

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/03/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Dayla Bott Geraldini

**Aplicação metagenômica para detecção de viromas em carrapatos
coletados de animais silvestres**

São José do Rio Preto/SP

2023

Dayla Bott Geraldini

Aplicação metagenômica para detecção de viromas em carrapatos coletados de animais silvestres

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

FAPESP – Proc. 2021/00603-3

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Coorientadora: Profa. Dra. Cintia Bittar Oliva

São José do Rio Preto/SP

2023

G354a

Geraldini, Dayla Bott

Aplicação metagenômica para detecção de viromas em carrapatos coletados de animais silvestres / Dayla Bott Geraldini. -- São José do Rio Preto, 2023
67 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Paula Rahal

Coorientadora: Cintia Bittar Oliva

1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Arbovírus. 4. Carrapatos. 5. Metagenômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dayla Bott Geraldini

Aplicação metagenômica para detecção de viromas em carrapatos coletados de animais silvestres

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

FAPESP – Proc. 2021/00603-3

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Paula Rahal
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Helena Lage Ferreira
Universidade de São Paulo - USP
Membro titular

Profa. Dra. Cecília Ártico Banho
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Membro titular

São José do Rio Preto/SP

03 de março de 2023

Dedico este trabalho à minha avó Valdenice Rosa Botti (in memorian), que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me encorajando a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por me proporcionar perseverança, e por estar sempre à frente, cuidando de tudo, me dando forças e iluminando meu caminho.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) pela estrutura, e o corpo docente, por todo conhecimento que me foi transmitido durante esses anos.

À minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal, pelo acolhimento no laboratório em 2016, pelas oportunidades e por todo crescimento que tive nesses anos sob sua orientação.

À minha coorientadora Profa. Dra. Cíntia Bittar Oliva, pelos ensinamentos e críticas construtivas, por sempre estar presente, me ensinando e tirando minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, pelos ensinamentos e discussões levantadas durante as reuniões científicas, que me permitiram crescer profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, por ter cedido o espaço no Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV) da FAMERP para a realização do sequenciamento de nova geração, e ao Prof. Dr. Guilherme Rodrigues Fernandes Campos por todo auxílio e ensinamentos durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. João Pessoa e ao Prof. Dr. Fábio Possebon, por toda ajuda prestada durante os dias que passei em Botucatu, por me receberem no Laboratório do Instituto de Biotecnologia (UNESP/IBTEC), por todos os ensinamentos e paciência durante aquele período.

Ao Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti, pela disponibilidade e colaboração nas análises das estruturas tridimensionais das proteínas.

Ao Zoológico Municipal de São José do Rio Preto, aos gestores Ciro, Samuel e Guilherme, aos médicos veterinários Bernhard, Eduardo, Cláudio, Richard, Natasha e Camila, que colaboraram e realizaram as coletas das amostras de carrapatos ao longo desses anos, em especial, ao Rafael Beltrão, que participou ativamente desde o início deste trabalho.

À banca examinadora, Profa. Dra. Helena Lage Ferreira e Profa. Dra. Cecília Ártico Banho, e aos suplentes, Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e Prof. Dr. Jansen de Araújo, por terem aceitado o convite e contribuírem com este trabalho.

Aos meus pais, Adriana e Clodoaldo, minha eterna gratidão, não só pela força nos momentos difíceis, mas por toda a ajuda na realização dos meus sonhos. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido completar essa jornada, sempre foram a minha força ao longo do caminho, e meu modelo a ser seguido.

Ao meu querido irmão Leonardo, e minha cunhada Débora, pela amizade e atenção dedicada sempre que precisei, e por me proporcionarem a imensa alegria em me tornar tia.

À minha avó materna, Valdenice (*in memorian*), e aos meus avós paternos, Luiz e Benedita, pelos conselhos, incentivo, apoio e estímulo para enfrentar as barreiras da vida.

À minha irmã de coração Adriele Freitas, pela amizade e todas as vezes que esteve presente com palavras de encorajamento e força.

Às minhas amigas Gabriela, Pâmela, Tamara e Maria Letícia, por toda amizade ao longo desses anos, e que passaram por todas as situações e momentos difíceis comigo, vocês tornaram tudo mais leve, pois eu sabia que poderia sempre contar com vocês.

Aos meus amigos de laboratório Vivaldo, Nikolas, Ana Júlia, Camila, Yasmin, Thalissa e Mariah, pelas trocas de conhecimentos e risadas nos momentos de descontração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Agradeço à FAPESP pela concessão da verba de Auxílio à Pesquisa, sob o processo nº 2021/00603-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**"No momento em que você duvida da sua habilidade de voar, você cessa para
sempre sua chance de poder fazer isso."
(J. M. BARRIE; PETER PAN, 1911)**

RESUMO

Arbovírus são vírus que utilizam vetores artrópodes hematófagos, como por exemplo, os mosquitos e carrapatos, para serem disseminados, circulando em ciclos urbanos e silvestres. Os carrapatos são artrópodes hematófagos, parasitas obrigatórios, que utilizam de uma ampla gama de hospedeiros. Como vetores, os carrapatos são capazes de transmitir uma grande variedade de patógenos, e estão entre os mais importantes vetores de doenças, afetando animais selvagens e domésticos e, os seres humanos, representando um sério risco para a saúde pública. O Brasil possui uma grande diversidade de artrópodes e de animais vertebrados, que juntamente com as condições climáticas, constituem características favoráveis à ocorrência dessas doenças. A maioria dos vírus transmitidos por carrapatos tem genomas de RNA que tendem a acumular mutações gerando grande variabilidade genética. Essas mudanças genômicas podem influenciar a disseminação de vírus para novos habitats e hospedeiros, levando a emergência de novos vírus que podem representar uma ameaça à saúde pública. Portanto, a investigação dos vírus que circulam nos carrapatos é importante para entender sua diversidade, variedade de hospedeiros e de vetores, prevendo novos patógenos emergentes. A metagenômica viral é uma ferramenta útil para identificar simultaneamente todos os vírus presentes em uma amostra, incluindo novas variantes de vírus já conhecidos ou vírus completamente novos. Assim, o objetivo deste projeto foi investigar o viroma de carrapatos provenientes de animais silvestres recebidos e atendidos no Zoológico Municipal de São José do Rio Preto – SP, através de uma abordagem metagenômica. Foram coletados 273 carrapatos, que inicialmente, foram identificados morfológicamente, e separados em 71 *pools*, o RNA foi extraído e a identificação das espécies foi confirmada, por análise molecular através do gene mitocondrial, mais especificamente, a subunidade I do citocromo c oxidase (COI). Em seguida, as bibliotecas genômicas foram preparadas para a realização do sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando a plataforma MiSeq (Illumina). As análises mostraram evidências moleculares importantes sobre um potencial novo vírus pertencente ao grupo dos *Jingmenvirus* em carrapatos coletados de animais silvestre. É importante ressaltar que não existem estudos sobre o viroma de carrapatos na região estudada, e o foco em animais silvestres é raro devido à dificuldade de manejo dos mesmos. Além disso, esse estudo revela a importância de caracterizar os vírus que circulam em carrapatos de animais silvestres para compreender potenciais riscos de emergência de zoonoses, que possam causar impactos na saúde humana, além dos potenciais impactos para a vida silvestre da

região, e com isso fornecer informações para contribuir com a vigilância epidemiológica na região. Em suma, as pesquisas sobre JMTV ainda estão em estágio inicial, sendo necessários mais estudos para elucidar a patogenicidade desse vírus aos animais e suas características epidemiológicas na natureza.

Palavras-chave: Animais silvestres. Vírus. Carrapatos. Metagenômica. *Jingmenvirus*.

ABSTRACT

Arboviruses are viruses that use hematophagous arthropod vectors, such as mosquitoes and ticks, to be disseminated, circulating in urban and wild cycles. Ticks are hematophagous arthropods, obligate parasites, which use a wide range of hosts. As vectors, ticks are capable of transmitting a wide variety of pathogens, and are among the most important disease vectors, affecting wild and domestic animals and humans, representing a serious risk to public health. Brazil has a great diversity of arthropods and vertebrate animals, which, together with climatic conditions, are favorable characteristics for the occurrence of these diseases. Most tick-borne viruses have RNA genomes that tend to accumulate mutations, generating great genetic variability. These genomic changes can influence the spread of viruses to new habitats and hosts, leading to the emergence of new viruses that may pose a threat to public health. Therefore, the investigation of the viruses that circulate in ticks is important to understand their diversity, variety of hosts and vectors, anticipating new emerging pathogens. Viral metagenomics is a useful tool to simultaneously identify all viruses present in a sample, including new variants of already known viruses or completely new viruses. Thus, the aim of this project was to investigate the virome of ticks from wild animals received and treated at the Municipal Zoo of São José do Rio Preto - SP, through a metagenomic approach. 273 ticks were collected, which were initially morphologically identified, and separated into 71 pools, the RNA was extracted and the species identification was confirmed, by molecular analysis through the mitochondrial gene, more specifically, the subunit I of cytochrome c oxidase (COI). Next, the genomic libraries were prepared for next-generation sequencing (NGS) using the MiSeq platform (Illumina). The analyzes showed important molecular evidence of a potential new virus belonging to the *Jingmenvirus* group in ticks collected from wild animals. It is important to emphasize that there are no studies on the virome of ticks in the region studied, and the focus on wild animals is rare due to the difficulty of handling them. In addition, this study reveals the importance of characterizing the viruses that circulate in wild animal ticks to understand potential risks of emergence of zoonoses, which may impact human health, in addition to potential impacts on wildlife in the region, providing information to contribute to epidemiological surveillance in the region. In short, research on JMTV is still at an early stage, and further studies are needed to elucidate the pathogenicity of this virus to animals and its epidemiological characteristics in nature.

Keywords: Wild animals. Virus. Ticks. Metagenomics. *Jingmenvirus*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – Considerações gerais

Figura 1: Regiões com maior incidência de arboviroses, e distribuição das principais doenças virais emergentes/ressurgentes transmitidas por vetores.....	20
Figura 2: Esquema de como o patógeno é adquirido durante a refeição sanguínea nos carrapatos.....	23

CAPÍTULO II – Artigo Científico

Figura 1: Gráfico Krona mostrando os genomas virais identificados na biblioteca 4, e suas respectivas porcentagens.....	43
Figura 2: Organização do genoma de JMTV_Like_Brazil identificado nesse estudo.....	44
Figura 3: Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base em sequências de nucleotídeos representando o segmento 1 de vírus relacionados ao grupo <i>Jingmenvírus</i>	45
Figura 4: Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base em sequências de nucleotídeos representando o segmento 2 de vírus relacionados ao grupo <i>Jingmenvírus</i>	46
Figura 5: Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base em sequências de nucleotídeos representando o segmento 3 de vírus relacionados ao grupo <i>Jingmenvírus</i>	47
Figura 6: Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base em sequências de nucleotídeos representando o segmento 4 de vírus relacionados ao grupo <i>Jingmenvírus</i>	48
Figura 7: Representação em fita da superposição da estrutura modelo do segmento 1 em com estruturas cristalinas tridimensionais de NS5 de flavivirus.....	50
Figura 8: Representação em fita da superposição da estrutura modelo do segmento 1 com estruturas cristalinas tridimensionais do NS5 do vírus da Dengue.....	51
Figura 9: Representação em fita da superposição da estrutura modelo do segmento 3 com estruturas cristalinas tridimensionais da sequência do NS3.....	52

Supplementary materials

Figure S1: Gráfico Krona mostrando os genomas virais identificados e suas respectivas porcentagens na biblioteca 1.....	62
--	----

Figure S2: Gráfico Krona mostrando os genomas virais identificados e suas respectivas porcentagens na biblioteca 2.....63

Figure S3: Gráfico Krona mostrando os genomas virais identificados e suas respectivas porcentagens na biblioteca 3.....64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Artigo Científico

Tabela 1: Descrição dos dados obtidos das quatro bibliotecas no sequenciamento de nova geração.....**41**

Tabela 2: Descrição das amostras que compuseram as quatro bibliotecas, hospedeiros e código dos respectivos *pools* de RNA, espécie de carrapato e número de carrapatos por *pool*.....**42**

Tabela 3: Descrição da distância entre o vírus mais próximo da JMTV_Like_Brazil, para cada segmento.....**49**

Supplementary materials

Tabela S1: A tabela apresenta as espécies de carrapatos identificadas, seus respectivos hospedeiros, número de carrapatos coletados e sua distribuição nos *pools*.....**59**

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BOLD: *Barcode of Life Data Systems*
bp: do inglês, *base pairs*
cDNA: DNA complementar
CHIKV: vírus Chikungunya
COI: subunidade I do citocromo c oxidase
CPCV: vírus Cacipacoré
DENV: vírus da Dengue
DTV: vírus do carrapato de veado
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
FHCC: febre hemorrágica da Crimeia e do Congo
GS: glândulas salivares
GTR: *general time-reversible*
HCl: ácido clorídrico
HE: hemolinfa
I: intestino
JMTV: Jingmen tick vírus
KFDV: vírus da floresta de Kyasanur
LIV: vírus Louping ill LIV
MGTV: vírus do carrapato Mogiana
mM: milimolar
MTase: metiltransferase
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NGS: sequenciamento de nova geração
NS: proteínas não estruturais
OVA: ovário
PBS: do inglês, *Phosphate-buffered saline*
PCR: reação em cadeia da polimerase
PDB: Protein Data Bank
POWV: vírus de Powassan
RdRp: RNA dependente RNA polimerase
S1: segmento 1

S2: segmento 2

S3: segmento 3

S4: segmento 4

TBEV: vírus da Encefalite transmitida por carrapatos

TBEV-Eu: vírus da Encefalite transmitida por carrapatos europeu

TBEV-FE: vírus da Encefalite transmitida por carrapatos Extremo Oriente

TBEV-Sib: vírus da Encefalite transmitida por carrapatos siberiano

TBVs: vírus transmitidos por carrapatos

TE: tampão de extração (Tris-HCl + EDTA)

YFV: vírus da Febre Amarela

ZIKV: vírus Zika

SUMÁRIO

Capítulo I.....	18
Considerações gerais.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Arbovírus.....	19
1.2 Carrapatos.....	21
1.3 Vírus transmitidos por carrapatos.....	24
1.4 Metagenômica	26
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
 Capítulo II.....	 34
Artigo Científico.....	34
1. Introduction	37
2. Materials and Methods	38
2.1 Place of Study.....	38
2.2 Sample Collection.....	38
2.3 Sample Preparation.....	38
2.4 Preparation of Genomic Libraries and Next Generation Sequencing (NGS)....	39
2.5 Data Analysis and Phylogeny.....	39
2.6 Prediction and analyzes of Three-dimensional (3D) protein structures	40
3. Results.....	40
3.1 Tick Collection and Identification.....	40
3.2 Analysis of Metagenomic Data	41
3.3 Genome Organization.....	43
3.4 Phylogenetic Analysis	44
3.5 Analysis of Three-dimensional Structures	49
4. Discussion	52
5. Conclusion	54
6. References.....	55
7. Supplementary materials.....	59
 Capítulo III	 64
Conclusão.....	64
1. CONCLUSÃO.....	66

Capítulo I
Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

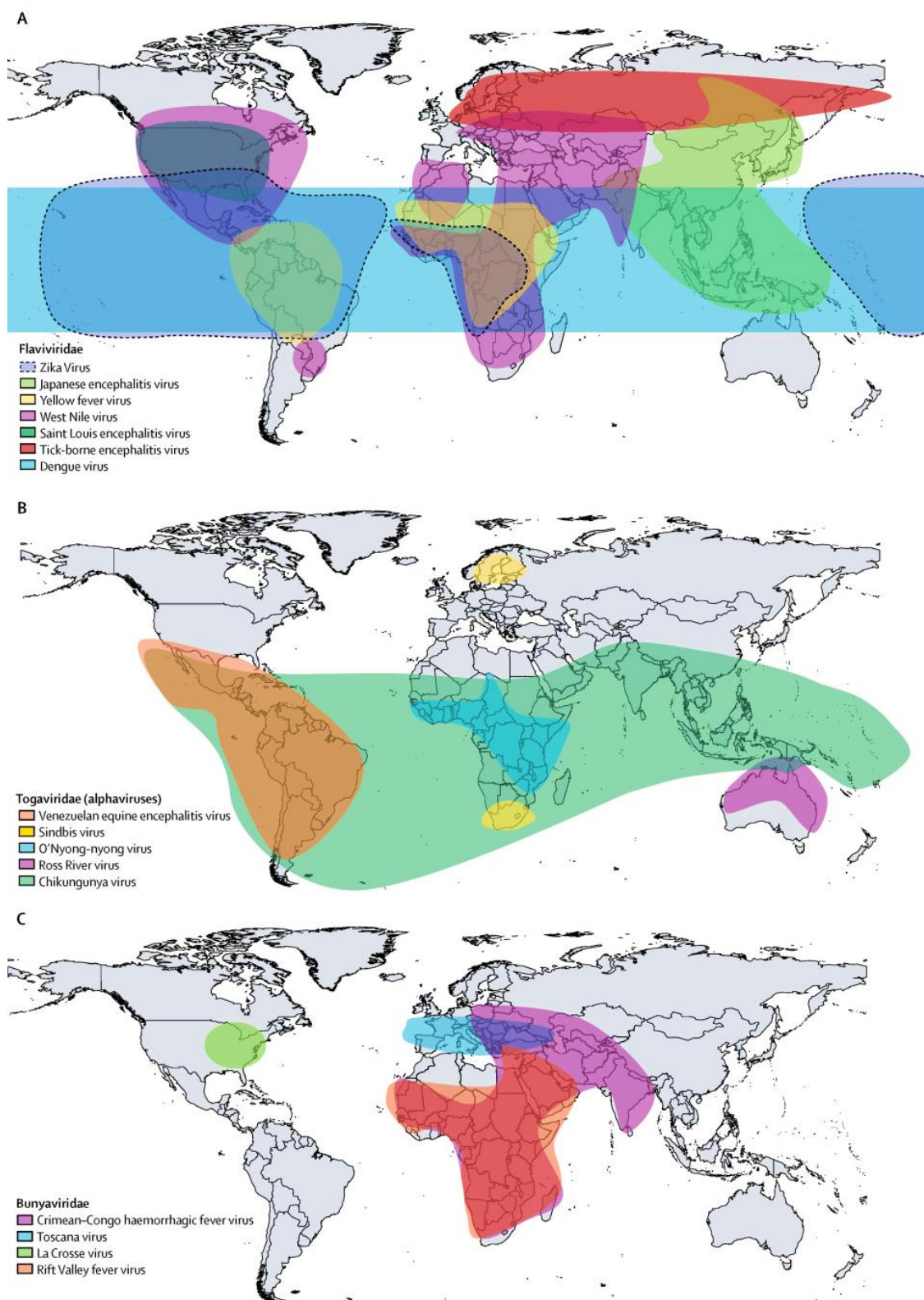
O termo arbovírus refere-se à expressão *Arthropod-borne virus*, que são vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, como por exemplo, os mosquitos e os carrapatos, estes vírus normalmente são transmitidos ao homem e aos outros animais durante o repasto sanguíneo (WEAVER; REISEN, 2010).

De acordo com a literatura, mais de 500 espécies de arbovírus foram reconhecidos mundialmente, sendo que 150 espécies foram documentadas causando doenças em humanos (YOUNG, 2018). A maioria das arboviroses que causam doenças em humanos estão distribuídas nas famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Reoviridae*, sendo as três primeiras de maior interesse e importância para a saúde pública (CLETON; KOOPMANS; REIMERINK; GODEKE *et al.*, 2012; WEAVER; REISEN, 2010).

Os arbovírus são mantidos na natureza em um ciclo de transmissão entre artrópodes hematófagos (vetores) e hospedeiros vertebrados, sendo estes essenciais para a manutenção dos vírus, e são chamados de hospedeiros amplificadores ou reservatórios (CLETON; KOOPMANS; REIMERINK; GODEKE *et al.*, 2012; GUBLER, 2001). Esses ciclos são geralmente silenciosos, e mantidos de forma estável entre artrópodes e animais em um ciclo silvestre, e não são detectados na natureza até que alguma mudança ambiental permita que o vírus escape do ciclo primário por meio de um vetor secundário ou hospedeiro vertebrado, ou quando os humanos invadem o nicho da infecção (GUBLER, 2001; YOUNG, 2018).

Os arbovírus apresentam uma distribuição geográfica bastante ampla, abrangendo praticamente todos os continentes, exceto o Antártico (Figura 1). A maior incidência de arboviroses ocorre nas regiões tropicais, por apresentarem condições ecológicas propícias para a reprodução e disseminação dos insetos vetores (BROOKS; CARROLL; BUTEL; MORSE *et al.*, 2014; DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A., 2017; WEAVER; CHARLIER; VASILAKIS; LECUIT, 2018; WEAVER; REISEN, 2010).

Figura 1: Regiões com maior incidência de arboviroses, e distribuição das principais doenças virais emergentes/ressurgentes transmitidas por vetores.



Fonte: (CHARLIER *et al.*, 2017).

No contexto epidemiológico brasileiro, as arboviroses de maior circulação são causadas pelos vírus da Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Chikungunya (CHIKV) e vírus Zika (ZIKV), embora existam outros com potencial de disseminação no país (DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A., 2017). O Brasil possui grande diversidade de artrópodes e de animais vertebrados, que juntamente com sua extensão territorial, presença de florestas tropicais, mudanças climáticas e desmatamentos, constituem características que favorecem à ocorrência desses vetores e consequentemente a circulação de arboviroses (FIGUEIREDO, 2007).

Apesar da crescente preocupação acerca dos impactos causados pelos arbovírus, aqueles transmitidos por carrapatos ainda são menos estudados quando comparados aos transmitidos por mosquitos, e nas últimas décadas um elevado número de enfermidades virais emergentes transmitidas por estes artrópodes foi relatado (ALMEIDA; MARKS; JÚNIOR; SANTOS *et al.*, 2010).

1.2 Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes de grande importância médica e veterinária, pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009). São ectoparasitas obrigatórios e de hábito hematofágico, o que os torna em vetores de vários agentes infecciosos para animais domésticos e de vida livre, e também para os humanos, que acabam sendo hospedeiros acidentais (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012). Segundo Martins *et al.* (2017), aproximadamente 80% das espécies encontradas no Brasil, são parasitas exclusivos de animais silvestres, já os outros 20%, parasitam animais domésticos e os seres humanos (MARTINS; IGAYARA-SOUZA; SANCHES; MELO *et al.*, 2017).

Existem aproximadamente 900 espécies de carrapatos, agrupados em três famílias, os Ixodidae (carrapatos de corpo duro), Argasidae (carrapatos de corpo mole), e Nuttalliellidae (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012).

A família Ixodidae compreende 702 espécies divididas em 14 gêneros, porém, os carrapatos dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis*, são responsáveis pela transmissão de patógenos de importância para a medicina humana e veterinária (GUGLIELMONE; ROBBINS; APANASKEVICH; PETNEY *et al.*, 2010). Os carrapatos desta família alimentam-se por períodos longos, e a fase parasitária é finalizada após o completo ingurgitamento (KLOMPEN; BLACK;

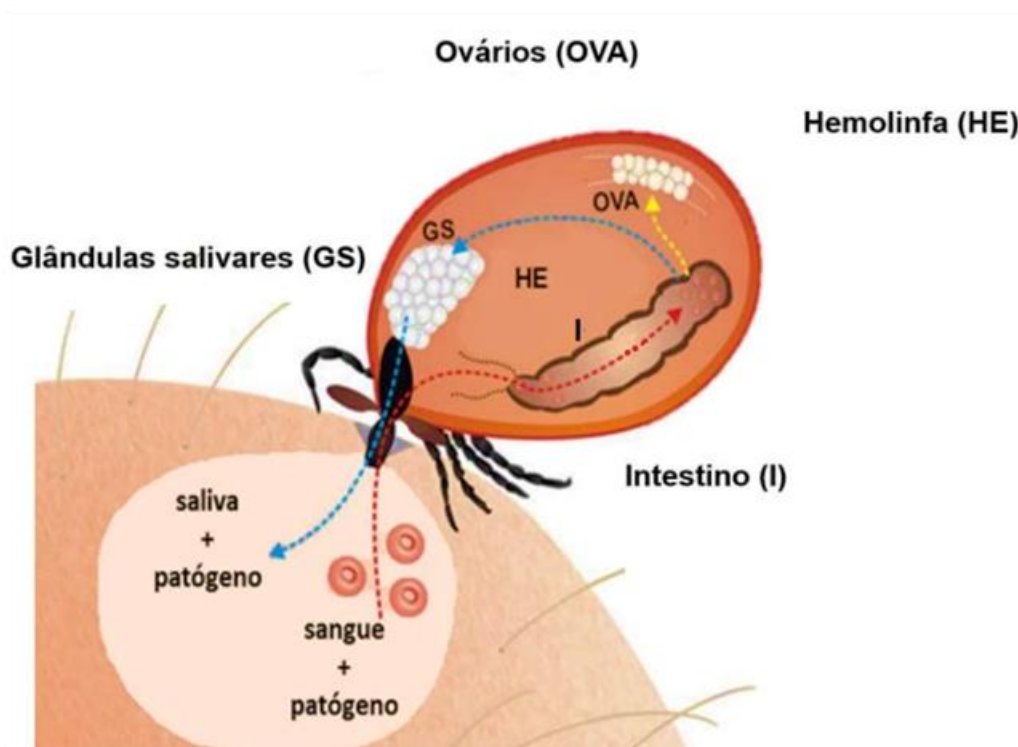
KEIRANS; J. H. OLIVER, 1996). Cada espécie de carrapato dentro destes gêneros é capaz de transmitir múltiplos patógenos, que podem infectar várias espécies de animais, incluindo o homem, e um único carrapato pode transmitir simultaneamente múltiplos patógenos a um hospedeiro durante uma alimentação (BRANDA; ROSENBERG, 2013; HEGARTY; MAGGI; KOSKINEN; BEALL *et al.*, 2012; NICHOLSON; ALLEN; MCQUISTON; BREITSCHWERDT *et al.*, 2010; REEVES; LOFTIS; NICHOLSON; CZARKOWSKI, 2008; SAVAGE; GODSEY; LAMBERT; PANELLA *et al.*, 2013).

A família Argasidae agrupa 193 espécies distribuídas em cinco gêneros, destes, os gêneros *Argas* e *Ornithodoros* são comumente associados a infestações em animais e humanos, sendo responsáveis pela disseminação de vírus e bactérias. Os argasídeos tem uma fase de vida parasitária muito curta e podem permanecer por longos períodos sem se alimentar (HEGARTY; MAGGI; KOSKINEN; BEALL *et al.*, 2012).

E por fim, a família Nuttalliellidae que é representada por uma única espécie africana, *Nuttalliella namaqua*, que reúne características comuns das outras duas famílias (BEATI; KLOMPEN, 2019).

Durante o repasto sanguíneo, o aparelho bucal do carrapato penetra profundamente na pele do hospedeiro, permanecendo fixado através do hipostômio, a saliva do carrapato contém uma grande variedade de moléculas anticoagulantes, imunomoduladoras e anti-inflamatórias que facilitam a aquisição e transmissão de patógenos. Ao provocar laceração dos tecidos e vasos sanguíneos, o carrapato ingere sangue e outros líquidos tissulares dos hospedeiros e regurgita grandes volumes de saliva, principal via de inoculação de patógenos (Figura 2) (RICHTER; MATUSCHKA; SPIELMAN; MAHADEVAN, 2013).

Figura 2: O patógeno é adquirido durante a refeição sanguínea e interage com fatores do intestino (I) e da hemolinfa (HE). Alguns patógenos podem invadir os ovários (OVA) e serem transmitidos transovarianamente. As glândulas salivares (GS) são colonizadas e o patógeno é inoculado no hospedeiro vertebrado através da saliva.



Fonte: Adaptado de (HAJDUSEK; SIMA; AYLLON; JALOVECKA *et al.*, 2013).

Dependendo do patógeno, é possível que ele persista por muito tempo nos carrapatos, podendo ser transmitido de estágio para estágio (transmissão transtadial), de fêmeas para ovos (transmissão vertical ou transovariana) e de carrapato para carrapato via hospedeiro (transmissão horizontal). O fenômeno da co-alimentação permite que alguns agentes infecciosos, por exemplo, o vírus da Encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), seja transmitido de um carrapato infectado para um carrapato saudável no local da picada de um animal, na ausência de viremia no hospedeiro (MASSARD; FONSECA, 2004; RANDOLPH; GERN; NUTTALL, 1996).

Diversas características biológicas tornam os carrapatos importantes vetores para a transmissão de doenças, sendo elas: hematofagismo em todas as fases de vida, o que aumenta a eficiência como vetor; fixação profunda nos hospedeiros através do hipostômio, propiciando dificuldade de remoção; lento período de alimentação e ingurgitamento, propiciando tempo para adquirir e inocular os patógenos; grande diversidade de hospedeiros, possibilitando a transmissão de patógenos entre diferentes

espécies; longevidade dos estágios no ambiente, propiciando tempo para multiplicação dos patógenos; transmissão transovariana, permitindo sucessivas gerações com potencial de transmitir e funcionarem como eficientes reservatórios; poucos inimigos naturais, o que propicia a manutenção de grande número de indivíduos no ambiente; exoesqueleto de quitina (esclerotização), propiciando resistência a adversidade climática; grande potencial reprodutivo, algumas espécies ovipositam até 18.000 ovos, possibilitando a perpetuação da espécie (BOULANGER; BOYER; TALAGRAND-REBOUL; HANSMANN, 2019; BRITO; DA SILVA NETO; OLIVEIRA; BARBIERI, 2006).

1.3 Vírus transmitidos por carrapatos

A literatura apresenta relatos de arbovírus transmitidos por carrapatos pertencentes às famílias *Bunyaviridae* (gêneros *Bunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*), *Flaviviridae*, *Asfarviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Reoviridae* (LABUDA; NUTTALL, 2004). Nas últimas duas décadas, vários vírus transmitidos por carrapatos (TBVs) foram descritos em todo o mundo, atraindo cada vez mais a atenção de organizações de saúde pública (ZHANG; LI; PANG; WU *et al.*, 2022). De maneira geral, as doenças transmitidas por carrapatos não apresentam medidas profiláticas específicas, como uso de vacinas, exceto para a Encefalite transmitida por carrapato (*Tick-borne encephalitis*).

O vírus da Encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), da família *Ixodidae*, é um dos principais patógenos virais transmitidos por carrapatos em humanos, e causa uma grave infecção no sistema nervoso central (DAI; SHANG; LU; YANG *et al.*, 2018). Os três subtipos de TBEV são membros do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. A morbidade e mortalidade de TBEV variam dependendo do subtipo viral, estes são o europeu, o siberiano e o extremo oriente (TBEV-Eu, TBEV-Sib e TBEV-FE, respectivamente), a infecção por qualquer subtipo é séria, mas a infecção por TBEV-FE é a mais grave. As espécies de carrapatos responsáveis pela transmissão também podem variar, sendo *Ixodes ricinus* o principal vetor do subtipo europeu, e *Ixodes persulcatus* para os subtipos siberiano e Extremo Oriente (GRITSUN; LASHKEVICH; GOULD, 2003). O TBEV é considerado o vírus transmitido por carrapatos de maior importância médica na Europa e na Ásia, estima-se que haja pelo menos 10.000 casos clínicos anualmente, com provável subnotificação (LIČKOVÁ; FUMAČOVÁ HAVLÍKOVÁ; SLÁVIKOVÁ; SLOVÁK *et al.*, 2020). Apesar da disponibilidade de vacinas eficazes para a prevenção de doenças, a incidência de TBEV está aumentando, pois, a cobertura

vacinal ainda é insuficiente (BOGOVIC; STRLE, 2015; TABA; SCHMUTZHARD; FORSBERG; LUTSAR *et al.*, 2017).

A febre hemorrágica da Crimeia e do Congo (FHCC), é causada por um *Nairovirus* da família *Bunyaviridae*, transmitido na natureza durante o repasto sanguíneo por carrapatos dos gêneros *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Boophilus* e *Amblyomma*. O vírus FHCC causa graves surtos de febre hemorrágica viral, com uma taxa de letalidade de 10 – 40%. Os focos principais estão localizados na região do Sudeste Asiático, Oriente Médio e na maioria dos países Africanos, na região subsaariana até a África do Sul (SHEPHERD; SWANEPOEL; SHEPHERD; LEMAN *et al.*, 1991).

Aparentemente limitada ao oeste dos Estados Unidos, com maior prevalência entre março e setembro, a febre do carrapato de Colorado é causada por um *Coltivirus*, pertencente à família *Reoviridae*. Caracteriza-se por uma severa infecção viral, similar à dengue, transmitida pela picada do carrapato *Dermacentor andersoni* (EMMONS, 1988).

O vírus Louping ill (LIV), foi reconhecido em 1931, sua detecção foi restrita quase exclusivamente às Ilhas Britânicas, particularmente na Escócia, Cúmbria, País de Gales, Devon e Irlanda, embora casos tenham sido relatados na Noruega e na Espanha. É um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, transmitido por carrapatos *Ixodes ricinus*. É detectado principalmente em ovinos e bovinos. O vírus ainda continua causando doenças e mortes em gado em áreas montanhosas da Grã-Bretanha e Irlanda e é conhecido por causar doenças em humanos (GREIG; BROWNLEE; WILSON; GORDON, 1931; JEFFRIES; MANSFIELD; PHIPPS; WAKELEY *et al.*, 2014).

O vírus da floresta de Kyasanur (KFDV), é uma febre hemorrágica viral causada por um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, transmitida por carrapatos da espécie *Hemaphysalis spinigerafoi*. Encontra-se limitada ao estado de Karnataka, na Índia, espalhada em três distritos florestais. Foi descrita em 1957 após um surto grave da doença que foi relatado em pessoas que viviam perto da floresta Kyasanur (HOLBROOK, 2012).

O vírus de Powassan (POWV) é um flavivírus transmitido por carrapatos, endêmico nos Estados Unidos, que causa encefalite grave. O POWV foi isolado pela primeira vez em 1958 do cérebro de um menino de cinco anos que morreu de encefalite em Ontário, Canadá (MCLEAN; DONOHUE, 1959). Duas linhagens genéticas distintas de POWV são agora reconhecidas: POWV (linhagem I) que é transmitida por espécies de carrapatos *Ixodes cookei* e *Ixodes marxi*, e a segunda linhagem denominada vírus do carrapato de veado (DTV) (linhagem II), que é transmitida por carrapatos da espécie *Ixodes scapularis*, as duas linhagens só podem ser distinguidas por testes moleculares,

como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento (PIANTADOSI; SOLOMON, 2022; RAVAL; SINGHAL; GUERRERO; ALONTO, 2012). Essa encefalite é particularmente grave por causar sérios danos neurológicos, e até o momento não existe vacina ou medicamento antiviral aprovado, e nos últimos anos foi possível notar um aumento significativo de casos de pessoas infectadas com o POWV (HASSETT; THANGAMANI, 2021; YANG; GAO; LIU, 2022).

No Brasil, recentemente, dois vírus isolados de carrapatos foram descritos. Figueiredo *et al.* (2017) isolaram o vírus Cacipacoré (CPCV), do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, de um carrapato do complexo *Amblyomma cajennense* retirado de uma capivara doente no interior do estado de São Paulo (DE FIGUEIREDO; AMARILLA; DE SOUZA; FUMAGALLI *et al.*, 2017). Maruyama *et al.* (2014) e Pascoal *et al.* (2019), isolaram outro vírus, denominado vírus do carrapato Mogiana (MGTV), inicialmente considerado um flavivírus altamente divergente, e detectado em carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* coletados em diferentes regiões do Brasil (MARUYAMA; CASTRO-JORGE; RIBEIRO; GARDINASSI *et al.*, 2014; PASCOAL; SIQUEIRA; MAIA; JUAN SZABÓ *et al.*, 2019). Um estudo mais detalhado revelou que o MGTV é membro de um grupo de vírus denominado *Jingmenvirus*, que foram descritos em 2014, e foram detectados em carrapatos da mesma espécie coletados em Jingmen, na China (QIN; SHI; TIAN; LIN *et al.*, 2014; VILLA ERIKA; MARUYAMA SANDRA; DE MIRANDA-SANTOS ISABEL; PALACIOS *et al.*, 2017).

Outro vírus que faz parte do grupo *Jingmenvirus*, é o vírus do carrapato de Jingmen (JMTV), é um patógeno humano emergente descrito pela primeira vez em carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* na cidade de Jingmen, na China em 2010.

1.4 Metagenômica

O desenvolvimento da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) permitiu a realização de sequenciamentos em larga escala com custo mais acessível e com maior rapidez (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). Também permitiu a realização de estudos metagenômicos, onde não há a necessidade de estabelecer um alvo específico, o que permite a identificação de microrganismos desconhecidos (QUINCE; WALKER; SIMPSON; LOMAN *et al.*, 2017). Esta estratégia é especialmente importante para a descrição de novos vírus, dado que estes apresentam enorme diversidade, sem um gene homólogo entre todas as espécies que possa ser usado como alvo (DELWART, 2007; EDWARDS; ROHWER, 2005). Assim, esta técnica permitiu um enorme avanço para a

descoberta de novas famílias e espécies de vírus (GELDENHUYS; MORTLOCK; WEYER; BEZUIDT *et al.*, 2018; KRISTENSEN; MUSHEGIAN; DOLJA; KOONIN, 2010; ROSARIO; BREITBART, 2011; SIMMONDS; ADAMS; BENKŐ; BREITBART *et al.*, 2017; WOLF; SILAS; WANG; WU *et al.*, 2020).

Estudos metagenômicos em carrapatos vêm trazendo grande compreensão sobre a diversidade viral nestes ectoparasitas. Estudos realizados na China, Moçambique, Estados Unidos, Palestina e Tailândia utilizando esta abordagem, descreveram desde novas variantes de vírus conhecidos até vírus nunca antes descritos (BOUQUET; MELGAR; SWEI; DELWART *et al.*, 2017; CHOLLETI; HAYER; MULANDANE; FALK *et al.*, 2018; DAMIAN; MAGHEMBE; DAMAS; WENSMAN *et al.*, 2020; RAVI; EREQAT; AL-JAWABREH; ABDEEN *et al.*, 2019; TEMMAM; CHRÉTIEN; BIGOT; DUFOUR *et al.*, 2019; ZHAO; GONG; SHEN; ZHANG *et al.*, 2020a).

No Brasil, dois estudos realizaram este tipo de análise. Um analisou carrapatos do gênero *Antricola* de morcegos na região Amazônica, no estado de Rondônia, e foi capaz de identificar vírus das famílias *Nairoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Iflaviridae*, *Dicistroviridae*, *Polycipiviridae* e *Reoviridae* (BLOMSTRÖM; LUZ; ÖHLUND; LUKENGE *et al.*, 2020). Os autores também identificaram sequências virais com pouca similaridade com vírus conhecidos indicando serem vírus ainda não classificados. O outro foi realizado em carrapatos *Rhipicephalus microplus* de gado na região Sul do país e revelou a circulação de vírus que não tinham sido descritos previamente na região, além disso, o estudo também descreveu três novos vírus da ordem Tymovirales. (SOUZA; FUMAGALLI; TORRES CARRASCO; ROMEIRO *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos por estes estudos demonstram a importância deste tipo de análise para compreender os vírus circulantes nos carrapatos, e desta forma, identificar potenciais vírus zoonóticos que possam causar impacto na saúde humana e animal. Ainda, para auxiliar na identificação de possíveis zoonoses emergentes, é importante também que sejam realizados estudos em diferentes espécies de carrapatos provenientes de hospedeiros silvestres variados

6. References

1. Ogden NH, Lindsay LRJTip: **Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: ticks are different.** 2016, **32**(8):646-656.
2. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D: **Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective.** *Trends in Parasitology* 2012, **28**(10):437-446.
3. Wikel SK: **Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions.** *Veterinary sciences* 2018, **5**(2).
4. Rochlin I, Toledo A: **Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review.** *Journal of medical microbiology* 2020, **69**(6):781-791.
5. Qin X-C, Shi M, Tian J-H, Lin X-D, Gao D-Y, He J-R, Wang J-B, Li C-X, Kang Y-J, Yu B *et al*: **A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors.** 2014, **111**(18):6744-6749.
6. Zhang X, Wang N, Wang Z, Liu Q: **The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence.** *Current Opinion in Virology* 2020, **40**:11-18.
7. Qin X-C, Shi M, Tian J-H, Lin X-D, Gao D-Y, He J-R, Wang J-B, Li C-X, Kang Y-J, Yu B *et al*: **A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, **111**(18):6744-6749.
8. Shi M, Lin X-D, Vasilakis N, Tian J-H, Li C-X, Chen L-J, Eastwood G, Diao X-N, Chen M-H, Chen XJJov: **Divergent viruses discovered in arthropods and vertebrates revise the evolutionary history of the Flaviviridae and related viruses.** 2016, **90**(2):659-669.
9. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, Qian Z, Dong J, Sun L, Zhu Y *et al*: **Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases.** *The ISME Journal* 2016, **10**(3):609-620.
10. Wu Z, Yu L, Lei X, Qin Y, Zhang X, Chen W, Qiao Y: **The association between human papillomavirus 16, 18 DNA load and E6 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia and cancer.** *Journal of Clinical Virology* 2018, **108**:6-11.
11. Meng F, Ding M, Tan Z, Zhao Z, Xu L, Wu J, He B, Tu CJT, diseases t-b: **Virome analysis of tick-borne viruses in Heilongjiang Province, China.** 2019, **10**(2):412-420.
12. Liu L, Shen Q, Li N, He Y, Han N, Wang X, Meng J, Peng Y, Pan M, Jin YJBiB: **Comparative viromes of Culicoides and mosquitoes reveal their consistency and diversity in viral profiles.** 2021, **22**(4):bbaa323.
13. Greay TL, Gofton AW, Paparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJJP, vectors: **Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing.** 2018, **11**(1):1-14.
14. Blomström A-L, Luz HR, Öhlund P, Lukenge M, Brandão PE, Labruna MB, Berg M: **Novel Viruses Found in Antricola Ticks Collected in Bat Caves in the Western Amazonia of Brazil.** *Viruses* 2020, **12**(1).
15. Souza WMd, Fumagalli MJ, Torres Carrasco AdO, Romeiro MF, Modha S, Seki MC, Gheller JM, Daffre S, Nunes MRT, Murcia PR *et al*: **Viral diversity of Rhipicephalus microplus parasitizing cattle in southern Brazil.** *Scientific Reports* 2018, **8**(1):16315.
16. Folmer O, Black M, Wr H, Lutz R, Vrijenhoek R: **DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse**

- metazoan invertebrates.** *Molecular marine biology and biotechnology* 1994, **3**:294-299.
17. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD *et al*: **SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.** *Journal of Computational Biology* 2012, **19**(5):455-477.
 18. Menzel P, Ng KL, Krogh A: **Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju.** *Nature communications* 2016, **7**:11257.
 19. Guindon S, Gascuel O: **A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.** *Systematic biology* 2003, **52**(5):696-704.
 20. Lefort V, Longueville JE, Gascuel O: **SMS: Smart Model Selection in PhyML.** *Molecular biology and evolution* 2017, **34**(9):2422-2424.
 21. Anisimova M, Gascuel O: **Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative.** *Systematic biology* 2006, **55**(4):539-552.
 22. Rambaut AJhtbeausf: **FigTree v1. 3.1.** 2009.
 23. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K: **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.** *Molecular biology and evolution* 2018, **35**(6):1547-1549.
 24. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A *et al*: **Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.** *Nature* 2021, **596**(7873):583-589.
 25. Rigsby RE, Parker AB: **Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure.** *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 2016, **44**(5):433-437.
 26. Zhao T, Gong H, Shen X, Zhang W, Shan T, Yu X, Wang SJ, Cui L: **Comparison of Viromes in Ticks from Different Domestic Animals in China.** *Virologica Sinica* 2020, **35**(4):398-406.
 27. Temmam S, Chrétien D, Bigot T, Dufour E, Petres S, Desquesnes M, Devillers E, Dumarest M, Yousfi L, Jittapalapong S *et al*: **Monitoring Silent Spillovers Before Emergence: A Pilot Study at the Tick/Human Interface in Thailand.** *Frontiers in microbiology* 2019, **10**.
 28. Ravi A, Ereqat S, Al-Jawabreh A, Abdeen Z, Abu Shamma O, Hall H, Pallen MJ, Nasereddin AJPntd: **Metagenomic profiling of ticks: Identification of novel rickettsial genomes and detection of tick-borne canine parvovirus.** *PLoS neglected tropical diseases* 2019, **13**(1):e0006805.
 29. Damian D, Maghembe R, Damas M, Wensman JJ, Berg M: **Application of Viral Metagenomics for Study of Emerging and Reemerging Tick-Borne Viruses.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2020, **20**(8):557-565.
 30. Cholleti H, Hayer J, Mulandane FC, Falk K, Fafetine J, Berg M, Blomström A-LJle, epidemiology: **Viral metagenomics reveals the presence of highly divergent quaranjavirus in Rhipicephalus ticks from Mozambique.** 2018, **8**(1):1478585.
 31. Bouquet J, Melgar M, Swei A, Delwart E, Lane RS, Chiu CY: **Metagenomic-based Surveillance of Pacific Coast tick Dermacentor occidentalis Identifies Two Novel Bunyaviruses and an Emerging Human Ricksettsial Pathogen.** *Scientific Reports* 2017, **7**(1):12234.

32. Ladner JT, Wiley MR, Beitzel B, Auguste AJ, Dupuis AP, Lindquist ME, Sibley SD, Kota KP, Fetterer D, Eastwood GJCh *et al*: **A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes**. 2016, **20**(3):357-367.
33. Villa Erika C, Maruyama Sandra R, de Miranda-Santos Isabel KF, Palacios G, Ladner Jason T: **Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil**. *Genome Announcements* 2017, **5**(18).
34. Emmerich P, Jakupi X, von Possel R, Berisha L, Halili B, Günther S, Cadar D, Ahmeti S, Schmidt-Chanasit JJI, Genetics, Evolution: **Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo**. 2018, **65**:6-11.
35. Sameroff S, Tokarz R, Charles RA, Jain K, Oleynik A, Che X, Georges K, Carrington CV, Lipkin WI, Oura CJSr: **Viral diversity of tick species parasitizing cattle and dogs in Trinidad and Tobago**. 2019, **9**(1):1-10.
36. Temmam S, Bigot T, Chrétien D, Gondard M, Pérot P, Pommelet V, Dufour E, Petres S, Devillers E, Hoem TJM: **Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of jingmenviruses**. 2019, **4**(6):e00645-00619.
37. Jia N, Liu H-B, Ni X-B, Bell-Sakyi L, Zheng Y-C, Song J-L, Li J, Jiang B-G, Wang Q, Sun YJE: **Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study**. 2019, **43**:317-324.
38. Wang Z-D, Wang B, Wei F, Han S-Z, Zhang L, Yang Z-T, Yan Y, Lv X-L, Li L, Wang S-CJNEJoM: **A new segmented virus associated with human febrile illness in China**. 2019, **380**(22):2116-2125.
39. de Figueiredo GG, Amarilla AA, de Souza WM, Fumagalli MJ, de Figueiredo MLG, Szabó MPJ, Badra SJ, Setoh YX, Khromykh AA, Aquino VH *et al*: **Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil**. *Archives of Virology* 2017, **162**(6):1783-1786.
40. Maruyama SR, Castro-Jorge LA, Ribeiro JMC, Gardinassi LG, Garcia GR, Brandão LG, Rodrigues AR, Okada MI, Abrão EP, Ferreira BRJMdIOC: **Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2014, **109**(1):38-50.
41. Pascoal JdO, Siqueira SMd, Maia RdC, Juan Szabó MP, Yokosawa J: **Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in Rhipicephalus microplus collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil**. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2019, **10**(1):162-165.
42. Zhang Y, Li Z, Pang Z, Wu Z, Lin Z, Niu G: **Identification of Jingmen tick virus (JMTV) in Amblyomma testudinarium from Fujian Province, southeastern China**. *Parasites & Vectors* 2022, **15**(1):339.
43. Lu G, Gong PJPP: **Crystal structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface**. 2013, **9**(8):e1003549.
44. Furlong J, Martins JdS, Prata MJJdFEGdL: **Carrapato: problemas e soluções**. 2005:65.
45. Temmam S, Chrétien D, Bigot T, Dufour E, Petres S, Desquesnes M, Devillers E, Dumarest M, Yousfi L, Jittapalapong SJFim: **Monitoring silent spillovers before emergence: A pilot study at the tick/human interface in Thailand**. 2019, **10**:2315.

46. Gondard M, Temmam S, Devillers E, Pinarello V, Bigot T, Chrétien D, Aprelon R, Vayssier-Taussat M, Albina E, Eloit M *et al*: **RNA Viruses of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus microplus* and Cattle Susceptibility in the French Antilles**. 2020, **12**(2):144.
47. Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Shimoda H, Fujita R, Faizah AN, Kai I, Matsumura R, Kuroda Y, Watanabe SJV: **Detection of Jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks**. 2021, **13**(12):2547.
48. Guo J-J, Lin X-D, Chen Y-M, Hao Z-Y, Wang Z-X, Yu Z-M, Lu M, Li K, Qin X-C, Wang WJVE: **Diversity and circulation of Jingmen tick virus in ticks and mammals**. 2020, **6**(2):veaa051.
49. Xu L, Guo M, Hu B, Zhou H, Yang W, Hui L, Huang R, Zhan J, Shi W, Wu YJVE: **Tick virome diversity in Hubei Province, China, and the influence of host ecology**. 2021, **7**(2):veab089.
50. Dinçer E, Hacıoğlu S, Kar S, Emanet N, Brinkmann A, Nitsche A, Özkul A, Linton Y-M, Ergünay KJV: **Survey and characterization of Jingmen tick virus variants**. 2019, **11**(11):1071.
51. Gómez GF, Isaza JP, Segura JA, Alzate JF, Gutiérrez LAJT, diseases t-b: **Metatranscriptomic virome assessment of *Rhipicephalus microplus* from Colombia**. 2020, **11**(5):101426.
52. Parry R, James ME, Asgari SJM: **Uncovering the Worldwide Diversity and Evolution of the Virome of the Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus***. 2021, **9**(8):1653.
53. Deng Z-L, Münch PC, Mreches R, McHardy AC: **Rapid and accurate identification of ribosomal RNA sequences via deep learning**. *Nucleic Acids Research* 2022, **50**(10):e60-e60.

Capítulo III

Conclusão

1. CONCLUSÃO

A realização do presente trabalho foi importante para investigar a circulação de vírus, com potenciais riscos de emergência, que estejam circulando em carrapatos que parasitam animais silvestres na região de São José do Rio Preto – SP, contribuindo com a vigilância epidemiológica na região.

A identificação correta dos espécimes de carrapatos por meio do gene mitocondrial, se mostrou mais confiável do que a identificação baseada apenas em caracteres morfológicos.

As análises moleculares e filogenéticas revelaram um potencial novo vírus pertencente ao grupo *Jingmenvirus*.

JMTV_Like_Brazil descrito neste trabalho apresentou um genoma composto por quatro segmentos, os quais codificam proteínas não estruturais nos segmentos 1 e 3 (NSP1 e NSP2) e proteínas estruturais nos segmentos 2 e 4 (VP1, VP2 e VP3).

As análises das proteínas virais revelaram um *loop* exclusivo no segmento 1, que difere da região conservada da NS5 dos flavivirus.

Até o momento não há relatos na literatura da ocorrência desse vírus em carrapatos na região estudada, principalmente com foco em animais de vida livre, portanto, é necessária uma vigilância em larga escala para entender completamente a circulação e transmissão de JMTV entre artrópodes e hospedeiros vertebrados.