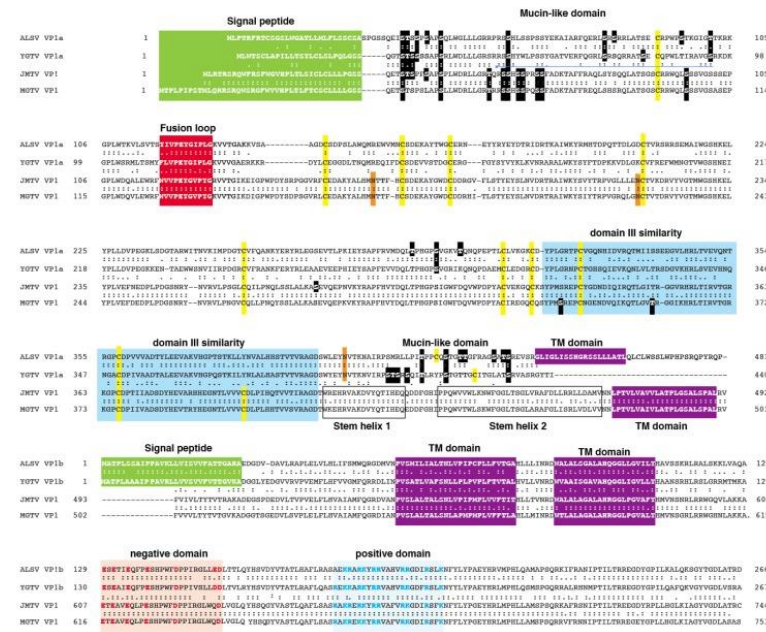


Figura 6: relazione tra l’aspetto strutturale e funzionale del genoma di ALSV.

Dall’immagine in *figura 6* è importante notare anche la presenza, comune in generale ai *Jingmenvirus*, di tratti ricchi in prolina, serina e treonina, composizione tipica dei domini mucinici delle glicoproteine. In corrispondenza di questi aminoacidi si nota la presenza di siti di O-glicosilazione (porzione evidenziata in nero) nella regione subito successiva al peptide segnale all’N-terminale.

Sono presenti dei residui O-glicosilati anche a livello di quello che in figura è segnato come dominio III e il dominio simile alla mucina è presente anche al C-terminale nei virus segmentati che codificano due glicoproteine, mentre per i *Flavivirus* non segmentati non è presente. Il dominio a livello del quale si trova

quest'altro dominio mucinico viene chiamato "guinzaglio": è ricco in prolina, serina e treonina e presenta sette glicani legati all'ossigeno di questi residui.

Essendo VP1 una glicoproteina di membrana con il ruolo di mediare la fusione virale con la membrana cellulare dell'ospite, è presente un loop di fusione a livello della sequenza e si trova in corrispondenza delle regioni più conservate. Queste sequenze di fusione corrispondono a quelle delle proteine di fusione di classe II e corrispondono alla porzione di amminoacidi da 119 a 129 (in rosso in *figura 6*).

Si può dedurre che essa appartenga alla classe II piuttosto che alle classi I e III in quanto non tendono a formare delle alfa eliche estese prima dei loop di fusione ad eccezione degli "stem domain", bensì presentano prevalentemente domini alfa elica corti e foglietti beta.

Gli ectodomini delle glicoproteine flavivirali presentano dunque tre porzioni: il dominio I centrale, il dominio II che contiene il loop di fusione e il dominio III di legame al recettore della cellula ospite, caratterizzato dalla presenza di cisteine conservate (evidenziate in giallo in *figura 6*).

In merito a queste considerazioni è stato possibile modellizzare delle possibili strutture bidimensionali della glicoproteina tenendo conto delle caratteristiche strutturali date dal legame proteico e dalle cisteine, che sono gli amminoacidi più conservati. Da queste analisi si è potuta confermare l'appartenenza del loop di fusione alle proteine di tipo II.

Questo tipo di domini (I, II, III) si presentano sulla superficie dei virioni maturi sotto forma di omodimeri e possono andare a trimerizzare nel momento in cui vengono esposti al pH acido dell'endosoma durante la fusione con la membrana ospite.

Il processo inizia con il movimento del loop di fusione che si va ad inserire nella membrana ospite grazie alla presenza di un dominio cerniera tra i domini I e II oltre che all'interazione del dominio stem con i domini I e III, il quale permette l'emifusione dei doppi strati fosfolipidici delle membrane virale e cellulare. Quando poi le membrane si fondono completamente, avviene la trimerizzazione con il dominio II ed è permesso l'ingresso delle ribonucleoproteine virali nella cellula.

I domini simili alla mucina invece si trovano esposti sulla superficie delle proteine.

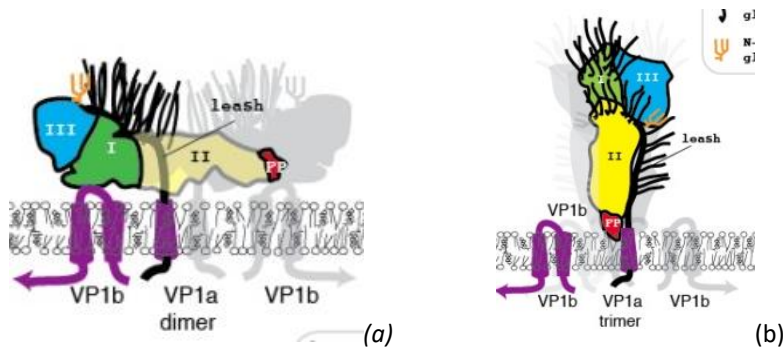


Figura 7: struttura bidimensionale di ALSV con i relativi domini I, II e III, i domini simili alla mucina (filamenti neri e gialli) e le proteine transmembrana dell'envelope nelle fasi di pre-fusione (a) e post-fusione (b).

Per passare dalla forma dimerica di pre-fusione a quella trimerica post-fusione, il dominio guinzaglio passerà dall'occupare lo spazio dei dimeri del virione all'occupare il solco tra i monomeri del trimero (figura 7). (8)

3.2. L'elicasi-proteasi NS2b-NS3 flavi-like

I segmenti 1 e 3 codificano rispettivamente le proteine strutturali NS5 e NS2b-NS3 flavi-like che presentano una somiglianza limitata con quelle flavivirali classiche ma che sono molto simili tra ALSV e JMTV ed hanno un'identità amminoacidica ancora più elevata all'interno di uno stesso gruppo arrivando a superare il 90%.

Di queste proteine è stata identificata la struttura cristallina con le relative caratteristiche funzionali, in particolare per l'elicasi NS3 (NS3-Hel) in quanto è una proteina fondamentale nel processo replicativo del virus grazie ai suoi vari ruoli enzimatici.

All'estremità N-terminale presenta un dominio proteasico coinvolto nel processamento delle poliproteine, mentre al C-terminale ha un dominio elicastico coinvolto nel capping e nella sintesi di RNA virale per l'incapsidamento. Nei vari virus anche non segmentati in cui questa proteina è presente, essa esercita un ruolo comune di idrolisi di ATP, riconoscimento e svolgimento dell'RNA virale e condivide vari aspetti strutturali. Le proteine NS3 nei virus segmentati condividono però una limitata identità di sequenza con quelle dei *Flavivirus* non segmentati.

Per studiare dal punto di vista strutturale e funzionale l'elicasi, è stato sovraespresso il C-terminale della proteina, è stato fuso un tag all'N terminale, è stata purificata la proteina e tagliato il tag per poi poterne studiare l'aspetto funzionale tramite un test di ATPasi tramite il quale è stata definita la cinetica di idrolisi dell'enzima nei confronti sia di ATP che UTP.

Da qui è emersa l'aspecificità dell'enzima per gli NTPs così come avviene per le elicasi NS3 dei *Flavivirus* classici, tant'è che hanno un'attività paragonabile.

NS3-Hel ha un'identità di sequenza limitata con le elicasi flavivirali classiche NS3 per cui non ci sono modelli utili per determinare la struttura di questa proteina. È stato quindi necessario utilizzare una tecnica ab initio tramite la quale si è potuta risolvere la struttura proteica: la piega di NS3 ALSV è simile a quella delle elicasi flavivirali non segmentate.

Dopo aver delineato un albero filogenetico per mettere in relazione NS3 ALSV e le NS3 flavivirali, è emerso come ALSV e il virus dell'epatite C, un esempio di *Hepacivirus* della famiglia dei *Flaviviridae*, abbiano una corrispondenza elevata a livello strutturale.

Questa similarità è stata rilevata dai valori di rmsd (root-mean-square deviation) alti, dovuti probabilmente al movimento tra i domini D1 e D2 della proteina in seguito all'interazione tra RNA o ATP e il dominio D3. D1 e D2 di ALSV presentano un'elevata corrispondenza con gli analoghi negli altri *Flavivirus*, mentre D3 è molto più variabile e la somiglianza è limitata (figura 8).

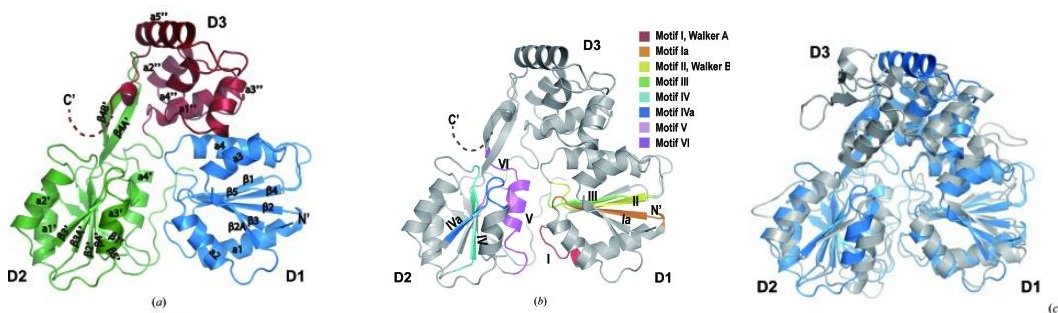


Figura 8: (a) Struttura secondaria di NS3 con i relativi domini; (b) Motivi conservati della proteina NS3; (c) Sovrapposizione struttura NS3 di ALSV e ZIKV.

Dalle analisi (figura 8) NS3-Hel risulta come una proteina di forma triangolare e appiattita costituita da tre domini: D1 e D2 N-terminali e D3 C-terminale. D1 è costituito da sei foglietti beta paralleli inseriti in una struttura a quattro alfa eliche, mentre D2 presenta due foglietti beta antiparalleli sporgenti e che entrano in contatto con D3. Si tratta di un motivo a forcina inserito in un contesto idrofobico costituito da alcune alfa eliche di D2 e l'N-terminale di D3.

Il dominio D3 è risultato inoltre molto sensibile alla proteolisi e questo può spiegare la tipica flessibilità funzionale del dominio: interviene nel legame con la RNA polimerasi RNA dipendente NS5 e riesce a legare l'RNA a livello della superficie concava che crea con D2, il che va a stabilizzare la sua conformazione. Il dominio D1 contiene invece i motivi I, II e III, mentre D2 è costituito dai domini IV, IVa, V e VI.

Dal confronto con *Flavivirus* non segmentati come ad esempio ZIKV (Virus Zika), sono stati identificati i residui fondamentali per la catalisi ed è emerso come quelli che intervengono nell'idrolisi, nel riconoscimento degli NTPs ecc siano conservati, per cui si deduce come il meccanismo alla base dell'idrolisi dell'ATP sia conservato anche nei virus segmentati.

I residui Gly349 e Gly351 riconoscono ad esempio il trifosfato degli NTPs, Thr353 e Glu438 coordinano uno ione manganese per l'attività idrolitica, Arg354 stabilizza l'adenosina dell'ADP e svolge molti altri ruoli. A differenza di tutti gli altri residui, però, Thr353 e Arg354 non si sovrappongono ai loro corrispondenti in ZIKV, probabilmente a causa del fatto che negli esperimenti condotti, NS3 ALSV si trova nella sua forma apo mentre NS3 ZIKV è nella sua forma funzionale.

Una volta legata l'ATP, questa induce cambiamenti conformazionali al p-loop della proteina che si occupa di mediare l'idrolisi della molecola ai fini di permettere l'attività elicastica di NS3, necessaria per la replicazione dell'RNA genomico virale.

Il legame di NS3 all'RNA invece permette alla proteina stessa di acquisire una competenza catalitica che le consente di svolgere l'attività di idrolisi dell'ATP e va a influenzare il legame dello ione manganese quindi l'attività catalitica dell'enzima. In particolare l'RNA che si lega alla proteina è situato nel solco tra i domini D1/D2 e D3: il 3' terminale si trova sopra D1 mentre il 5' terminale entra in contatto con i residui di D2 tramite la forcina beta che si estende dal dominio però il meccanismo di riconoscimento è diverso tra i virus segmentati e quelli non segmentati. Questo in quanto residui come Tyr593 e Tyr595 che interagiscono con il 2'OH del 3' terminale dell'RNA, lo fanno tramite legame π e sono idrofobici, a differenza dei *Flavivirus* non segmentati nei quali l'interazione avviene tra residui idrofilici (9).

Le attività elicastica e ATPasica sono dunque strettamente correlate tra loro e contribuiscono all'incapsidamento del genoma virale e alla sua replicazione nell'ospite.

3.3. La proteina NSP1 e il ruolo metiltransferasico

Un altro enzima fondamentale nella replicazione virale è la metiltransferasi, che il virus utilizza a suo vantaggio per silenziare la trascrizione di alcuni geni dell'ospite ed evadere quindi la risposta immunitaria. In ALSV il segmento 1 codifica in particolare la proteina non strutturale NSP1 omologa a NS5 flavivirale, la quale ha due principali attività enzimatiche: quella di metiltransferasi (MTasi) e di RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp). NSP1 presenta un peptide segnale o una regione transmembrana all'N-terminale, al C-terminale il dominio RdRp, mentre il dominio MTasi è quello centrale.

A livello strutturale e funzionale le MTasi sono state ben caratterizzate per i *Flavivirus*: metilano il cap dell'RNA a livello della guanina in posizione 7 del

ribosio della prima adenosina replicata utilizzando come donatore di gruppo metile la S-adenosil-L-metionina (SAM) che va a generare come prodotto la S-adenosil-L-metionina (SAH). Queste molecole si legano a livello di un dominio centrale, una tasca di legame conservata.

Per i Jingmenvirus invece non sono ancora state così ben studiate, motivo per cui è stato un importante contributo andare a definire la struttura cristallina dell'enzima in ALSV sia in forma libera che legata a SAM/SAH.

Confrontando l'affinità di legame che SAM/SAH hanno con l'enzima per i *Flavivirus* non segmentati e per ALSV, si può valutare l'energia di legame liberata e quindi la forza del legame instaurato tramite una tecnica come quella della calorimetria di titolazione isoterma (ITC), grazie alla quale è stato possibile determinare come l'affinità di legame in ALSV sia inferiore rispetto a quella nei *Flavivirus* non segmentati. Così è possibile sia definire il valore di affinità che il valore N, indice della stechiometria del legame SAM/MTasi.

Per comprovare questa differenza tra virus segmentati e non segmentati, si sono studiati ulteriormente i comportamenti di legame tra l'enzima e i loro substrati con la tecnica ITC potendo apprezzare come nei virus non segmentati SAM e SAH si sono subito inseriti nella tasca di legame dell'enzima. Successivamente si è studiata l'affinità di legame con la proteina nativa e con la proteina denaturata e in seguito ripiegata sempre tramite analisi ITC: mentre per l'enzima di virus non segmentati si nota una differenza sostanziale tra l'affinità di legame dei substrati con l'enzima in forma nativa o denaturata-ripiegata, nel caso di ALSV questa differenza è limitata. Da ciò si deduce che nel primo caso la tasca di legame SAM/SAH è pre-occupata in quanto nella forma nativa l'affinità di legame rilevata è molto inferiore, mentre nel caso di ALSV questa tasca di legame è libera.

Studiando inoltre la proteina NSP1 interamente, con i domini MTasi e RdRp, è emersa una maggiore attività metiltransferasica rispetto alla proteina con il solo dominio MTasico: è possibile un effetto allosterico del dominio RdRp sul dominio MTasi che ne incrementa l'attività enzimatica e quindi favorisce la replicazione virale.

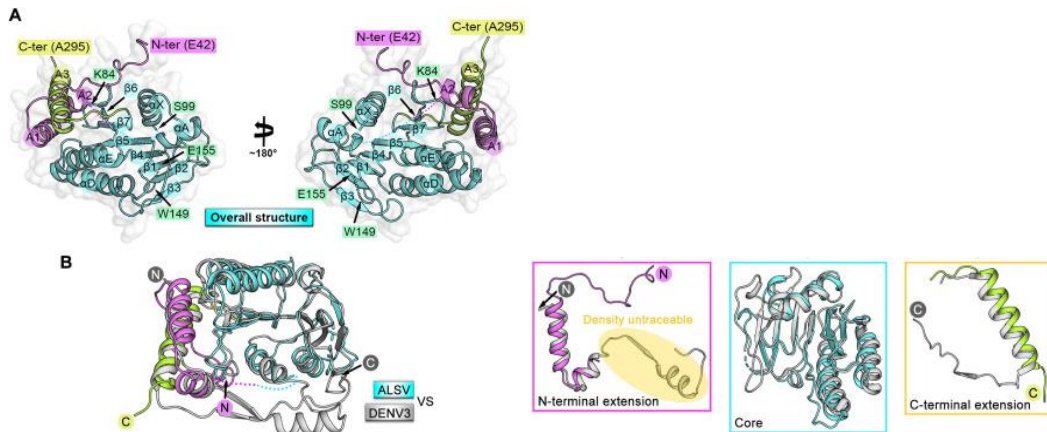


Figura 9: struttura globale della metiltransferasi d ALSV costituita da dominio C-terminale, N-terminale e core.

A livello strutturale l'enzima di ALSV è una proteina globulare divisa in tre domini (figura 9): l'N-terminale costituito da un anello seguito da un motivo elica-giro-elica, il C-terminale costituito da una alfa elica e il dominio centrale costituito da un foglio beta ripiegato in sette filamenti e circondato da quattro alfa eliche, una struttura detta $\alpha\beta$ -Rossmann.

Questa struttura secondaria si sovrappone a quella delle MTasi omologhe di virus non segmentati in particolare a livello del dominio centrale, seppur presentando invece differenze all'N e al C terminale: all'N-terminale i virus non segmentati non contengono l'anello e il motivo elica-giro-elica è di lunghezza maggiore ripiegandosi in un'alfa elica e un foglietto beta extra, al C-terminale invece le MTasi non segmentate non sono costituite da una sola alfa elica bensì da due e da un foglietto beta aggiuntivo.

Quando invece l'enzima è complessato con uno dei suoi substrati, questi vanno ad inserirsi in forma estesa in una tasca della regione centrale, che è conservata tra virus segmentati e non segmentati, costituita da eliche αX , αA , αD e filamenti $\beta 1$ - $\beta 4$ stabilizzandosi con interazioni di legami idrogeno tra residui dell'enzima e quelli dei substrati. Per stabilizzare meglio SAM, nei virus non segmentati la tasca di legame presenta due legami idrogeno ulteriori a livello dell'anello tra i filamenti beta2 e beta3 (figura 9), il quale riveste la parete laterale della tasca. Nei *Flavivirus* non segmentati questa porzione è più ampia proprio per permettere più interazioni con il ligando, aspetto che conferisce maggiore affinità di legame rispetto all'enzima in ALSV.

Se al posto di SAM dovesse esserci la sinefungina (SIN) come analogo di donatore di metile, questa potrebbe funzionare come inibitore della MTasi. Si tratta di una molecola che presenta un gruppo C-NH₂ in sostituzione al gruppo S-CH₂ di SAM e funziona avendo un'affinità di legame analoga a quella di SAM oltre che una struttura quasi identica. Anche SIN si lega alla tasca di legame del dominio centrale dell'enzima e lo fa adottando una conformazione estesa stabilizzata da

legami idrogeno instaurati con i residui della MTasi. Le modalità di legame sono quindi le stesse ma la funzione biologica è differente (10).

4. Epidemiologia ed ecologia

Gli ospiti che ALSV di solito preferisce sono alcune specie di zecche e zanzare. Il primo isolamento è stato fatto dalla specie *Ixodes persulcatus* proveniente dalle regioni della Mongolia interna e dell'Heilongjiang, mentre nelle zanzare è stato rilevato l'RNA del virus anche nella provincia di Jilin. Il ceppo che per primo è stato identificato (H3) è quello trasmesso all'uomo e si è potuto notare come le persone colpite fossero principalmente agricoltori o lavoratori forestali che vivevano in aree collinari o boschive. La maggior parte delle infezioni è stata rilevata da maggio a luglio, ossia nel periodo più prolifico per la riproduzione delle zecche (1).

Così anche nell'arcipelago di Kotka nella Finlandia sud-orientale e nella vicina isola di Kuutsalo sono state identificate zecche infette da ALSV, in particolare appartenenti alla specie *Ixodes ricinus*, una specie comune in tutto il continente europeo. Per *I. ricinus* si è potuto isolare e caratterizzare il virus solo in natura e non ci sono ancora stati ad oggi casi di infezione sull'uomo a differenza che per *I. persulcatus*, vettore virale ritrovato su pazienti umani (3).

Il ruolo che gli animali domestici e selvatici hanno nella trasmissione virale è molto importante da studiare per monitorare la circolazione e la trasmissione del virus e quindi poterne definire l'epidemiologia.

Nella regione di Hulunbuir nella Mongolia interna nordorientale sono stati rilevati RNA virale e anticorpi antivirali in pecore delle specie Genhe, Oroqen, E'erguna e Yakeshi e bovini delle specie Genhe, Moqi, Yakeshi, E'erguna e Oroqen, che nei mesi da maggio a luglio venivano pesantemente infestati da zecche e hanno dimostrato un'omologia >98% con il genoma di ALSV.

In riferimento all'andamento delle IgM, la sieropositività rilevata è superiore alla viremia nel caso di gruppi di pecore e bovini giovani. In combinazione con il periodo di raccolta tra maggio e luglio, in cui molti animali possono aver sperimentato le zecche per la prima volta, gli animali giovani mostrano un picco anticorpale di IgM superiore alla viremia rilevabile dal loro siero. Negli animali in cui invece c'è già stato contatto con l'agente infettivo è possibile rilevare la viremia anche se, in seguito ad una prima infezione, vengono sviluppate immunoglobuline della memoria (IgG) che permettono una risposta più solida in caso di re-infezione (11).

Oltre che in specie di zecche come *I. persulcatus*, zanzare *Culex tritaeniorhynchus* e *Anopheles yatsushiroensis* in Cina e in zecche *I. ricinus* in Finlandia e Francia, ALSV è stato rilevato anche in Russia. In particolare nella Repubblica della Carelia

e nella regione di Chelyabinsk sono state ritrovate specie di *I. persulcatus* dalla vegetazione e sono stati isolati i nuovi ceppi Miass501, Miass502, Miass506, Miass508, Miass510, Miass515, Miass519, Miass523, Miass527 e Galozero-14-T20426. Nella regione di Chelyabinsk è stato rilevato in più anche il ceppo Salma15-T22545 dalla specie *I. persulcatus* (7). ALSV è stato rilevato in *I. persulcatus* nelle Repubbliche di Tuva e Carelia e Regione di Chelyabinsk, in *I. ricinus* nelle regioni di Kaliningrad e Ulyanovsk e la Repubblica del Tatarstan, in *Dermacentor reticulatus* nella regione di Ulyanovsk, in *D. nuttalli* nella Repubblica dell'Altai e in *H. concinna* nel medesimo territorio (12).

In bassa Sassonia, Germania, invece ALSV è stato rilevato nelle specie *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ricinus* delle zecche e in *D. reticulatus*, nelle quali il virus riesce a replicarsi e ad essere trasmesso per mezzo della saliva durante l'alimentazione con il sangue. Sono stati raccolti campioni a partire da selvaggina cacciata come caprioli, cervi, daini o cinghiali. Da esperimenti di infezione su colture cellulari in vitro e su zecche in vivo è stato osservato che il virus si replica e viene trasmesso durante il pasto di sangue confermando così la presenza di ALSV nella saliva delle zecche anche grazie alle analisi condotte su quelle alimentate sulla selvaggina delle zone studiate (14).

In Svizzera invece ci sono stati rilevamenti di ALSV nella specie *I. ricinus* nella zona del Canton Grigioni grazie a tecniche di sequenziamento di prossima generazione tramite le quali è stato possibile ottenere la sequenza completa del genoma virale (15).

Da quanto descritto, si evince come ALSV sia ampiamente diffuso, essendo stato rilevato in diverse zone dell'Asia e dell'Europa. Di seguito (*figura 10*) è possibile visualizzare la distribuzione geografica di ALSV sulla base dei dati raccolti e riportati in *Tabella 1* relativamente ai luoghi in cui le varie specie vettore del virus sono state rilevate.

Tabella 1

Luogo di ritrovamento	Specie rilevata	Numero articoli
Russia	<i>I. persulcatus</i>	3
	<i>I. ricinus</i>	
	<i>D. reticulatus</i>	
	<i>D. nuttalli</i>	
	<i>H. concinna</i>	
Cina	<i>I. persulcatus</i>	2
	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	
	<i>Anopheles yatsushiroensis</i>	
Germania	<i>I. persulcatus</i>	1
	<i>I. ricinus</i>	
	<i>D. reticulatus</i>	
Svizzera	<i>I. ricinus</i>	1
Finlandia	<i>I. ricinus</i>	1
Francia	<i>I. ricinus</i>	1



Figura 10: distribuzione geografica di ALSV.

5. Diagnosi e sorveglianza

Un aspetto importante per monitorare la diffusione del virus e scongiurare eventuali epidemie o pandemie è la diagnosi rapida dell'agente infettivo grazie alla quale si può poi fare sorveglianza e diagnostica, aspetto necessario per acquisire maggiori conoscenze sulla trasmissione e la diffusione dell'infezione (11).

In *tabella 2* sono riportate le metodologie di laboratorio che sono state sviluppate per il rilevamento di ALSV.

Tabella 2

Tecnica e luogo di rilevamento	Principio	Vantaggi e svantaggi	Referenza
ELISA diretto (Cina)	Rilevamento di antigeni virali tramite anticorpi primari coniugati ad un tracciante per il rilevamento	Molto sensibile e può essere condotto in vitro ma si rileva solo la presenza o assenza dell'antigene e servono campioni purificati	(11) (16)
ELISA indiretto (Cina)	Rilevamento di antigeni virali tramite anticorpi primario e secondario coniugato ad un tracciante per il rilevamento		
VNT (Cina)	Analisi dell'espressione degli anticorpi neutralizzanti contro ALSV	Necessita dello studio in vivo	(14)

LIPS (Bassa Sassonia)	Rilevamento di anticorpi contro antigeni virali che vengono fusi in frame in dei vettori di espressione con il gene della luciferasi	Permette di utilizzare lisati grezzi di cellule trasfettate e di rilevare livelli anticorpali robusti contro più proteine	(17)
Real Time PCR (Cina, Russia)	Rilevamento in tempo reale di acidi nucleici del virus mediante amplificazione	Tecnica veloce e con elevata sensibilità (range di rilevazione dalle 10 ⁴ alle 10 ⁸ copie)	(11) (18) (20) (13)
Metagenomica (Svizzera, Cina e Corea)	Sequenziamento DNA di una comunità microbica nel contesto in cui vive	Permette la comprensione delle interazioni tra microrganismi per fare diagnosi rapide	(18) (19)

6. Discussione

Il genere dei *Flavivirus* è il più grande della famiglia *Flaviviridae* ed è costituito prevalentemente da agenti eziologici di malattie che hanno un forte impatto sull'uomo come i virus Zika, DENV, TBE, ecc, motivo per cui anche ALSV ha attirato l'attenzione per quanto riguarda l'impatto che potrebbe avere a livello di salute pubblica. I flavivirus si trasmettono tramite vettori artropodi e ad oggi le misure di prevenzione e trattamento delle infezioni sono limitate. ALSV in particolare viene monitorato per la sintomatologia che mostra nell'uomo e per la sua capacità di infettare diverse linee cellulari di derivazione umana come cellule di neuroblastoma, cellule amniotiche, di epatoma e monocitiche dimostrando un potenziale ampio tropismo.

In questo senso è quindi importante continuare a compiere sorveglianza utilizzando metodi di diagnostica rapidi come la metagenomica, che si è rivelata molto utile, per poter poi associare più facilmente l'infezione alla patologia che ne deriva. La sorveglianza ospedaliera degli eventi sentinella può dare un importante contributo per svolgere questo lavoro di prevenzione in quanto permette di segnalare tutti quegli eventi che possono essere principio di un'emergenza pubblica socio-sanitaria permettendo di attivare specifiche misure di controllo. La combinazione di metagenomica e sorveglianza ospedaliera potrebbe quindi permettere la possibilità di fare una valutazione del rischio di infezione prima che il virus possa portare ad una epidemia.

Rispetto a queste considerazioni una nuova frontiera della conoscenza del virus è quella di valutare la sua patogenicità e le modalità di trasmissione, per cui risulta necessario stabilire un modello di infezione animale che supporti i postulati di

Koch per permettere di determinare i vettori competenti della trasmissione virale e poter fare prevenzione (4).

Nello studio della competenza vettoriale delle specie ospiti si possono ad esempio notare i rapporti di cofeeding: si è visto che ALSV può infettare la specie *I. ricinus* e contemporaneamente anche *I. persulcatus* ad esempio durante la coalimentazione su un animale, per cui potrebbero non essere dei vettori specifici. Analogamente questo succede anche per la co-trasmissione di ALSV e TBEV che per il sottotipo europeo di TBEV è associata alle zecche *I. ricinus*, mentre per i sottotipi siberiano ed estremo-orientale a *I. persulcatus*. (12)

Grazie alle tecniche NGS molti agenti potenzialmente patogeni o patogeni come anche ALSV sono stati scoperti ma ad oggi sono conosciuti solo attraverso la loro sequenza e mancano dati sulla gamma degli ospiti, dei vettori e dei cicli di trasmissione che ne delineano il profilo epidemiologico e patogenetico. Per questo i nuovi studi devono incentrarsi sulla creazione e lo studio in un contesto sperimentale di modelli di infezione per chiarire come questi virus si diffondono e definire la competenza dei vettori, dato essenziale per capire l'epidemiologia.

Determinando la dose minima infettiva (MID) data dal rapporto di particelle virali infettive e non infettive, ad esempio è risultato che *I. ricinus* e *D. reticulatus* sono specie competenti e adatte a supportare un'elevata replicazione virale. Ad oggi non si è ancora riusciti a modellizzare delle colture cellulari di insetto o mammifero che supportassero la replicazione di ALSV, ma è stata invece comprovata la capacità replicativa in linee cellulari di zecca per cui sono richiesti ulteriori studi in merito (14).

Un approccio che ad oggi può essere rivoluzionario e che permette una diagnosi precisa è la medicina personalizzata attraverso tecniche immunologiche come la LIPS (vedasi *tabella 2*), in quanto permette di rilevare contemporaneamente una vasta gamma di anticorpi unici che vanno a delineare in modo specifico determinati virus. In questo senso è importante continuare ad insistere sulla generazione di profili anticorpali completi per comprendere più a fondo la salute umana. Permette inoltre di eseguire delle analisi sierologiche che ritornano utili per identificare le specie serbatoio e andare a monitorare la patogenesi del virus e consente di identificare i percorsi immunitari specifici di ciascuna malattia.

Investire in approcci come questo potrebbe essere dunque una strategia vincente in quanto permetterebbe di definire profili anticorpali che potrebbero essere utilizzati per condurre la diagnosi di molte malattie, non solo di origine infettiva ma anche di tipo autoimmune attraverso il rilevamento degli auto-anticorpi. Identificare i pazienti prima dell'esordio clinico consentirebbe di poter agire su più fronti come la prevenzione basata sullo stile di vita o il trattamento della patologia per ritardarne i sintomi ed evitarne la progressione o prevenirne l'insorgenza (20).

Bibliografia e sitografia

- (1) Wang ZD, et al. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China. *N Engl J Med.* 2019 May 30;380(22):2116-2125. doi: 10.1056/NEJMoa1805068.
- (2) Vandegrift KJ, et al. The Ecology of New Constituents of the Tick Virome and Their Relevance to Public Health. *Viruses.* 2019 Jun 7;11(6):529. doi: 10.3390/v11060529.
- (3) Kuivanen S, et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in *Ixodes ricinus* ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill.* 2019 Jul;24(27):1900394. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.27.1900394.
- (4) Zhang X, et al. The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence. *Curr Opin Virol.* 2020 Feb;40:11-18. doi: 10.1016/j.coviro.2020.02.001. Epub 2020 Mar 24.
- (5) Garry CE, et al. Proteomics Computational Analyses Suggest That the Envelope Glycoproteins of Segmented Jingmen Flavi-Like Viruses are Class II Viral Fusion Proteins (b-Penetrenes) with Mucin-Like Domains. *Viruses.* 2020 Feb 27;12(3):260. doi: 10.3390/v12030260.
- (6) Litov AG, et al. Conserved Sequences in the 5' and 3' Untranslated Regions of Jingmenvirus Group Representatives. *Viruses.* 2023 Apr 15;15(4):971. doi: 10.3390/v15040971.
- (7) Kholodilov IS, et al. Isolation and Characterisation of Alongshan Virus in Russia. *Viruses.* 2020 Mar 26;12(4):362. doi: 10.3390/v12040362.
- (8) Zhang X, et al. The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence. *Curr Opin Virol.* 2020 Feb;40:11-18. doi: 10.1016/j.coviro.2020.02.001. Epub 2020 Mar 24.
- (9) Gao X, et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ.* 2020 Apr 10;7(Pt 3):375-382. doi: 10.1107/S2052252520003632.
- (10) Chen H, et al. Structural and functional basis of low-affinity SAM/SAH-binding in the conserved MTase of the multi-segmented Alongshan virus distantly related to canonical unsegmented flaviviruses. *PLoS Pathog.* 2023 Oct 13;19(10):e1011694. doi: 10.1371/journal.ppat.1011694.
- (11) Wang ZD, et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit Vectors.* 2019 Sep 12;12(1):450. doi: 10.1186/s13071-019-3707-1.

(12) Kholodilov IS, et al. Geographical and Tick-Dependent Distribution of Flavi-Like Alongshan and Yanggou Tick Viruses in Russia. *Viruses*. 2021 Mar 11;13(3):458. doi: 10.3390/v13030458.

(13) Kholodilov IS, et al. Distribution and Characterisation of Tick-Borne Flavi-, Flavi-like, and Phenuiviruses in the Chelyabinsk Region of Russia. *Viruses*. 2022 Dec 1;14(12):2699. doi: 10.3390/v14122699.

(14) Ebert CL, et al. Detection and Characterization of Alongshan Virus in Ticks and Tick Saliva from Lower Saxony, Germany with Serological Evidence for Viral Transmission to Game and Domestic Animals. *Microorganisms*. 2023 Feb 21;11(3):543. doi: 10.3390/microorganisms11030543.

(15) Stegmüller S, et al. Genome Sequence of Alongshan Virus from *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Switzerland. *Microbiol Resour Announc*. 2023 Mar 16;12(3):e0128722. doi: 10.1128/mra.01287-22. Epub 2023 Feb 13.

(16) <https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/elisa-principi-delle-tecniche-immunochimiche-ed-esempi-di-saggi/>

(17) Burbelo PD, et al. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Transl Res*. 2015 Feb;165(2):325-35. doi: 10.1016/j.trsl.2014.08.006. Epub 2014 Sep 1.

(18) <https://www.biomoleculardiagnostic.com/metagenomica-cosa-e-applicazioni-importanza/>

(19) Wang R, et al. Metatranscriptomics Reveals the RNA Virome of *Ixodes persulcatus* in the China-North Korea Border, 2017. *Viruses*. 2023 Dec 29;16(1):62. doi: 10.3390/v16010062.

(20) Litov AG, et al. Quantitative Polymerase Chain Reaction System for Alongshan Virus Detection. *Methods Protoc*. 2023 Sep 4;6(5):79. doi: 10.3390/mps6050079.