



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

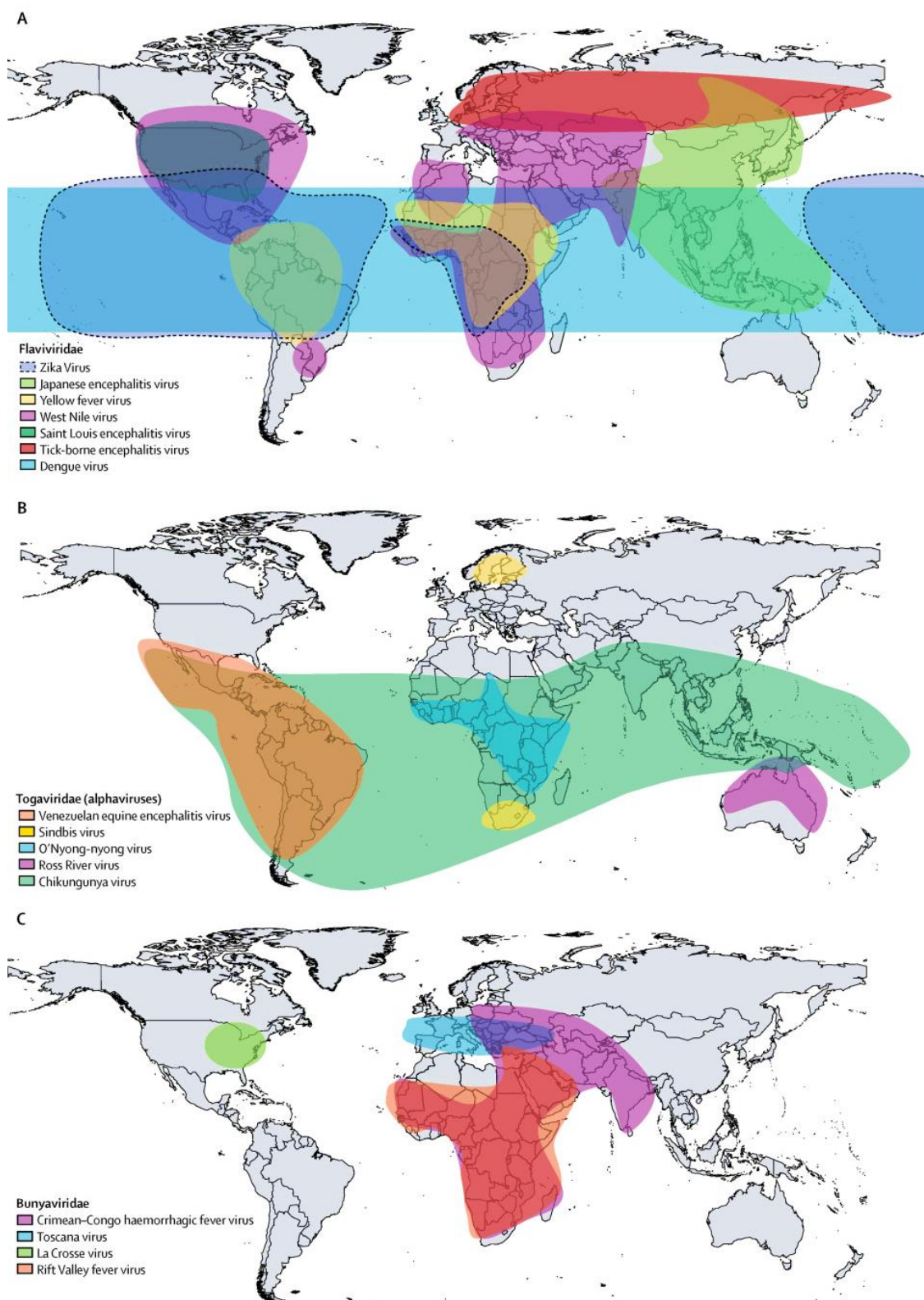
O termo arbovírus refere-se à expressão *Arthropod-borne virus*, que são vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, como por exemplo, os mosquitos e os carrapatos, estes vírus normalmente são transmitidos ao homem e aos outros animais durante o repasto sanguíneo (WEAVER; REISEN, 2010).

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;

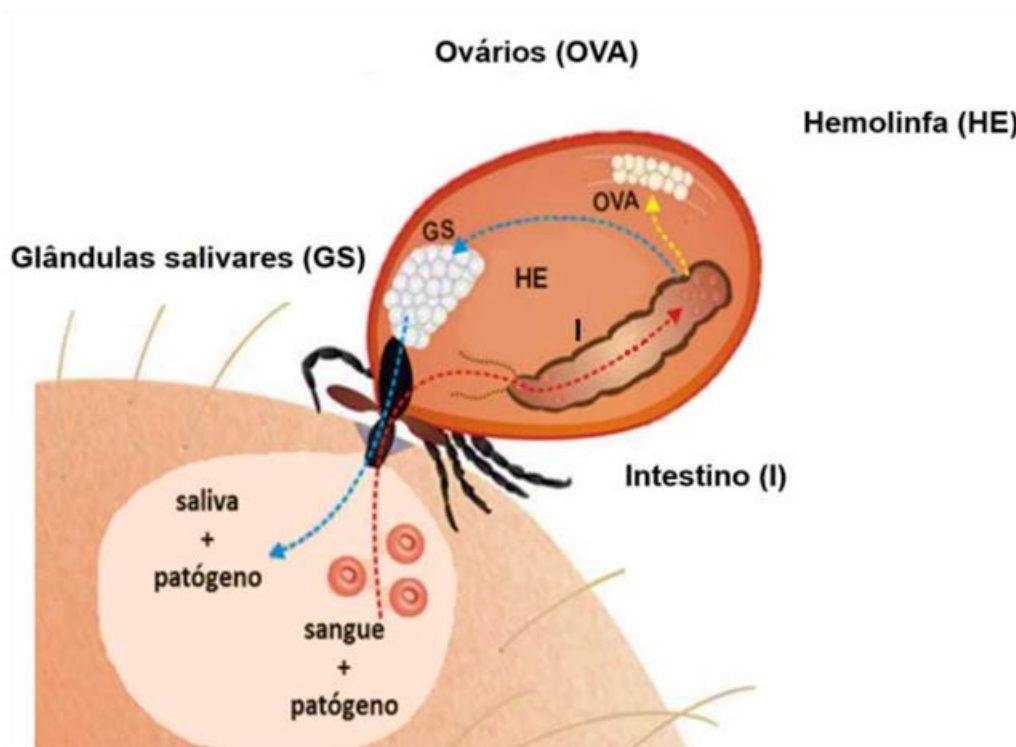
KEIRANS; J. H. OLIVER, 1996). Cada espécie de carrapato dentro destes gêneros é capaz de transmitir múltiplos patógenos, que podem infectar várias espécies de animais, incluindo o homem, e um único carrapato pode transmitir simultaneamente múltiplos patógenos a um hospedeiro durante uma alimentação (BRANDA; 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 transtádial), 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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo a investigação de ácidos nucleicos virais em amostras de carrapatos provenientes de animais silvestres por uma abordagem metagenômica.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar morfológicamente e molecularmente os carrapatos coletados;
- Identificar os vírus de RNA circulantes nos carrapatos coletados de animais silvestres;
- Caracterizar e descrever os genomas virais encontrados;
- Realizar análises filogenéticas dos genomas virais identificados;
- Análise das estruturas tridimensionais das proteínas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.; MARKS, F.; JÚNIOR, J.; SANTOS, A. *et al.* Detection of bovine viral diarrhea virus in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks fed on persistently infected cattle. **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE**, 38, p. 155-159, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/220033427_Detection_of_bovine_viral_diarrhea_virus_in_Rhipicephalus_Boophilus_microplus_ticks_fed_on_persistently_infected_cattle>.

BEATI, L.; KLOMPEN, H. Phylogeography of Ticks (Acari: Ixodida). 64, n. 1, p. 379-397, 2019.

BLOMSTRÖM, A.-L.; LUZ, H. R.; ÖHLUND, P.; LUKENGE, M. *et al.* Novel Viruses Found in Antricola Ticks Collected in Bat Caves in the Western Amazonia of Brazil. **Viruses**, 12, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v12010048>>.

BOGOVIC, P.; STRLE, F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. **World journal of clinical cases**, 3, n. 5, p. 430-441, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430>>.

BOULANGER, N.; BOYER, P.; TALAGRAND-REBOUL, E.; HANSMANN, Y. Ticks and tick-borne diseases. **Médecine et Maladies Infectieuses**, 49, n. 2, p. 87-97, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007>>.

BOUQUET, J.; MELGAR, M.; SWEI, A.; DELWART, E. *et al.* Metagenomic-based Surveillance of Pacific Coast tick *Dermacentor occidentalis* Identifies Two Novel Bunyaviruses and an Emerging Human Ricksettsial Pathogen. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 12234, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12047-6>>

BRANDA, J. A.; ROSENBERG, E. S. *Borrelia miyamotoi*: A Lesson in Disease Discovery. **Annals of Internal Medicine**, 159, n. 1, p. 61-62, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-1-201307020-00009>>

BRITO, L.; DA SILVA NETO, F.; OLIVEIRA, M. d. S.; BARBIERI, F. d. S. Bioecologia, importância medicoveterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Embrapa Rondônia-Documentos**, 2006.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**-26. 26 ed. AMGH Editora, 2014.

CHARLIER, C.; BEAUDOIN, M. C.; COUDERC, T.; LORTHOLARY, O.; LECUIT, M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. **The Lancet. Child & adolescent health**, 1(2), 134-146, 2017. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(17\)30021-4](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(17)30021-4)>.

CHOLLETI, H.; HAYER, J.; MULANDANE, F. C.; FALK, K. *et al.* Viral metagenomics reveals the presence of highly divergent quaranjavirus in Rhipicephalus ticks from Mozambique. **Infection Ecology & Epidemiology**, 8, n. 1, p. 1478585, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1478585>>.

CLETON, N.; KOOPMANS, M.; REIMERINK, J.; GODEKE, G. J. *et al.* Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**, 55, n. 3, p. 191-203, Nov 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.07.004>>

DAI, X.; SHANG, G.; LU, S.; YANG, J. *et al.* A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. **Emerg Microbes Infect**, 7, n. 1, p. 74, Apr 25 2018. Disponível em: <[10.1038/s41426-018-0081-6](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6)>.

DAMIAN, D.; MAGHEMBE, R.; DAMAS, M.; WENSMAN, J. J. *et al.* Application of Viral Metagenomics for Study of Emerging and Reemerging Tick-Borne Viruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 20, n. 8, p. 557-565, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2579>>.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, 28, n. 10, p. 437-446, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>>.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, n. 1, p. 30-46, 17, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.11158/saa.14.1.4>>.

DE FIGUEIREDO, G. G.; AMARILLA, A. A.; DE SOUZA, W. M.; FUMAGALLI, M. J. *et al.* Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil. **Archives of Virology**, 162, n. 6, p. 1783-1786, 2017.

DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, 17, n. 2, p. 115-131, 2007/03/01 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/rmv.532>>.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saude Publica**, 51, p. 30, Apr 10 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2017051006889>>.

EDWARDS, R. A.; ROHWER, F. Viral metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, 3, n. 6, p. 504-510, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro1163>>.

EMMONS, R. W. Ecology of Colorado Tick Fever. **Annual Review of Microbiology**, 42, n. 1, p. 49-64, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.000405>>.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40, p. 224-229, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000200016>>.

GELDENHUYS, M.; MORTLOCK, M.; WEYER, J.; BEZUIDT, O. *et al.* A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in Neoromicia bats within South Africa. **PloS One**, 13, n. 3, p. e0194527, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194527> >.

GREIG, J. R.; BROWNLEE, A.; WILSON, D.; GORDON, W. J. V. R. The nature of louping ill. **Vet Rec**, 11, p. 325-333, 1931.

GRITSUN, T. S.; LASHKEVICH, V. A.; GOULD, E. A. Tick-borne encephalitis. **Antiviral Research**, 57, n. 1, p. 129-146, 2003. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00206-1) >

GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. 951, n. 1, p. 13-24, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x> >.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N. *et al.* The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, 28, p. 27-54, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1> >.

HAJDUSEK, O.; SIMA, R.; AYLLON, N.; JALOVECKA, M. *et al.* Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, 3, 2013-July-16 2013. Review.

HASSETT, E. M.; THANGAMANI, S. Ecology of Powassan Virus in the United States. **Microorganisms**, 9, n. 11, p. 2317, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026> >.

HEGARTY, B. C.; MAGGI, R. G.; KOSKINEN, P.; BEALL, M. J. *et al.* Ehrlichia muris Infection in a Dog from Minnesota. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 26, n. 5, p. 1217-1220, 2012/09/01 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00968.x> >.

HOLBROOK, M. R. Kyasanur forest disease. **Antiviral Research**, 96, n. 3, p. 353-362, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.10.005> >.

JEFFRIES, C. L.; MANSFIELD, K. L.; PHIPPS, L. P.; WAKELEY, P. R. *et al.* Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. **The Journal of general virology**, 95, n. Pt 5, p. 1005-1014, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1099/vir.0.062356-0> >.

KLOMPEN, J. S. H.; BLACK, W. C.; KEIRANS, J. E.; J. H. OLIVER, J. Evolution of Ticks. **Annual Review of Entomology**, 41, n. 1, p. 141-161, 1996. Disponível em: < <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001041> >

KRISTENSEN, D. M.; MUSHEGIAN, A. R.; DOLJA, V. V.; KOONIN, E. V. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. **Trends in Microbiology**, 18, n. 1, p. 11-19, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.11.003> >.

LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, 129, n. S1, p. S221-S245, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/s0031182004005220>>.

LIČKOVÁ, M.; FUMAČOVÁ HAVLÍKOVÁ, S.; SLÁVIKOVÁ, M.; SLOVÁK, M. *et al.* Dermacentor reticulatus is a vector of tick-borne encephalitis virus. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 11, n. 4, p. 101414, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101414>>.

MARTINS, T.; IGAYARA-SOUZA, C.; SANCHES, T.; MELO, M. *et al.* Diversidade de carrapatos (Acari: Ixodidae) em animais silvestres recebidos pelo Zoológico Municipal de Guarulhos. 33, n. 1, p. 20-25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2017v33n1p20-25>>.

MARUYAMA, S. R.; CASTRO-JORGE, L. A.; RIBEIRO, J. M. C.; GARDINASSI, L. G. *et al.* Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 109, n. 1, p. 38-50, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>>.

MASSARD, C.; FONSECA, A. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MCLEAN, D. M.; DONOHUE, W. L. Powassan virus: isolation of virus from a fatal case of encephalitis. **Canadian Medical Association journal**, 80, n. 9, p. 708-711, 1959. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1830849/>>.

NICHOLSON, W. L.; ALLEN, K. E.; MCQUISTON, J. H.; BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, 26, n. 4, p. 205-212, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007>>.

PASCOAL, J. d. O.; SIQUEIRA, S. M. d.; MAIA, R. d. C.; JUAN SZABÓ, M. P. *et al.* 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**, 10, n. 1, p. 162-165, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.00>>

PIANTADOSI, A.; SOLOMON, I. H. Powassan Virus Encephalitis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 36, n. 3, p. 671-688, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.03.003>>

QIN, X.-C.; SHI, M.; TIAN, J.-H.; LIN, X.-D. *et al.* A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111, n. 18, p. 6744-6749, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>>.

QUINCE, C.; WALKER, A. W.; SIMPSON, J. T.; LOMAN, N. J. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, 35, n. 9, p. 833-844, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nbt.3935>>.

RANDOLPH, S. E.; GERN, L.; NUTTALL, P. A. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitology Today**, 12, n. 12, p. 472-479, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(96\)10072-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(96)10072-7)>.

RAVAL, M.; SINGHAL, M.; GUERRERO, D.; ALONTO, A. Powassan virus infection: case series and literature review from a single institution. **BMC Research Notes**, 5, n. 1, p. 594, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-594>>.

RAVI, A.; EREQAT, S.; AL-JAWABREH, A.; ABDEEN, Z. *et al.* Metagenomic profiling of ticks: Identification of novel rickettsial genomes and detection of tick-borne canine parvovirus. **PLoS neglected tropical diseases**, 13, n. 1, p. e0006805, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006805>>.

REEVES, W. K.; LOFTIS, A. D.; NICHOLSON, W. L.; CZARKOWSKI, A. G. The first report of human illness associated with the Panola Mountain Ehrlichia species: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, 2, n. 1, p. 139, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1752-1947-2-139>>.

REUTER, Jason A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, Michael P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, 58, n. 4, p. 586-597, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>>.

RICHTER, D.; MATUSCHKA, F. R.; SPIELMAN, A.; MAHADEVAN, L. How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of Ixodes ricinus ticks. **Proc Biol Sci**, 280, n. 1773, p. 20131758, Dec 22 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1758>>.

ROSARIO, K.; BREITBART, M. Exploring the viral world through metagenomics. **Current Opinion in Virology**, 1, n. 4, p. 289-297, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.004>>.

SAVAGE, H. M.; GODSEY, M. S.; LAMBERT, A.; PANELLA, N. A. *et al.* First detection of heartland virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) from field collected arthropods. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 89, n. 3, p. 445-452, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0209>>.

SHEPHERD, A. J.; SWANEPOEL, R.; SHEPHERD, S. P.; LEMAN, P. A. *et al.* Viraemic transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus to ticks. **Epidemiology and Infection**, 106, n. 2, p. 373-382, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/s0950268800048524>>.

SIMMONDS, P.; ADAMS, M. J.; BENKŐ, M.; BREITBART, M. *et al.* Virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, 15, n. 3, p. 161-168, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>>.

SOUZA, W. M. ; FUMAGALLI, M. J.; TORRES CARRASCO, A. d. O.; ROMEIRO, M. F. *et al.* Viral diversity of Rhipicephalus microplus parasitizing cattle in southern Brazil. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 16315, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34630-1>>.

TABA, P.; SCHMUTZHARD, E.; FORSBERG, P.; LUTSAR, I. *et al.* EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. **European Journal of Neurology**, 24, n. 10, p. 1214-e1261, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ene.13356>>.

TEMMAM, S.; CHRÉTIEN, D.; BIGOT, T.; DUFOUR, E. *et al.* Monitoring Silent Spillovers Before Emergence: A Pilot Study at the Tick/Human Interface in Thailand. **Frontiers in microbiology**, 10, 2019-October-17 2019. Original Research. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02315>>.

VILLA ERIKA, C.; MARUYAMA SANDRA, R.; DE MIRANDA-SANTOS ISABEL, K. F.; PALACIOS, G. *et al.* Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil. **Genome Announcements**, 5, n. 18, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/genomeA.00232-17>>.

WEAVER, S. C.; CHARLIER, C.; VASILAKIS, N.; LECUIT, M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**, 69, p. 395-408, Jan 29 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>>.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, 85, n. 2, p. 328-345, Feb 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>>.

WOLF, Y. I.; SILAS, S.; WANG, Y.; WU, S. *et al.* Doubling of the known set of RNA viruses by metagenomic analysis of an aquatic virome. **Nature Microbiology**, 5, n. 10, p. 1262-1270, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0755-4>>.

YANG, X.; GAO, G. F.; LIU, W. J. Powassan virus: A tick borne flavivirus infecting humans. **Biosafety and Health**, 4, n. 1, p. 30-37, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.12.007>>.

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. **Adv Exp Med Biol**, 1062, p. 1-10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1>.

ZHANG, Y.; LI, Z.; PANG, Z.; WU, Z. *et al.* Identification of Jingmen tick virus (JMTV) in Amblyomma testudinarium from Fujian Province, southeastern China. **Parasites & Vectors**, 15, n. 1, p. 339, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-022-05478-2>>.

ZHAO, T.; GONG, H.; SHEN, X.; ZHANG, W. *et al.* Comparison of Viromes in Ticks from Different Domestic Animals in China. **Virologica Sinica**, 35, n. 4, p. 398-406, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12250-020-00197-3>>.

Capítulo II
Artigo Científico

Title: Identification of a new virus from the Jingmenvirus group in ticks from wild animals

Dayla Bott Geraldini^a

Cintia Bittar^{a,d}

Fabio Sossai Possebon^b

Ricardo Barros Mariutti^a

Rafael Cesário Beltrão^e

Guilherme Guerra Neto^e

Vivaldo Gomes da Costa^a

Guilherme Rodrigues Fernandes Campos^c

Raghuvir Krishnaswamy Arni^a

Antônio Carlos Lofego^a

Mauricio Lacerda Nogueira^c

João Pessoa Araújo Junior^b

Paula Rahal^a

Author information:

- a. Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
- b. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil
- c. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil
- d. The Rockefeller University, New York, United States
- e. Zoológico Municipal de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil

Correspondent Author Information:

Cintia Bittar

The Rockefeller University

1230 York Ave, New York, NY 10065, United States

e-mail: cibittar@gmail.com

Abstract

Ticks are obligate blood-sucking arthropods, capable of transmitting a wide variety of pathogens, and are among the most important disease vectors, affecting wild and domestic animals as well as humans, representing a serious risk to public health. Despite the growing concern about arboviruses, those transmitted by ticks are still the least studied. Most tick-borne viruses have RNA genomes that are prone to accumulating mutations, resulting in high variability. These genomic alterations can influence the spread of viruses to new habitats and hosts and lead to the emergence of new viruses that may pose a threat to public health. In this work, we seek to investigate the diversity of viruses that are circulating in ticks collected from free-living animals in the countryside of the state of São Paulo, Brazil, using a metagenomic approach. Two hundred and seventy-three ticks were collected, morphologically identified, and separated into 71 pools. The RNA was extracted, and the identification of the species confirmed, by molecular analysis through the mitochondrial gene, more specifically, subunit I of cytochrome c oxidase (COI). Then, 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. Here we report the identification of a potentially novel Jinmenvirus (JMTV) virus in ticks from wild animal in southeastern Brazil. This study contributes to the epidemiological surveillance of the region and helps to understand the potential risks of the emergence of zoonoses, which can impact human health, in addition to the potential impacts on the region's fauna. In summary, further analyzes are needed to better characterize the genomic structure, phylogenetic relationships, a potential vertebrate host, and the epidemiological characteristics of this potentially new JMTV in the wild.

Keywords: Wild animals, virus, ticks, metagenomics, *Jingmenvirus*.

1. Introduction

Ticks are obligate ectoparasites with a hematophagous habit, which makes them vectors of various infectious agents for domestic and wild animals, and also for humans, who end up being accidental hosts [1, 2]. Tick-transmitted pathogens to humans are of zoonotic origin, with pathogens maintained in natural cycles involving both domestic and free-living animal hosts [3]. Tick-borne infections account for a large proportion of vector-borne diseases in many developed and underdeveloped countries and have significant health consequences [4].

The *Jingmenvirus* group comprises positive-sense single-stranded RNA viruses with segmented genomes, currently comprising Jingmen tick virus, Mogiana tick virus, Alongshan virus and Guaico culex virus [5, 6]. Jingmen tick virus was first identified in *Rhipicephalus microplus* ticks collected in Jingmen City, China, in 2010 [7]. The viral genome comprises four separate segments, named S1, S2, S3 and S4. The S1 and S3 segments of the genome encode the non-structural proteins, NSP1 and NSP2, respectively, which are genetically and functionally related to the flavivirus NS3 and NS5 proteins. Although segments S1 and S3 are closely related to flaviviruses non-structural protein genes, the remaining two segments (S2 and S4) are unique to this virus and have no known homologs, and likely originated from uncharacterized ancestral viruses [7, 8].

Next-generation sequencing (NGS) allows rapid, high-throughput identification of DNA or RNA libraries from different sources. This technology has been widely used in studies aimed at tracking new viromas. Recently, many works have identified new viral pathogens or potential emerging viruses in several important vectors, such as rodents, bats, mosquitoes, and ticks through NGS [9-12]. In recent years, metagenomic studies in ticks have brought great understanding about viral diversity in these ectoparasites, and NGS represents a powerful technique to better understand tick-borne diseases [13].

In Brazil, a metagenomic approach to investigate viruses in ticks was used in only two recent studies, focusing on bats and cattle [14, 15]. With this, this study sought to investigate the virome of ticks collected from wild animals using a metagenomic approach, in order to understand the viral diversity present in ticks that parasitize these animals and help in the control of viruses with potential risk of emergence, thus contributing to the epidemiological surveillance in the region.

2. Materials and Methods

2.1 Place of Study

The Municipal Zoo of the city of São José do Rio Preto - SP has about 300 animals residing on site. The site is a reference in emergency care and treatment of wild animals in the region of São José do Rio Preto, and neighboring municipalities in the Northwest Region of the State of São Paulo. The animals are sent to the zoo through the Environmental Police, and notifications to this body are made by civilians who saw these animals injured, run over, victims of fires, orphaned puppies, and were rescued and sent to the zoo to be treated. In addition to caring for the health and well-being of the animals residing at the Municipal Zoo, employees receive and care for numerous species of fauna in the state of São Paulo, including endangered species, thus contributing to the conservation of the region's faunal biodiversity.

2.2 Sample Collection

Tick samples were collected between August 2018 and December 2021 from wild animals sent to the Municipal Zoo of São José do Rio Preto - SP and were collected by the veterinarians who cared for those animals. The collected ticks were preliminarily identified through morphological characters. The identified ticks were stored in pools, according to the animal from which they were collected and, according to the identified tick species, in cryogenic tubes and stored at -150°C for further processing.

2.3 Sample Preparation

Before being macerated, the ticks were washed three times with PBS (Phosphate-buffered saline) to remove surface dirt. Then, they were macerated with the aid of a pestle, inside a 1500 µL microtube, partially on ice, containing TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4) and Proteinase K (20 units/mg) and centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C, the supernatant was collected for further RNA extraction. RNA extraction from the samples was performed using the Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research, USA) according to the manufacturer's instructions.

Next, ticks were molecularly identified through PCR, and Sanger sequencing, based on a 710pb fragment of a region of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) [16]. Initially, the extracted RNA was converted into cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's instructions. The PCR reaction was performed with the Taq DNA

Polymerase Recombinant PCR kit (Invitrogen, USA) with a final volume of 25µl, and the primers used in the reaction were LCO1490 "GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG" and HCO2198 "TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA" [16]. Amplification was performed at 94°C for 3 minutes for initial denaturation to occur, then for 40 cycles at 94°C for 45 seconds (denaturation), 46°C for 30 seconds (annealing), and 72°C for 1 minute and 10 seconds (extension), followed by the final extension step at 72°C for 10 minutes. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Sequencing for specimen identification was performed using the Sanger technique, with the same primers used for the PCR reaction. Readings were performed in an ABI 3130 XL genetic analyzer. (Applied Biosystems, USA). The sequences were submitted to the Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems) (www.boldsystems.org) online platform, which allows species identification based on the genomic region of interest.

2.4 Preparation of Genomic Libraries and Next Generation Sequencing (NGS)

Preparation of genomic RNA sequencing libraries and ribosomal RNA depletion were performed using the Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit (Zymo Research, USA). For next-generation sequencing, four RNA libraries were constructed and sequenced. Libraries were prepared using 35 samples from previously extracted RNA pools. From the 71 pools (Table S1), at least one pool of each tick species per host was selected.

Validation of libraries was performed by quantification with Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, USA), and library size was evaluated using High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent Technologies Inc, USA). Sequencing was performed using the MiSeq platform (Illumina Inc, USA) with 600-cycle V3 cartridges (2x300 cycles).

2.5 Data Analysis and Phylogeny

Raw data were demultiplexed and extracted in fastq format. The reads were treated to remove adapters and library indexes, trimming and filtering were performed using the Genious Prime 2023.0.2 software (<https://www.geneious.com>). The reads were analyzed in RiboDetector software to detect and remove ribosomal RNA sequences [53]. The treated reads were aligned and the contigs were de novo assembled in the SPAdes 3.15.4 software [17]. The taxonomic classification of the generated contigs was acquired by

Kaiju 1.9.0 [18] (<https://kaiju.binf.ku.dk/>) using complete genome sets available at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The datasets for the phylogenetic and distance analysis were assembled using sequences deposited in GenBank from viral species that display higher similarity based on a BlastX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) search for all four segments JMTV_Like_Brazil. Sequences were aligned using MAFFT 7 available at <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> and the Maximum likelihood phylogenetic trees were built using PhyML 3 [19] available at the ATGC Montpellier bioinformatics platform (<http://www.atgc-montpellier.fr>). The substitution model was selected by SMS [20] and branch support by aLRT [21]. The phylogenetic trees were edited using the software FigTree v.1.4.4 [22].

The genetic distance was calculated by p-distance using MegaX [23]. The analysis was based only on the coding region from each fragment.

2.6 Prediction and analyzes of Three-dimensional (3D) protein structures

Nucleotide sequences that were similar to flavivirus sequences were translated into amino acids, and AlphaFold [24] was used to predict the three-dimensional structures of four segments. A BLAST search against the PDB (<https://www.rcsb.org/>) was carried out for comparative analysis between structures with a higher degree of identity. The visualization of the superimposition of protein structures and the generation of figures was done using Pymol [25].

3. Results

3.1 Tick Collection and Identification

In total, 273 ticks were collected from 27 host, which were initially morphologically identified and separated into 71 pools according to the tick species and according to their respective host. With the aid of an identification key and based on morphological characters, the following tick species were identified: *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma nodosum* and *Amblyomma sculptum*. However, after more precise molecular identification the tick species identified in this study were *Amblyomma sculptum*, being the most prevalent species (68.13%, 186/273), *Amblyomma nodosum* (27.47%, 75/273) and *Rhipicephalus microplus* (4.40%, 12/ 273). Information on rescue location, host species, number of pools, number of ticks per pool and tick species are described in Table S1 of the supplementary material.

3.2 Analysis of Metagenomic Data

Illumina sequencing generated a total of 56177760 reads (Table 1). The 35 RNA samples were divided into four libraries (Table 2). Genomic sequences from ticks were removed and, after de novo assembly, a total of 7909059 contigs were classified using the complete genome database by Kaiju, which generated the Krona plots.

Table 1: Description of data obtained from each library in next-generation sequencing.

Id Library	Total Reads	Total Contigs	Classified Contigs	Number of Identified Taxons	Contigs Cell Organisms	Contigs Virais
1	18166440	2474903	1287425 (52,02%)	2484	1286688 (99,95%)	650 (0,05%)
2	21267342	2976635	2246260 (75,46%)	1845	2245723 (99,98%)	468 (0,02%)
3	13630694	2429348	2117268 (87,15%)	1594	2116991 (99,99%)	219 (0,01%)
4	3113284	28173	2392 (8,49%)	907	2352 (98,53%)	35 (1,47%)
TOTAL	56177760	7909059	5653345	6830	5651754	1372

Table 2: Description of the samples that made up the four libraries, host and code of the respective RNA pool, tick species and number of ticks per pool.

Library	Host (Sample code)	Species of Ticks (n)
1	<i>Chrysocyon brachyurus</i> (B11 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (2)
	<i>Lycalopex vetulus</i> (B13 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (12)
	<i>Mazama gouazoubira</i> (B14 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (8)
	<i>Mazama gouazoubira</i> (B20 I)	<i>Rhipicephalus microplus</i> (6)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B21 I)	<i>Amblyomma nodosum</i> (6)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B24 V)	<i>Amblyomma nodosum</i> (2)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B28 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (4)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B29 II)	<i>Amblyomma nodosum</i> (1)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B30 III)	<i>Amblyomma sculptum</i> (12)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B31 II)	<i>Amblyomma sculptum</i> (1)
2	<i>Tamandua tetradactyla</i> (B32 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (7)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B33 IV)	<i>Amblyomma sculptum</i> (2)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B33 V)	<i>Amblyomma nodosum</i> (2)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B50 IV)	<i>Amblyomma nodosum</i> (2)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B50 V)	<i>Amblyomma sculptum</i> (5)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B61 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (1)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B71 III)	<i>Amblyomma nodosum</i> (2)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B74 II)	<i>Amblyomma sculptum</i> (1)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B86 I)	<i>Amblyomma nodosum</i> (3)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B97 I)	<i>Amblyomma nodosum</i> (4)
3	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B97 IV)	<i>Amblyomma sculptum</i> (2)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B26 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (7)
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (B29 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (3)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B41 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (5)
	<i>Chrysocyon brachyurus</i> (B56 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (1)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B61 II)	<i>Amblyomma nodosum</i> (1)
	<i>Tapirus terrestris</i> (B84 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (2)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B99 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (3)
	<i>Mazama gouazoubira</i> (B15 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (4)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B30 I)	<i>Amblyomma nodosum</i> (2)
4	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B31 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (2)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B79 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (2)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (B79 II)	<i>Amblyomma nodosum</i> (1)
	<i>Callithrix penicillata</i> (B80 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (1)
	<i>Cerdocyon thous</i> (B100 I)	<i>Amblyomma sculptum</i> (3)

The vast majority of contigs, around 5651754, were classified as cellular organisms like bacteria and fungi, resulting in 1372 viral contigs. Of all the viral sequences, the one that stood out the most was the presence of the Jingmen tick virus (JMTV) genome that appeared in greater scope in library 4 (Fig. 1), which was composed of ticks of the *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma nodosum* species. The ticks used in the preparation of library 4 belonged to the hosts *Myrmecophaga tridactyla*, *Cerdocyon thous* and *Callithrix penicillata*.

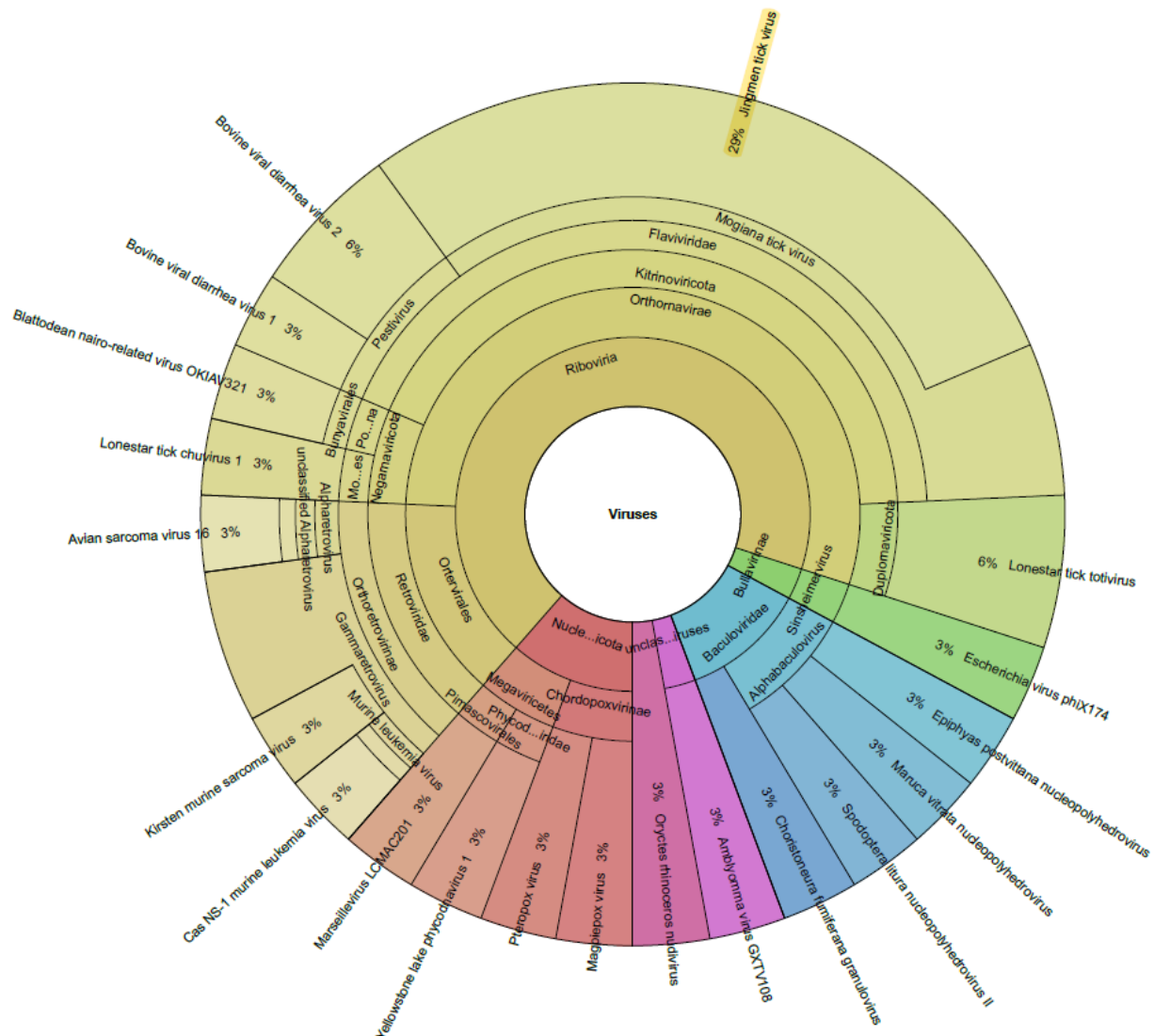


Figure 1: Krona graph showing the identified viral genomes and their respective percentages. Highlighted in yellow is the Jingmen tick virus (JMTV), which appears in greater coverage (29%).

3.3 Genome Organization

The JMTV_Like_Brazil genome described in this work comprises four separate segments of positive-sense linear single-stranded RNA, which are referred to as segments S1, S2, S3 and S4, respectively. Segments S1 and S3 encode non-structural proteins (NSP1 and NSP2), which are related to the non-structural protein genes NS5 and NS3 of *Flavivirus*, members of the *Flaviviridae* family. The two remaining segments, S2 and S4, encode structural proteins (VP1, VP2 and VP3), envelope, capsid, and membrane proteins, respectively (Fig. 2).

The total genome length of JMTV is approximately 11,401 nucleotides, similar to *Flavivirus* [7]. In this work, we obtained a genome of 11,842 nucleotides corresponding to segments S1 (3,093 bp), S2 (3,008 bp), S3 (2,968 bp) and S4 (2,773 bp).

Segment 1 contains nucleotides encoding the non-structural protein NSP1, similar to flavivirus NS5 proteins, and was characterized by the conserved RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and methyltransferase motifs that are typical of flavivirus. Segment 3 contains nucleotides that encode the non-structural protein NSP2, which also resembles the flavivirus NS2b-NS3 complex.

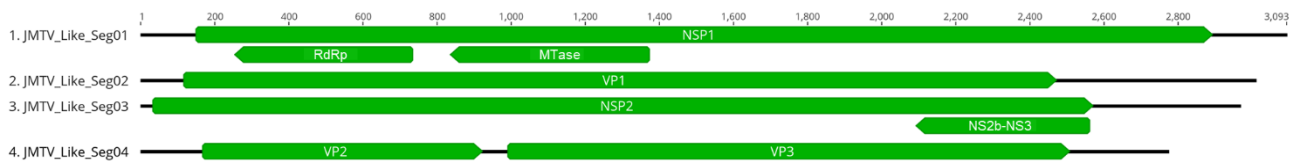


Figure 2: Genome organization of JMTV_Like_Brazil. Segment 1 (JMTV_Like_Seg01) shows the NSP1 non-structural protein. Segment 2 (JMTV_Like_Seg02) shows the VP1 envelope structural protein. Segment 3 (JMTV_Like_Seg03) shows the NSP2 non-structural protein. Segment 4 (JMTV_Like_Seg04) shows the capsid VP2 and membrane VP3 structural proteins.

3.4 Phylogenetic Analysis

The phylogenetic trees for all four segments were built under the GTR+R model, according to SMS selection, based on the nucleotide sequences of the four segments obtained in this study and together with the sequences of the *Jingmenvirus* group previously described.

As shown in Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 and Fig. 6 for a better analysis of these newly identified JMTVs in this study, phylogenetic trees were constructed using a neighbor join approach based on complete sequences of the four segments. The sequences identified in this study formed a well-supported sub-lineage and distinct from the clade comprising previously reported JMTVs.

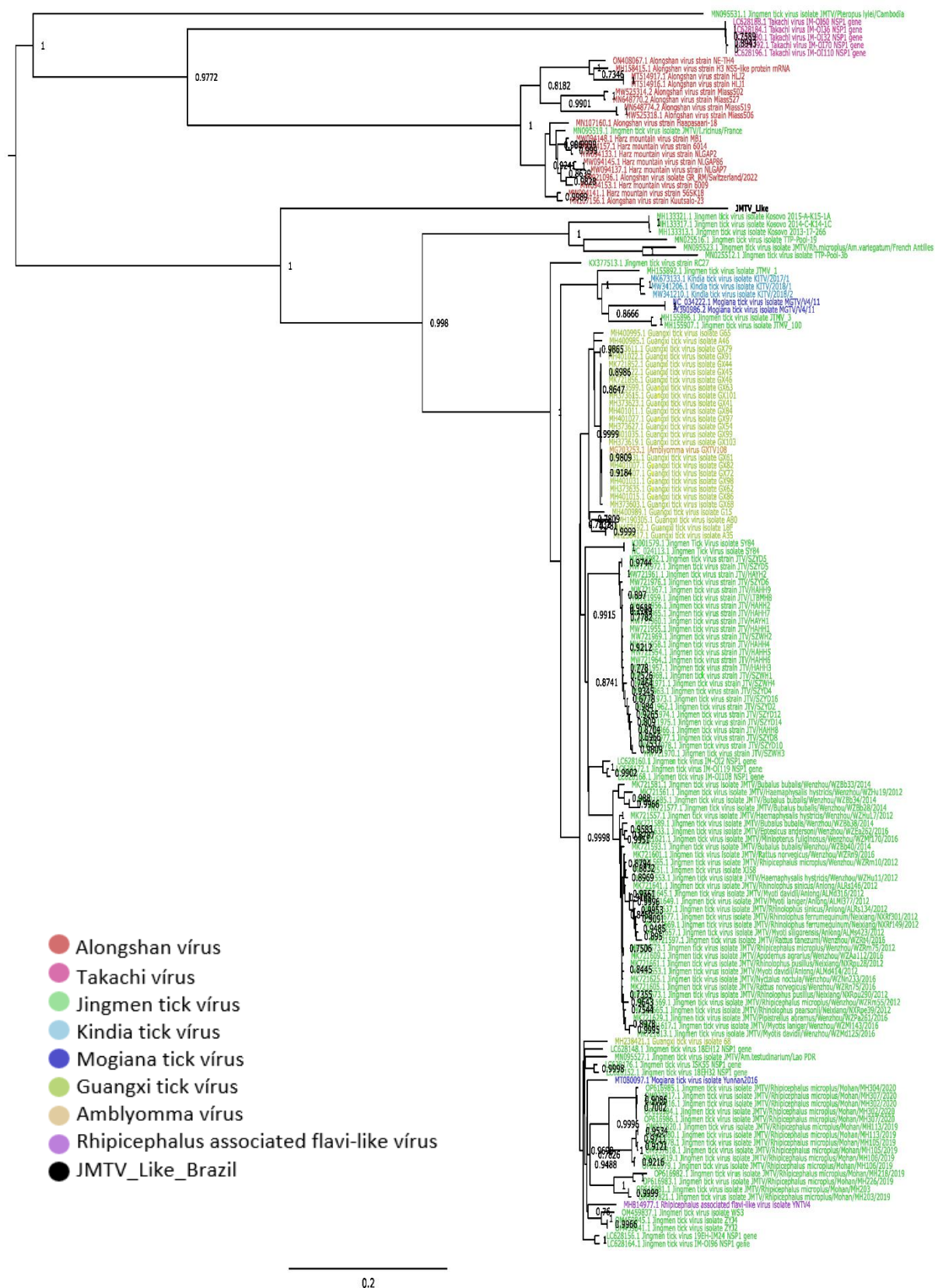


Figure 3: Maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed under the GTR+R based on a dataset of 148 nucleotide sequences of segment 1 from virus related to the *Jingmenvirus* group. Branch support determined by aLRT.

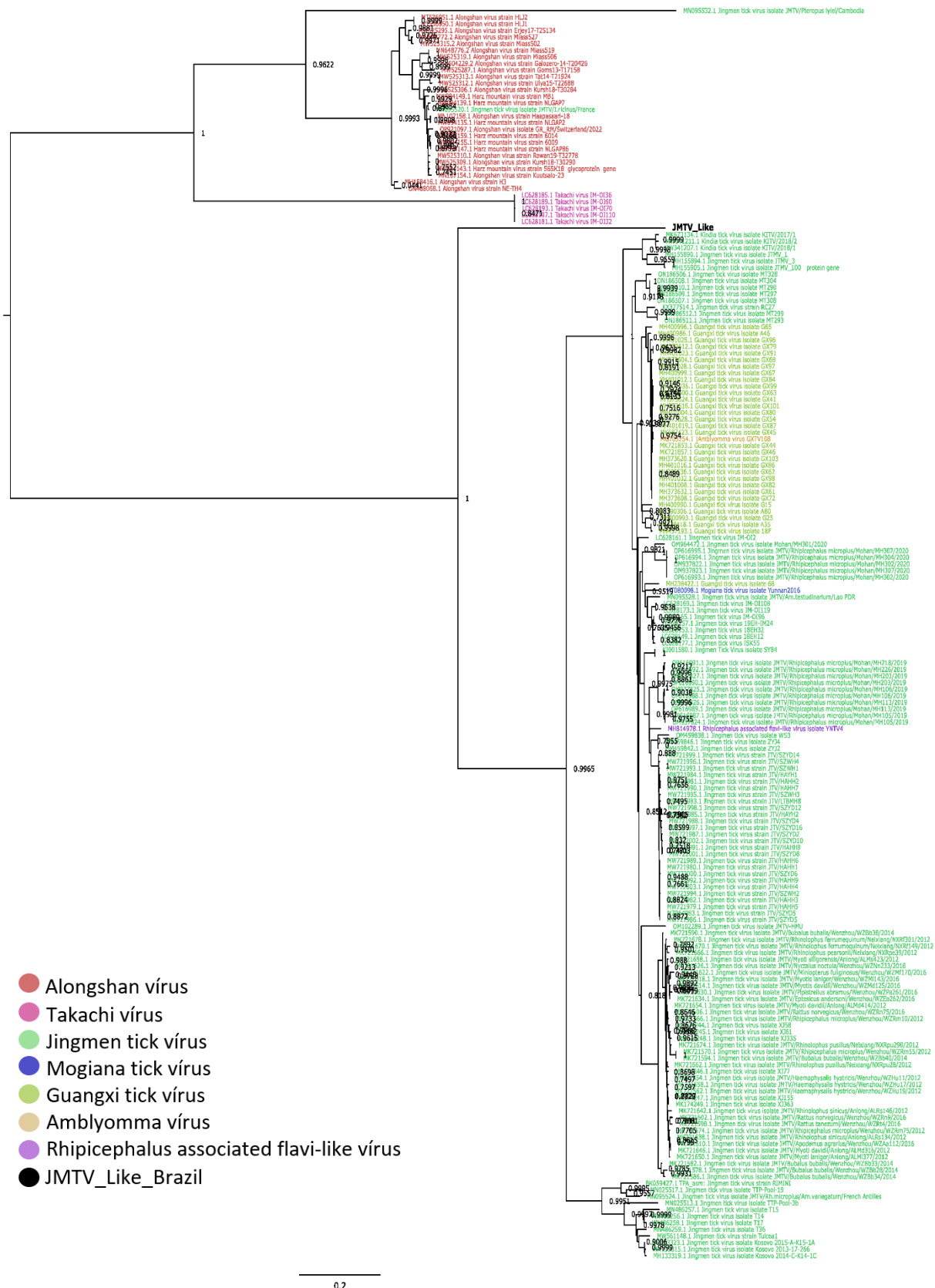


Figure 4: Maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed under the GTR+R based on a dataset of 181 nucleotide sequences of segment 2 from virus related to the *Jinqmenvirus* group. Branch support determined by aLRT.



Figure 5: Maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed under the GTR+R based on a dataset of 116 nucleotide sequences of segment 3 from virus related to the *Jinqmenvirus* group. Branch support determined by aLRT.

The genetic distance between the closest virus for each fragment is described in Table 3. The Jingmen tick virus, belonging to the *Jingmenvirus* group, is the closest representative of JMTV_Like_Brazil identified in this study. Distances between all representatives used in the analyses, for all segments, are available in the supplementary material.

Table 3: Description of the distance between the virus closest to JMTV_Like_Brazil, for each segment.

	Access Number	Nearest Virus and country	p-distance
Segment 1	OP616978.1	Jingmen_tick_virus_China	0.2491803279
Segment 2	OP616987.1	Jingmen_tick_virus_China	0.2918133803
Segment 3	MK721571.1	Jingmen_tick_virus_China	0.2509270705
Segment 4	LC628151.1	Jingmen_tick_virus_Japan	0.2968460111

3.5 Analysis of Three-dimensional Structures

The generated structures were compared with the most similar structures obtained by searching the PDB database. The amino acid sequence of segment 1 indicated the greatest identities with protein structures of NS5 of the Dengue virus (PDB ID: 5CCV), Yellow Fever Virus (PDB ID: 6QSN), Japanese encephalitis virus (PDB ID: 4K6M), Zika virus (PDB ID: 5TMH), Bovine viral diarrhea virus (PDB ID: 1S4F) and Kunjin virus (PDB ID: 2HCN) (Fig. 7).

The search using amino acid sequence of the segment 3 indicated the greatest identities with protein structures of NS3 of Alongshan virus (PDB ID: 6M40), Tick-borne encephalitis virus (PDB ID: 7JNO), Kyasanur Forest disease virus (PDB ID: 7V4Q), Zika virus (PDB ID: 5GJB), Kunjin virus (PDB ID: 2QEQ), Ilheus virus (PDB ID: 7WD4), Kokobera virus (PDB ID: 2V6J), Bovine viral diarrhea virus (PDB ID: 5GVU) and Classical swine fever virus (PDB ID: 4CBL).

BLAST search using amino acid sequence of the segment 2 and 4 did not find similar protein structures

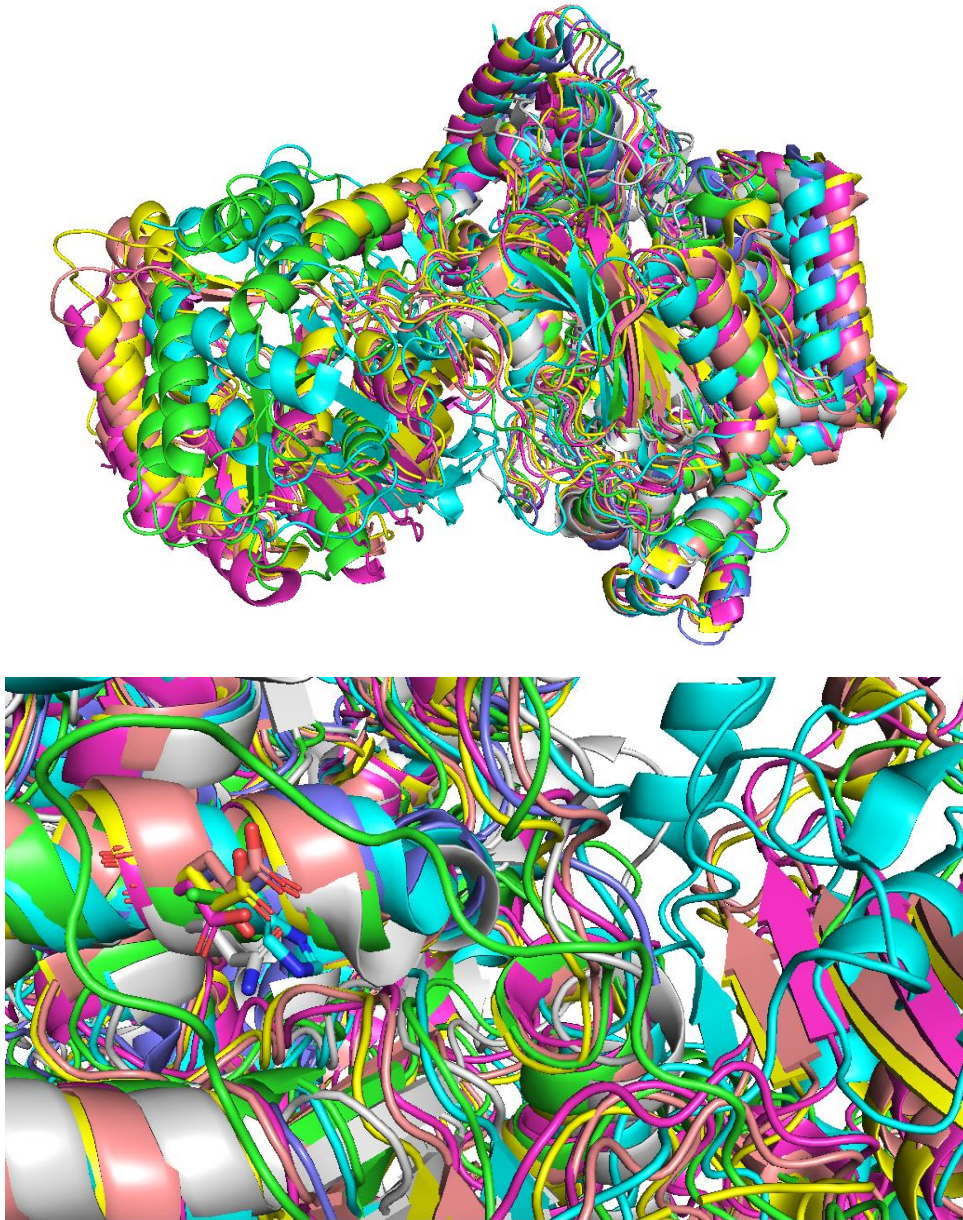


Figure 7: Above, ribbon representation of the superposition of the model structure of the segment 1 in green with three-dimensional crystal structures of NS5 of the Dengue virus (PDB ID: 5CCV) in cyano, Yellow Fever Virus (PDB ID: 6QSN) in pink, Japanese encephalitis virus (PDB ID: 4K6M) in yellow, Zika virus (PDB ID: 5TMH) in salmon, Bovine viral diarrhea virus (PDB ID: 1S4F) in light gray and Kunjin virus (PDB ID: 2HCN) in blue. The methyltransferase (MTase) domain on the left side and RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) domain on the right side. Below, detail of a handle (in green) exclusive to the three-dimensional structure corresponding to segment 1, showing residue 564 (Threonine in segment 1) represented in sticks in which glutamic acid is fully conserved among flaviviruses.

The three-dimensional structure of segment 1 was thoroughly analyzed and compared with structures with high identity present in the PDB database. This structure has an exclusive feature, which is a loop formed by residues 279 to 299 and this region sterically blocks access to a helix that belongs to a part of motif A of NS5 flaviviruses (Fig. 8). This helix has LLxxE residues, differently of DLxxE, which is fully conserved among flavivirus structures.

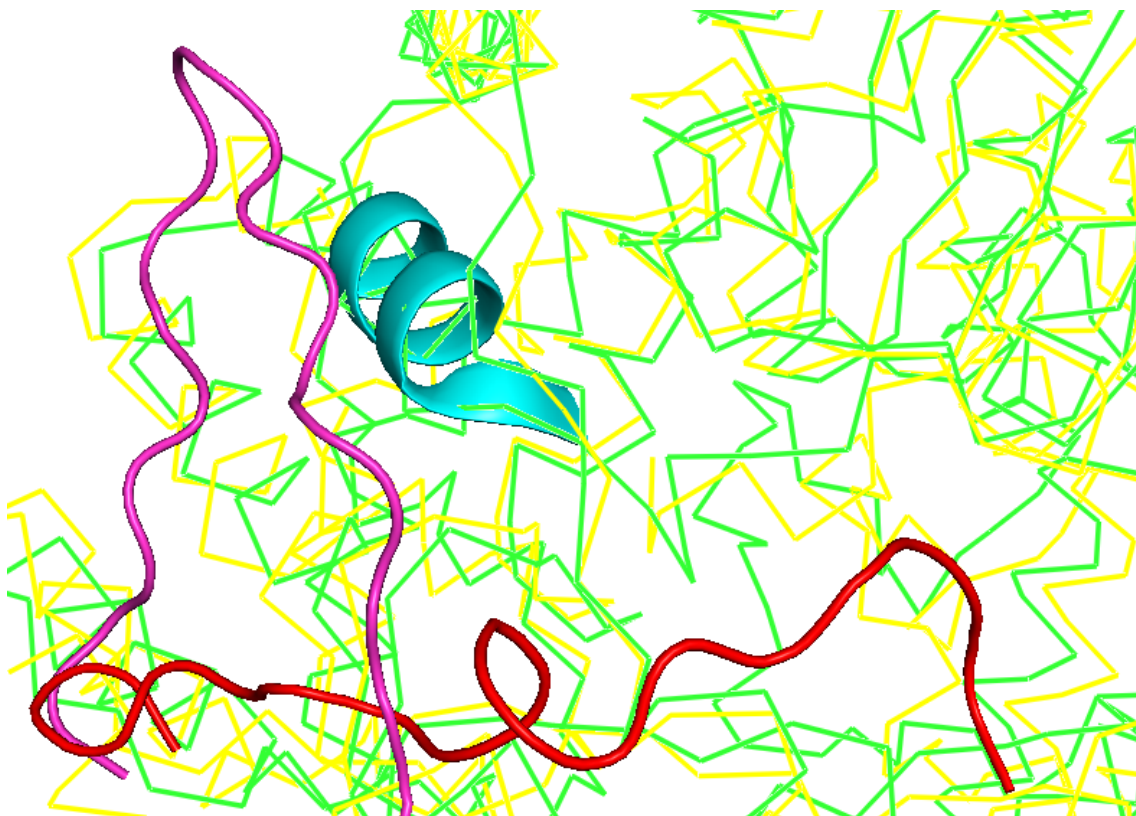


Figure 8. Ribbon representation of the superposition of the model structure of the segment 1 in green with three-dimensional crystal structures of NS5 of the Dengue virus (PDB ID: 5CCV) in yellow. For didactic reasons, the exclusive loop of the structure referring to segment 1 is in pink, showing the steric blocking of the helix represented in blue. All other deposited flavivirus structures lack this loop and the corresponding amino acid sequence is represented in red.

The comparative analysis of the three-dimensional structure referring to segment 3 did not show major differences in relation to other sequences already deposited in the PDB (Fig. 9).

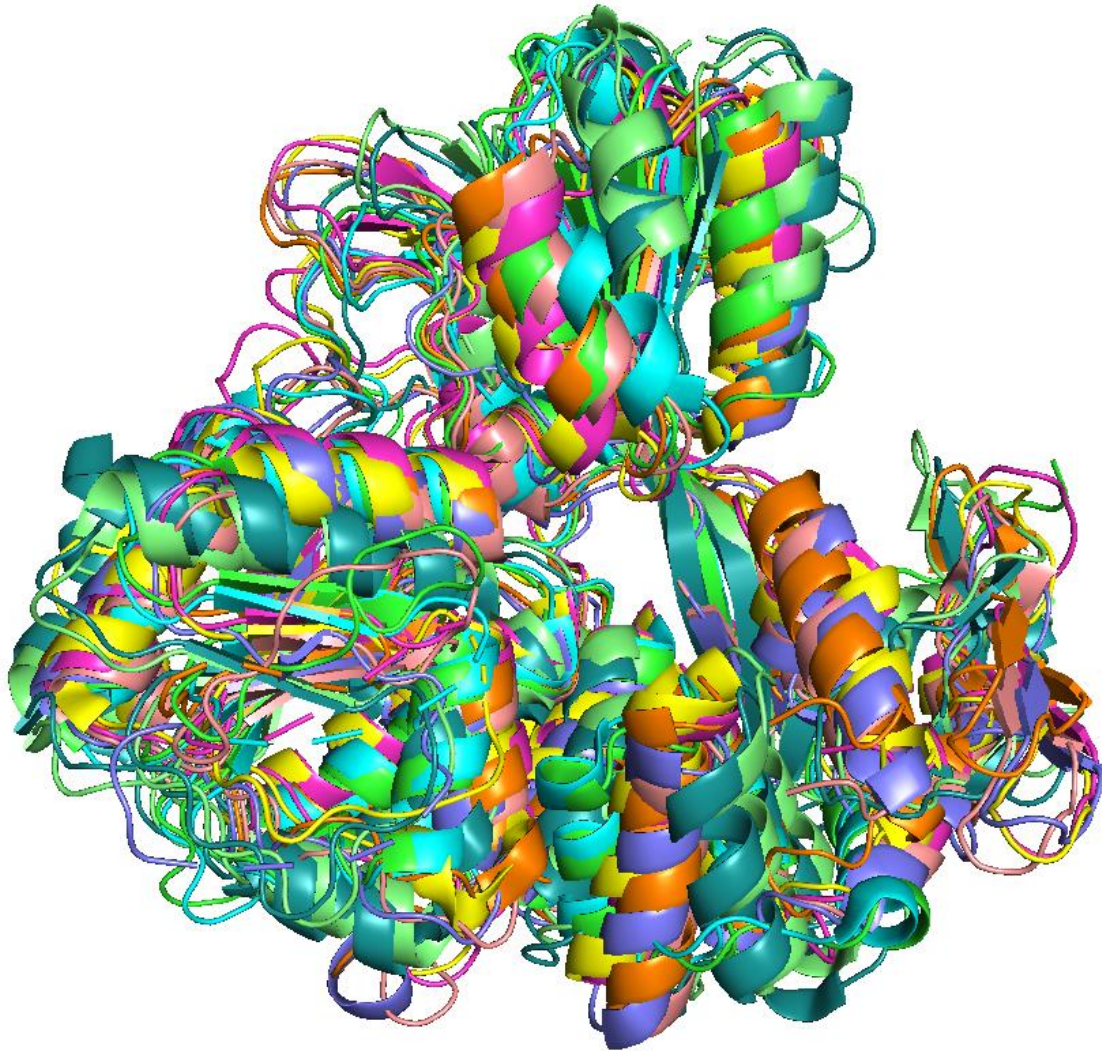


Figure 9: Ribbon representation of the superposition of the model structure of the segment 3 in green with three-dimensional crystal structures of sequence of the of NS3 of Alongshan virus (PDB ID: 6M40) in light blue, Tick-borne encephalitis virus (PDB ID: 7JNO) in pink, Kyasanur Forest disease virus (PDB ID: 7V4Q) in yellow, Zika virus (PDB ID: 5GJB) in salmon, Kunjin virus (PDB ID: 2QEQ) in orange, Ilheus virus (PDB ID: 7WD4) in light purple, Kokobera virus (PDB ID: 2V6J) in orange, Bovine viral diarrhea virus (PDB ID: 5GVU) in light green and Classical swine fever virus (PDB ID: 4CBL) in dark green.

4. Discussion

With advances in high-throughput sequencing and viral metagenomics, many new viruses have been discovered in recent decades, and the focus on metagenomic studies in ticks has increasingly allowed understanding of viral diversity in these ectoparasites. [14, 15, 26-31].

Jingmen tick virus (JMTV), is a tick-borne, segmented RNA virus, which was initially considered a *Flavivirus*. In addition, many viruses with genomes similar to JMTV are being classified as the *Jingmenvirus* group. In addition to ticks and mosquitoes, JMTV has been identified in cattle, rodents and primates that have been successively found and confirmed in several countries in recent years, such as China, Laos PDR, Japan, Turkey, Italy, Kosovo, Romania, Russia, Brazil, Trinidad and Tobago, French Antilles, Colombia, Uganda, Guinea, Kenya [7, 8, 15, 32-36]. There are also reports of JMTV sequences identified in humans with symptoms of hemorrhagic fever in Kosovo [34]. Recently, a human febrile illness, similar to JMTV and which was then called Alongshan virus (ALSV), was also described in China [37, 38].

In Brazil, two viruses isolated from ticks have already been described. Figueiredo *et al.* (2017) isolated the Cacipacoré virus (CPCV), belonging to the genus *Flavivirus* and family *Flaviviridae*, from a tick of the *Amblyomma cajennense* complex removed from a capybara in the interior of the state of São Paulo [39]. Maruyama *et al.* (2014) and Pascoal *et al.* (2019), isolated another virus, called Mogiana tick virus (MGTV), initially considered a highly divergent flavivirus, and detected in ticks of the species *Rhipicephalus microplus* collected in different regions of Brazil, a more detailed study revealed that MGTV is a member of a group of viruses called *Jingmenvirus* [7, 33, 40, 41].

These findings show that there is a large class of viruses with similar genomic structure in nature. *Jingmenviruses* are considered a large group of segmented RNA viruses, composed of four segments that are phylogenetically linked to non-segmented viral ancestors. Based on data from phylogenetic analyzes and genetic distance analysis, we suggest that the virus identified in this study is a new virus belonging to the *Jingmenvirus* group.

The S1 and S3 segments of the genome encode non-structural proteins, which are genetically and functionally related to *Flavivirus* NS3 and NS5 proteins [7]. The remaining segments encoding the structural proteins are unique and likely originated from uncharacterized ancestral viruses [42]. The newly identified virus in this study, which we named JMTV_Like_Brazil, was shown to have a positive-sense single-stranded RNA genome and is also composed of four segments, which were named S1, S2, S3 and S4, according to the description of the genome of the Jingmen tick virus (JMTV).

RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) is one of the most versatile RNA virus enzymes that is essential for genome replication and transcription. Despite the differences

in their sequences, the fundamental structural characteristics of RdRps are conserved. The structure generated by alphafold allowed for a detailed comparative analysis with NS5 structures deposited in the PDB, with a certain degree of identity. The greatest differential found in the target structure was a loop that corresponds to the GTR region in fully conserved in flavivirus NS5 structures. The conserved GTR amino acids located at the carboxy terminus of the MTase play a significant role in maintaining the stability of this overall structure, as they are involved in a complex network of hydrogen bonds that span across both sides of the interface [43] and in this way, these differences can result in alterations in the biological functions of this molecule during the execution of polymerase or transferase tasks.

So far, the tick species in which JMTV is being most commonly detected is the tick *Rhipicephalus microplus*, this species is a parasite that preferentially parasitizes cattle, and has a worldwide geographic distribution, with a prominent importance in Latin American and African countries [44]. There are reports in the literature that JMTV was found in high prevalence in *Rhipicephalus microplus* from China, Brazil, Trinidad and Tobago and French Antilles over these years [7, 15, 35, 40, 41, 45-49]. However, in this study, the JMTV_Like_Brazil sequences were obtained from library 4, which was composed of ticks of the species *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma nodosum*. JMTV sequences were also detected in ticks of the genera *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* and *Ixodes* [7, 11, 15, 35-37, 40, 41, 46, 48-51], as well as two species of mosquitoes [7, 52].

With the increasing number of members of the *Jingmenvirus* group being identified, this group of viruses is gaining prominence in current research, however, large-scale surveillance is needed to fully understand the circulation and transmission of JMTV between arthropods and vertebrate hosts.

5. Conclusion

In this study, we aimed to investigate the virome present in samples of ticks collected from wild animals. Molecular analyzes revealed the RNA of a potential new virus belonging to the *Jingmenvirus* group. So far, there are no reports in the literature of the occurrence of this virus in ticks in the region studied, mainly with a focus on free-living animals. This study also shows the importance of investigating viruses that circulate in ticks, in order to understand potential zoonotic viruses that may also impact human health and contribute to epidemiological surveillance in the region.

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.

7. Supplementary materials

Table S2: The table presents the identified tick species, their respective hosts, number of ticks collected and their distribution in the pools.

Sample code	Rescue City	Host	pools	Number of ticks per pool	Species of ticks
B11	Bady Bassitt - SP	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	I	2	<i>A. sculptum</i>
B13	São José do Rio Preto - SP	<i>Lycalopex vetulus</i>	I	12	<i>A. sculptum</i>
B14	Votuporanga - SP	<i>Mazama gouazoubira</i>	I	8	<i>A. sculptum</i>
			II	6	<i>A. sculptum</i>
B15	Fernandópolis - SP	<i>Mazama gouazoubira</i>	I	4	<i>A. sculptum</i>
B20	Cedral - SP	<i>Mazama gouazoubira</i>	I	6	<i>R. microplus</i>
			II	6	<i>R. microplus</i>
B21	Guapiaçu - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	6	<i>A. nodosum</i>
			II	3	<i>A. nodosum</i>
			III	1	<i>A. nodosum</i>
			IV	1	<i>A. nodosum</i>
B24	Ipiguá - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	2	<i>A. nodosum</i>
			II	2	<i>A. nodosum</i>
			III	2	<i>A. nodosum</i>
			IV	2	<i>A. nodosum</i>
			V	2	<i>A. nodosum</i>
			VI	2	<i>A. nodosum</i>
			VII	2	<i>A. nodosum</i>
			VIII	2	<i>A. nodosum</i>
			IX	2	<i>A. nodosum</i>
B26	São José do Rio Preto - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	7	<i>A. sculptum</i>
B28	Novo Horizonte - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	4	<i>A. sculptum</i>
B29	São José do Rio Preto - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	3	<i>A. sculptum</i>
			II	1	<i>A. nodosum</i>
B30	Mirassol - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	2	<i>A. nodosum</i>
			II	3	<i>A. sculptum</i>
			III	12	<i>A. sculptum</i>
B31	Votuporanga - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	2	<i>A. nodosum</i>
			II	1	<i>A. sculptum</i>
B32	Mirassol - SP	<i>Tamandua tetradactyla</i>	I	7	<i>A. sculptum</i>
			II	7	<i>A. sculptum</i>
B33	São José do Rio Preto - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	2	<i>A. nodosum</i>
			II	2	<i>A. nodosum</i>
			III	2	<i>A. nodosum</i>
			IV	2	<i>A. sculptum</i>
			V	2	<i>A. nodosum</i>
			VI	2	<i>A. sculptum</i>
			VII	2	<i>A. sculptum</i>
			VIII	2	<i>A. sculptum</i>
B41	Tanabi - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	5	<i>A. sculptum</i>
B50	São José do Rio Preto - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	3	<i>A. nodosum</i>
			II	8	<i>A. sculptum</i>
			III	2	<i>A. nodosum</i>
			IV	2	<i>A. nodosum</i>
			V	5	<i>A. sculptum</i>
B56	Tanabi - SP	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	I	1	<i>A. sculptum</i>

B61	Monte Aprazível - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	1	<i>A. sculptum</i>
			II	1	<i>A. nodosum</i>
B71	São José do Rio Preto - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	4	<i>A. nodosum</i>
			II	4	<i>A. nodosum</i>
			III	2	<i>A. nodosum</i>
			IV	2	<i>A. nodosum</i>
			V	5	<i>A. nodosum</i>
B74	Novo Horizonte - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	2	<i>A. sculptum</i>
			II	1	<i>A. sculptum</i>
			III	1	<i>A. sculptum</i>
			IV	6	<i>A. sculptum</i>
			V	16	<i>A. sculptum</i>
			VI	35	<i>A. sculptum</i>
B79	São José do Rio Preto - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	2	<i>A. sculptum</i>
			II	1	<i>A. nodosum</i>
B80	São José do Rio Preto - SP	<i>Callithrix penicillata</i>	I	1	<i>A. sculptum</i>
B84	Irapuã - SP	<i>Tapirus terrestres</i>	I	2	<i>A. sculptum</i>
			II	2	<i>A. sculptum</i>
B86	São José do Rio Preto - SP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	I	3	<i>A. nodosum</i>
B97	São José do Rio Preto - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	4	<i>A. nodosum</i>
			II	2	<i>A. sculptum</i>
			III	4	<i>A. sculptum</i>
			IV	2	<i>A. sculptum</i>
B99	São José do Rio Preto - SP	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	I	3	<i>A. sculptum</i>
B100	Novo Horizonte - SP	<i>Cerdocyon thous</i>	I	3	<i>A. sculptum</i>

Fig S1: Krona graph showing the identified viral genomes and their respective percentages in library 1.

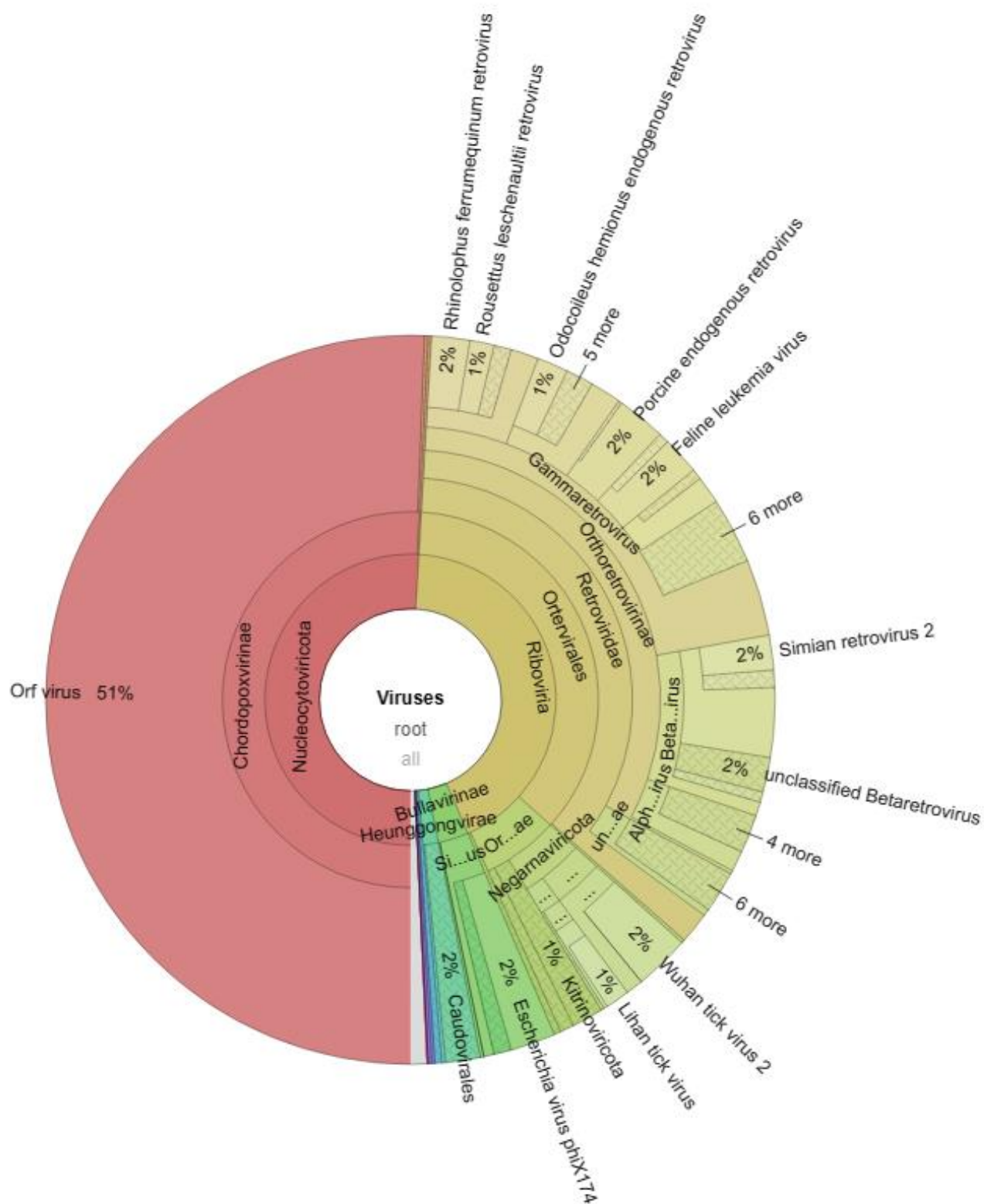


Fig S2: Krona graph showing the identified viral genomes and their respective percentages in library 2.

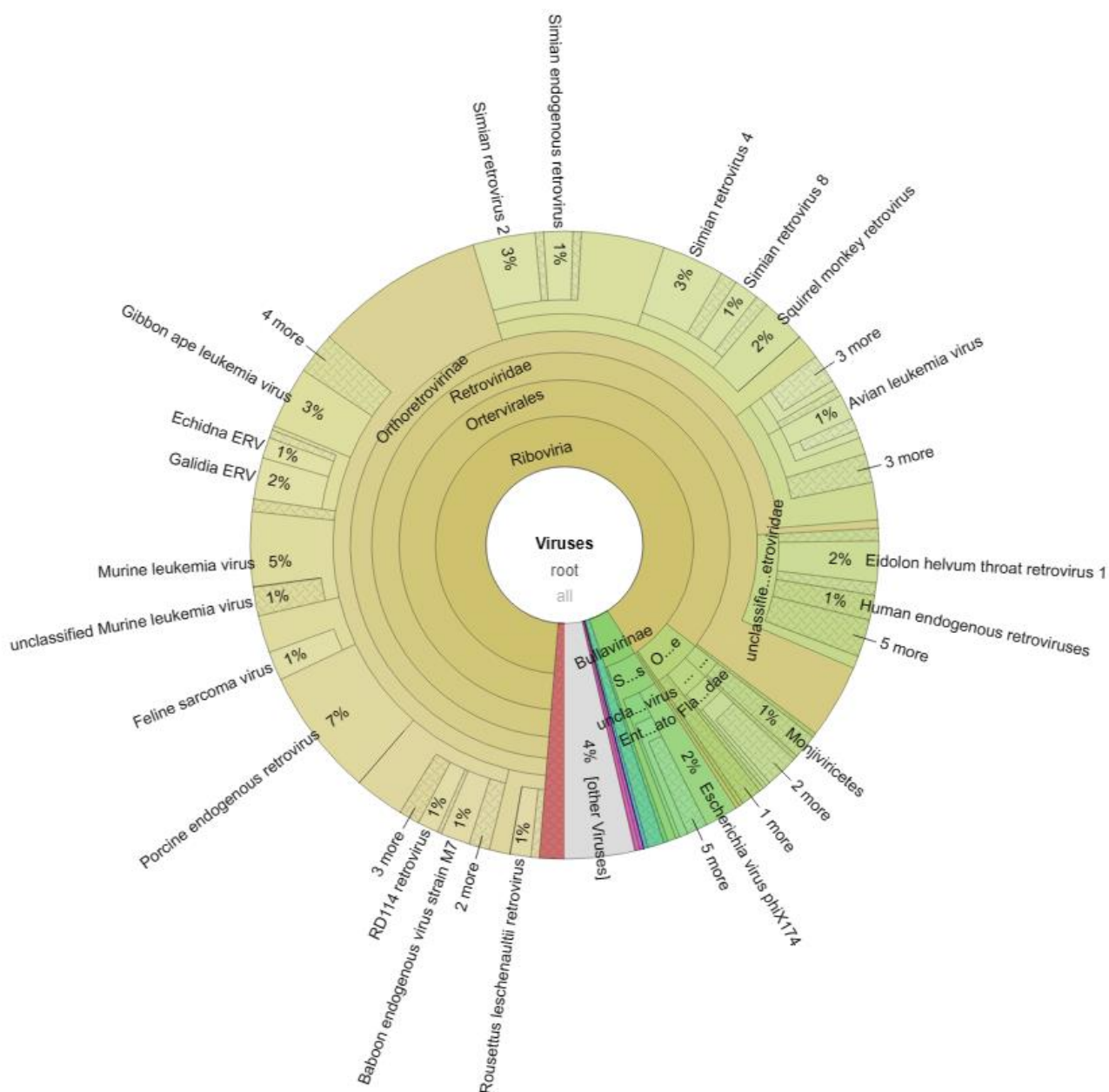
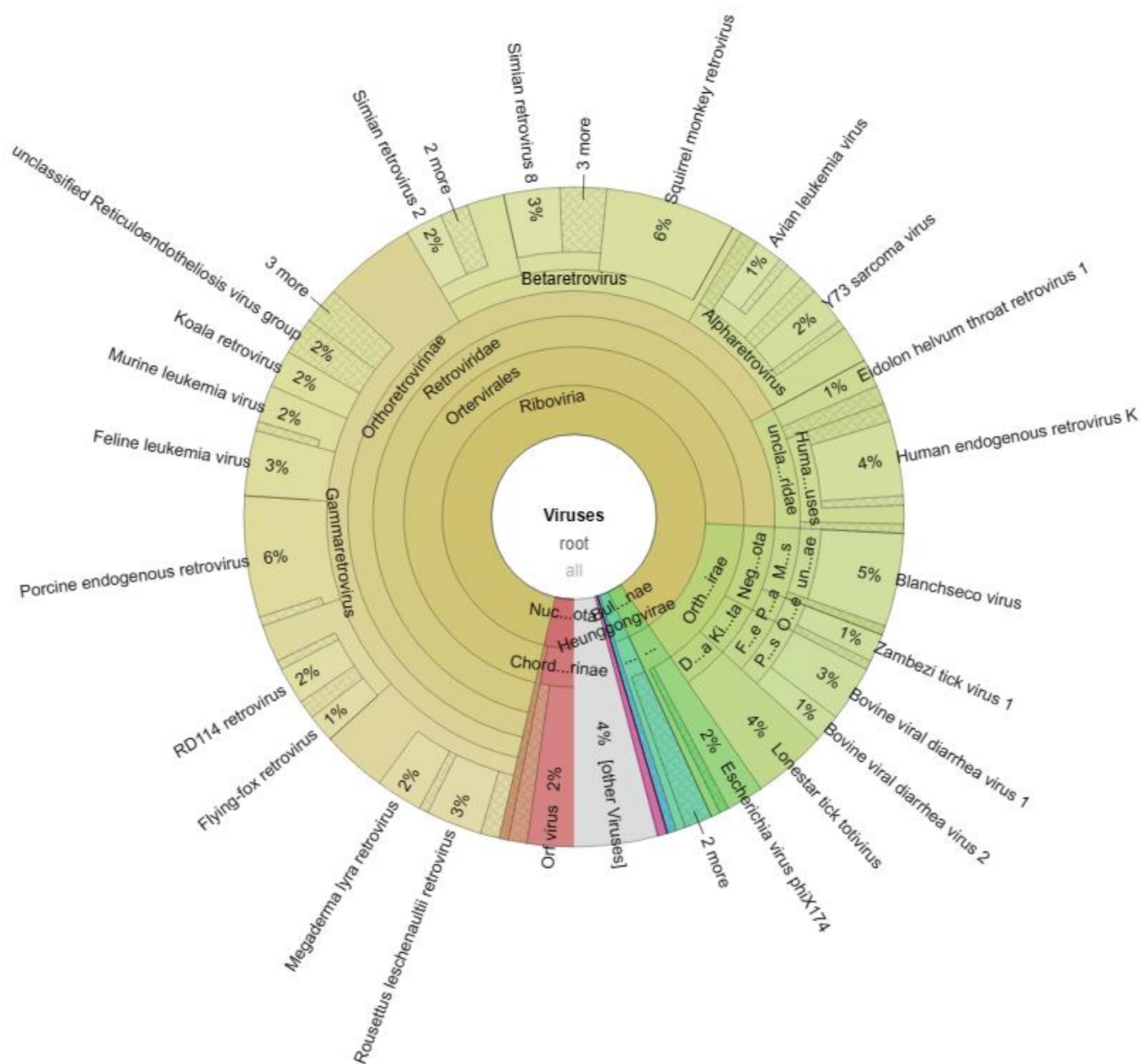


Fig S3: Krona graph showing the identified viral genomes and their respective percentages in library 3.



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.