

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

**CIRCULACIÓN ENZOÓTICA DE ALFAVIRUS EN ÁREAS
NATURALES PROTEGIDAS DEL CORREDOR VERDE
MISIONERO, ARGENTINA.**

Tesinista: María Victoria Calderón Sanabria

Firma: 

Directora: Dra. Lorena Spinsanti

Firma: 

Co-director: Dr. Agustín Ignacio E. Quaglia

Firma: 

Lugar de trabajo: Instituto de Virología “Dr. José María Vanella”, Facultad de Ciencias
Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Córdoba, Argentina

AÑO 2024

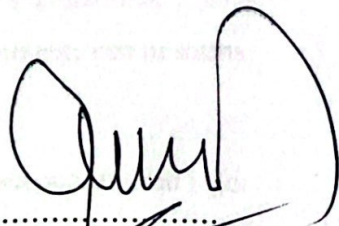
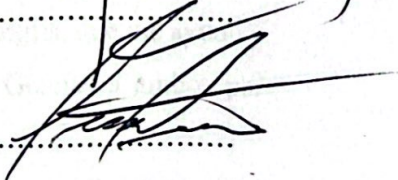
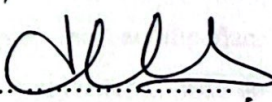
**CIRCULACIÓN ENZOÓTICA DE ALFAVIRUS EN ÁREAS NATURALES
PROTEGIDAS DEL CORREDOR VERDE MISIONERO, ARGENTINA.**

Alumno/a: María Victoria Calderon Sanabria

Director/a: Dra. Lorena Spinsanti

Co-director/a: Dr. Agustín Ignacio E. Quaglia

Tribunal Examinador

- Nombre y Apellido: Andrés M. Usintin Firma: 
- Nombre y Apellido: Mauricio D. Benek Firma: 
- Nombre y Apellido: María Eliza Rivarola Firma: 
- Calificación: 10 (diez)
- Fecha: 10 de Mayo, 2024

Agradecimientos

Al Instituto de Virología “Dr. José María Vanella” (Facultad de Ciencias Médicas, UNC) por haberme brindado la posibilidad, equipo y servicios para desarrollar mi tesina.

Al Consejo Interuniversitario Nacional, por otorgarme la beca CIN para este proyecto de investigación.

A la Dra Laura Tauro, quien fue la mentora de este proyecto para estudiar arbovirus en el corredor verde misionero y puso toda su pasión para realizar los muestreos, acompañada por los profesionales del Instituto Biología Subtropical-Nodo Iguazú (IBS-CONICET-UNAM-Puerto Iguazú) y de otras Instituciones (Sebastián Flores, Victoria Vadell, Melina Brividorro, Juan Arrabal, Bárbara Hartmann, Debora Lamattina, Eliana Burgos, Magdalena Laurito y Adrián Díaz). Aunque ya no estés físicamente con nosotros, gracias Laurita por habernos hecho partícipe.

A mi tutora y directora, la Dra. Lorena Spinsanti, por darme esta oportunidad y por su orientación desde el comienzo. A mi codirector, el Dr. Agustin Quaglia, que me ayudó y me brindó nuevos enfoques permitiéndome enriquecer la tesina. Gracias a ambos por compartir su tiempo, sus consejos y conocimientos conmigo.

Un especial agradecimiento a mi familia que siempre me acompañan, especialmente a mis papas, Vannina y Marcelo, orgullosa de tenerlos y sin ustedes nada de esto sería posible, por esto y más, les quiero dedicar esta tesina y este logro.

A mis amigos y compañeros de la facultad, les agradezco por compartir conmigo esta etapa de aprendizaje, las cosas lindas y no tan lindas de la carrera, así como la pasión por la biología y la ciencia.

A mis amigos de la vida, quienes siempre estuvieron presentes para escucharme, aconsejarme y acompañarme.

A mi pareja mi compañero de vida, Sergio, le agradezco por su amor y apoyo incondicional durante los últimos años. Gracias por todos los mates compartidos, las horas de trabajo y estudio juntos.

Por último, gracias a la universidad pública y gratuita por la educación y formación profesional que me brindó.

A todos ustedes, gracias por ser parte de mi camino y por compartir esto conmigo.

ÍNDICE

Palabras claves	6
Resumen	6
Introducción	8
Género <i>Alphavirus</i>	10
Virus Madariaga	12
Virus Río Negro	14
Virus Mayaro	16
Diagnóstico para infecciones de alfavirus	19
Estudios serológicos en animales silvestres y ciclos selváticos de arbovirus	20
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis	21
Materiales y métodos	22
Área de Estudio	22
Captura de aves y roedores	26
Detección de anticuerpos neutralizantes	28
Análisis estadístico	28
Composición específica y evaluación del estatus de residencia de las especies analizadas	28
Circulación de alfavirus	29
Resultados	31
1. Descripción de las muestras analizadas	31
2. Composición específica y evaluación del estado de residencia de las especies analizadas	31
3. Circulación de los alfavirus	36
Discusión	39
Conclusión	44
Referencias bibliográficas	45
Anexo	57
Fórmula 1.	57
Tabla 1. Especies de aves analizadas de las áreas naturales protegidas del Corredor Verde Misionero durante 2021 y 2022.	58
Tabla 2. Seroprevalencia y cantidad de animales muestreados para virus Madariaga y virus Mayaro en cada área natural protegida durante 2021 y 2022	60

CIRCULACIÓN ENZOÓTICA DE ALFAVIRUS EN ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DEL CORREDOR VERDE MISIONERO, ARGENTINA.

Palabras claves: alfavirus, arbovirus, hospedador, vector, ciclos selváticos de transmisión, anticuerpos neutralizantes, provincia Paranaense, provincia del Bosque de Araucaria, áreas protegidas, Bosque Atlántico.

Resumen

En los últimos años, las infecciones por alfavirus han resurgido y aumentado su incidencia, impulsado por factores tales como el cambio climático, cambios en las poblaciones de vectores y hospedadores, la globalización, actividades antrópicas que perturban los ecosistemas y mutaciones genéticas que facilitan el *spillover* de los virus. Los ecosistemas megadiversos, como el Bosque Atlántico, son escenarios potenciales para la emergencia o reemergencia de estos virus. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la existencia del mantenimiento enzoótico de alfavirus en áreas naturales protegidas (ANP) del Corredor Verde Misionero. Para ello se realizaron encuestas serológicas en aves y roedores para detectar anticuerpos neutralizantes (AcNT) contra los virus Madariaga (VMAD), virus Rio Negro (VRN) y virus Mayaro (VMAY) mediante la técnica de neutralización en monocapa de células Vero. La seroprevalencia global hallada fue del 0,4% (3/722) para el VMAD y 1,6% (7/438) para el VMAY, mientras que no se encontraron animales con AcNT para el VRN. Todos los roedores con AcNT para VMAD y VMAY, pertenecían a la especie *Akodon montensis*, la cual se caracteriza por su dispersión limitada, reflejando así la infección local. En cuanto a las aves, *Tachyphonus coronatus* (Frutero coronado) fue la única que presentó AcNT contra VMAD. Estos hallazgos sugieren la circulación enzoótica de VMAD y VMAY en el Corredor Verde Misionero, con roedores y aves como potenciales hospedadores, aportando así al conocimiento sobre la presencia de estos virus de importancia para la salud humana y animal.

ALPHAVIRUS ENZOOTIC CIRCULATION IN NATURAL PROTECTED AREAS IN THE GREEN CORRIDOR OF MISIONES, ARGENTINA.

Keywords: alphavirus, arbovirus, host, vector, sylvatic transmission cycle, neutralization antibodies, Paranaense province, Bosque de Araucaria province, natural protected areas, Atlantic forest.

Summary

In recent years, alphavirus infections have resurged and increased in incidence, driven by factors such as climate change, changes in vector and host populations, globalization, anthropogenic activities that disrupt ecosystems, and genetic mutations facilitating virus spillover. Megadiverse ecosystems, such as the Atlantic Forest, are potential scenarios for the emergence or reemergence of these viruses. This study aimed to assess the existence of enzootic maintenance of alphaviruses in natural protected areas (NPA) in the Green Corridor of Misiones. For this purpose, serological surveys were conducted on birds and rodents in these NPA to detect neutralizing antibodies (NtAb) against Madariaga virus (MADV), Rio Negro virus (RNV), and Mayaro virus (MAYV) using the neutralization technique. The overall seroprevalence was 0.42% (3/722) for MADV, 1.6% (7/438) for MAYV, while no NtAb were found for RNV. All rodents with NtAb for both MADV and MAYV belonged to the species *Akodon montensis*, characterized by its limited dispersion, thus reflecting local infection. As for birds, the species *Tachyphonus coronatus* was the only one to present NAbs against MADV. These findings suggest the enzootic circulation of MADV and MAYV in the Green Corridor of Misiones, with rodents and birds as potential hosts.

Introducción

Los arbovirus son un grupo polifilético de virus que requieren de un artrópodo hematófago, como mosquitos, garrapatas y flebótomos para su transmisión y dependen de ciclos complejos para mantenerse en el ambiente, a diferencia de otros virus que pueden persistir en el ambiente (ejemplo, *Influenza*) (Weaver & Reisen, 2010). La principal forma de transmisión es la biológica que involucra la interacción de tres componentes: el virus, el vector y el hospedador, aunque hay otras formas de transmisión menos frecuentes como la vertical o directa, entre otras (Kuno & Chang, 2005).

Para que la transmisión biológica de un arbovirus sea exitosa necesita de un vector competente y un hospedador vertebrado susceptible. Se considera que un vector es competente cuando es capaz de adquirir, mantener y transmitir el virus. Para ello, el artrópodo debe ingerir una cantidad mínima infectiva del virus cuando se alimenta de sangre de un hospedador virémico. Una vez en el intestino del artrópodo, el virus debe infectar el epitelio intestinal y replicar en las células epiteliales para posteriormente dirigirse al hemocele y diseminarse por medio de la hemolinfa a otros órganos del vector, llegando finalmente a las glándulas salivales. Una vez en el interior de las glándulas, debe replicar en ellas y ser liberado a través de la saliva hacia el hospedador vertebrado en la próxima ingesta (Fig. 1). Es decir, en un vector competente, el virus debe infectar y escapar de las barreras anatómicas del intestino y las glándulas salivales (Kuno & Chang, 2005; Rückert & Ebel, 2018). El tiempo que transcurre entre la infección del vector y la transmisión del virus se denomina período de incubación extrínseco (PIE), que puede durar en promedio entre 3-7 días, en el caso del virus chikungunya o ser más largo en el caso del virus dengue, que dura en promedio entre 8-12 días. Por lo que la duración del PIE depende del virus y está influenciado por el artrópodo vector y las condiciones ambientales, particularmente por la temperatura. Por otro lado, está el periodo de incubación intrínseco que es el tiempo desde que el virus ingresa al nuevo hospedador susceptible hasta que éste se vuelve virémico, comenzando nuevamente el ciclo de transmisión (Kuno & Chang, 2005; Rückert & Ebel, 2018; Guzmán *et al.*, 2020).

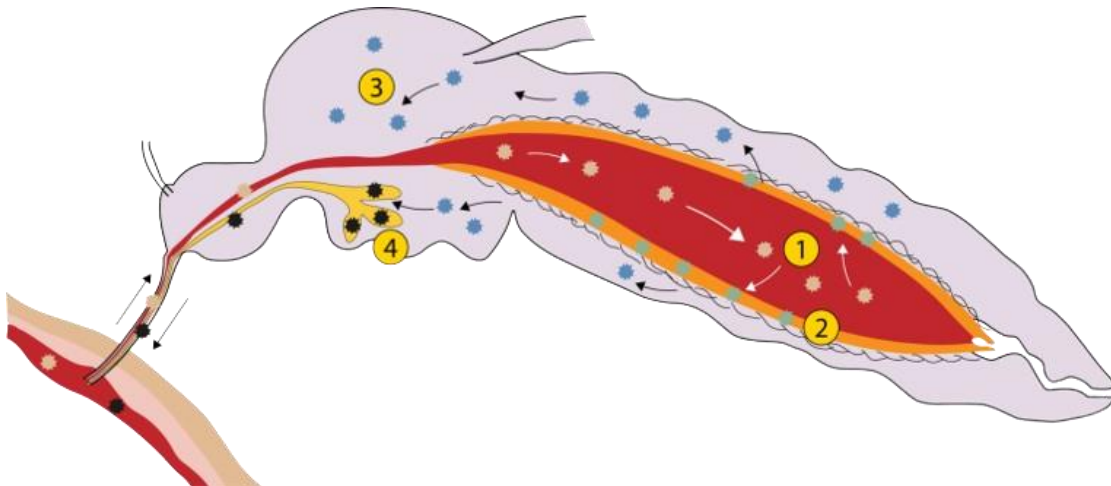


Fig. 1. Ruta de infección por un arbovirus en el cuerpo del mosquito, mostrando las principales barreras que debe superar para poder transmitirse a través de su picadura. 1: Sobrevivir al sistema digestivo y replicarse en el epitelio del intestino medio. **2:** Superar la lámina basal que rodea al intestino. **3:** Diseminarse por el resto del mosquito a través del hemocele. **4:** Alcanzar las glándulas salivales y superar su barrera. Imagen modificada a partir del original de Rückert & Ebel (2018).

En los últimos tiempos, la propagación geográfica de estos virus se ha visto potenciada por el cambio climático y por la actividad humana que lleva a la degradación ambiental y cambios en los ecosistemas, alterando las poblaciones de vectores y hospedadores (Anyamba *et al.*, 2012). Esto es principalmente consecuencia de un gran crecimiento poblacional que impulsa la urbanización de espacios naturales, incrementando las oportunidades de contacto con los vectores selváticos, y a su vez por el avance de la frontera agropecuaria que conlleva altas tasas de deforestación (Jones *et al.*, 2008). Por otro lado, la globalización facilita la dispersión de los virus a largas distancias gracias a los viajes humanos y la dispersión de reservorios animales y/o sus vectores artrópodos (Pfeffer & Dobler, 2010). Como consecuencia del desplazamiento de los arbovirus, los problemas de salud anteriormente restringidos geográficamente ahora toman dimensiones globales, como ocurrió con el virus chikungunya (Weaver, 2013; Gould *et al.*, 2017). Además, el cambio climático incrementa el riesgo de transmisión de arbovirus, incluso en áreas donde las condiciones climáticas previamente limitaban la supervivencia de estos vectores y patógenos (Weaver & Reisen, 2010; Rupasinghe *et al.*, 2022).

Un potencial escenario para la emergencia o re-emergencia de estos virus son los ecosistemas megadiversos como es el caso del Bosque Atlántico, reconocido como una de

las ecorregiones con mayor diversidad biológica del mundo (Bellard *et al.*, 2014). Abarca las regiones de la costa de Brasil, el este de Paraguay y el noreste de Argentina donde está representado por las provincias biogeográficas Paranaense y Bosque de Araucaria (Myers *et al.*, 2000; Arana *et al.*, 2021). En Argentina este bioma está conservado bajo una red de áreas naturales protegidas nacionales, provinciales y privadas a lo largo del Corredor Verde Misionero (Di Bitetti *et al.*, 2003). El Bosque Atlántico alberga una gran diversidad de especies aptas para el mantenimiento de los arbovirus, lo que permite que los ciclos enzoóticos transcurran frecuentemente de forma silenciosa y que pasen desapercibidos en la naturaleza (Gubler, 2001). Este escenario de virus limitados a compartimientos selváticos o enzoóticos se está viendo afectado por las actividades antrópicas previamente mencionadas, que a través de la pérdida y fragmentación de las áreas naturales, impactan negativamente sobre el servicio ecosistémico que la biodiversidad brinda. Este servicio ecosistémico consiste en la capacidad de la biodiversidad para diluir el riesgo de emergencia de las enfermedades infecciosas (Holz & Placci, 2003; Keesing *et al.*, 2010; Smichowski & Contreras, 2020). Es decir, se podría estar alterando la estructura de las comunidades biológicas que mantienen estos virus en los compartimientos selváticos, aumentando la posibilidad de que estos virus salten a los seres humanos y animales domésticos (*spillover*) (Keesing *et al.*, 2010). Por lo tanto, las enfermedades zoonóticas emergen como un foco de interés clave en la salud pública y marcan la indivisible relación entre la salud humana, de la vida silvestre y los ecosistemas, en un concepto de única salud (*one health*) (Daszak *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2009). Los alfavirus parecen un interesante modelo para el estudio del salto inter-específico y la urbanización de las zoonosis (Griffin, 2013).

Género *Alphavirus*

Dentro de los arbovirus, los virus del género *Alphavirus* (familia *Togaviridae*) han incrementado su incidencia y potencial de dispersión con consecuencias para la salud humana y animal (Azar *et al.*, 2020). Con la excepción de dos especies, el Virus de la Foca Elefante del Sur y el Virus de la Enfermedad Pancreática del Salmón, todos los alfavirus se mantienen en ciclos de transmisión entre mosquitos (principalmente) y hospedadores vertebrados (humanos, primates no humanos, équidos, aves, anfibios, reptiles, roedores y cerdos) (Griffin, 2013).

Son virus envueltos, de simetría icosaédrica y un diámetro de aproximadamente 70 nm (Fig. 2). Su genoma consiste en una cadena simple de ARN con polaridad positiva, que actúa como molde para la replicación y como ARN mensajero viral para la síntesis de proteínas. Este mismo está organizado en dos regiones principales: en el extremo 5' con los genes de las proteínas no estructurales (nsPS) ocupando dos tercios del genoma, y en el extremo 3' los genes de las proteínas estructurales ocupando el tercio restante (Griffin, 2013) (Fig. 3).

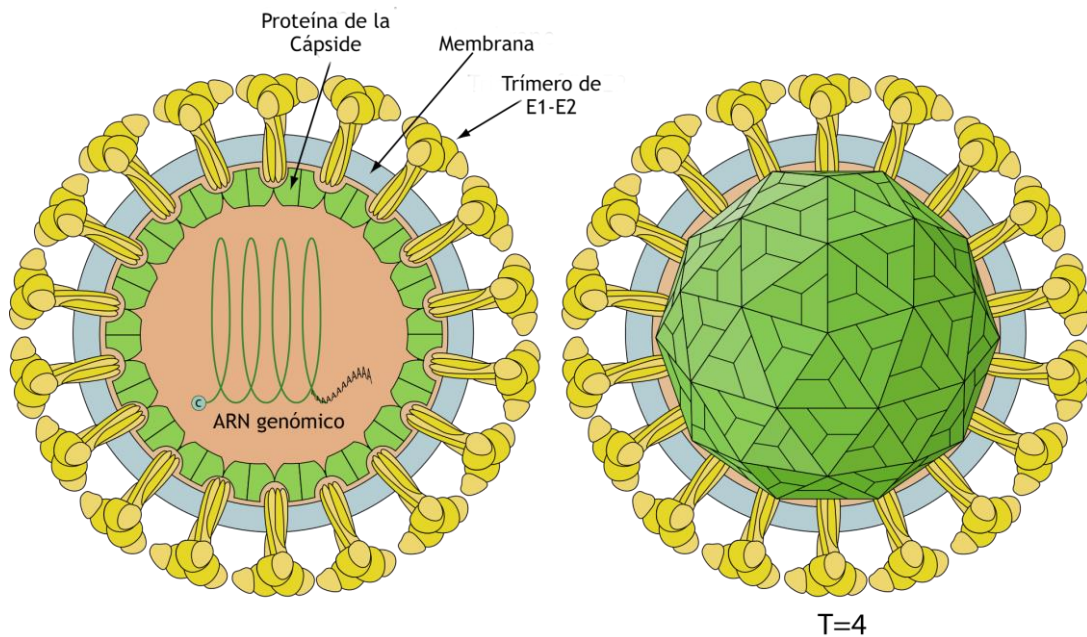


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura del virión de alfavirus. Cápside envuelta, esférica, de 65-70 nm de diámetro, con una simetría icosaédrica T=4 hecha de 240 monómeros. La envoltura contiene 80 espículas, cada pico es un trímero de proteínas E1/E2. Imagen obtenida de Viral Zone 2010, Swiss Institute of Bioinformatics: <https://viralzone.expasy.org/625>.

El genoma viral está dentro de una cápside compuesta por la proteína C y envuelta por una membrana lipídica derivada de la membrana plasmática del hospedador, que contiene las glicoproteínas virales E1 y E2 organizadas en trímeros, formando 80 espículas en la superficie viral. Los alfavirus poseen cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4) que desempeñan un papel crucial en la replicación del ARN viral y la producción de ARN subgenómico, a partir del cual se sintetizan las proteínas estructurales: C, E3, E2, 6K y E1. Estas proteínas estructurales son esenciales para la entrada viral en las células hospedadoras, la replicación viral y la formación de nuevas partículas virales (Griffin, 2013).

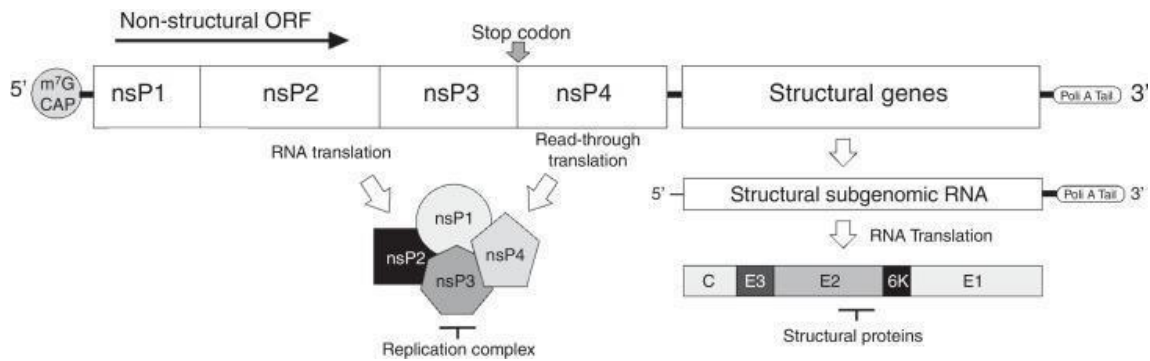


Fig. 3. Representación esquemática de la organización del genoma de los alfavirus (Esposito & da Fonseca, 2017).

El virus ingresa a la célula por endocitosis mediada por las glicoproteínas virales E1 y E2, un proceso que depende de varios factores como el pH y la presencia de receptores específicos en la superficie celular. Estos receptores aún no están completamente caracterizados, pero podrían ser lectinas o moléculas conservadas. Tras la internalización por endocitosis, un cambio en el pH dentro del endosoma provoca la disociación de las glicoproteínas E1 y E2, lo que facilita la liberación del genoma viral para su posterior replicación (Leung *et al.* 2011; Griffin, 2013).

El género *Alphavirus* está compuesto por 32 especies virales que se pueden dividir en ocho complejos basados en características antigénicas (Wanzeller *et al.*, 2023). Por otra parte, teniendo en cuenta su distribución geográfica original, estos virus pueden agruparse en los alfavirus del Viejo y del Nuevo Mundo. Los del Viejo Mundo (virus sindbis, chikungunya, o'nyong nyong, entre otros) se encuentran predominantemente en África, Europa y Asia, y se caracterizan por causar enfermedades febriles, con erupción cutánea y artralgia debilitante como síntomas comunes. Los del Nuevo Mundo o americanos, como el virus encefalitis equina venezolana (VEEV), virus encefalitis equina del Oeste (VEEO), virus encefalitis equina del Este (VEEE), virus Madariaga (VMAD), virus UNA (VUNA) y virus Mayaro (VMAY), son neurotrópicos, excepto el VMAY que produce un síndrome artrítico (Azar *et al.*, 2020).

Virus Madariaga

El VMAD forma parte del complejo antigénico VEEE que posee cuatro linajes o variedades. El linaje I, considerado como variante norteamericana (NA) o VEEE, es un importante patógeno neurológico a nivel veterinario y humano. Este ha sido detectado a lo largo de la costa este de Canadá y E.E.U.U., golfo de México, América Central, islas del

Caribe, costa este de América del Sur, Brasil y Argentina (Go *et al.*, 2014). Por otro lado, los linajes II, III y IV, se encuentran en América Central y del Sur (Arrigo *et al.*, 2010). Debido a la divergencia genética y las diferencias significativas en la ecología, epidemiología y patogénesis, los aislamientos sudamericanos de VEEE (II, III, y IV) son referidos como variantes sudamericanas (SA) o VMAD (Silva *et al.*, 2017).

Las cepas de la variante NA están asociadas a una alta mortalidad en equinos y humanos, mientras que las cepas de las variantes SA, si bien causan encefalitis y muerte en equinos, en humanos la encefalitis severa es poco frecuente (Aguilar *et al.*, 2005). El VMAD ha causado epizootias esporádicas, de diferente magnitud, algunas de ellas afectando a miles de equinos de Argentina, Brasil, Venezuela y Colombia.

El virus fue aislado de mosquitos del género *Culex* (*Melanoconion*) spp. y los estudios serológicos indican que roedores y aves podrían ser hospedadores potenciales al igual que murciélagos y marsupiales (Go *et al.*, 2014; Vittor *et al.*, 2016) (Fig. 4).

En Brasil, en el 2009, se aislaron cepas a partir de caballos con síndrome neurológico y recientemente en el 2019 nuevamente se notificó en la misma zona un brote de encefalitis en equinos (Gil *et al.*, 2021). En el año 2010, fue asociado por primera vez a enfermedad en humanos, durante un brote de encefalitis en equinos en Panamá donde se registraron 13 casos humanos (Carrera *et al.*, 2013).

En Argentina, el VMAD fue aislado de un caballo enfermo en General Madariaga, provincia de Buenos Aires en el año 1930 (Sabattini *et al.*, 1998). El último brote

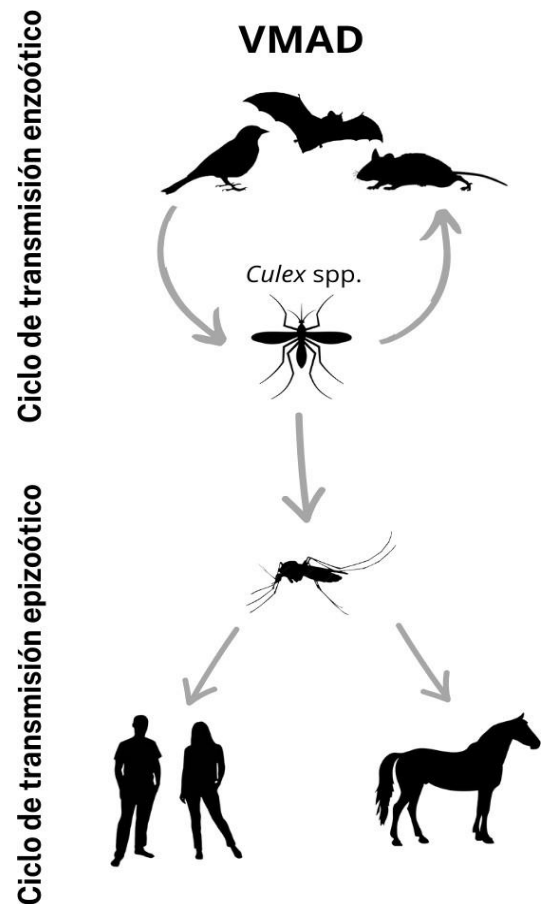


Fig. 4. Posible ciclo de transmisión del VMAD

registrado en equinos fue en el año 1988 en la provincia de Chaco, donde además en 2019, se detectó el genoma viral en *Culex* spp. (Stechina *et al.*, 2019). Durante el período interepizoótico entre 1977 y 1980, se realizaron encuestas serológicas en el noreste de Argentina donde se detectaron anticuerpos contra VMAD en aves silvestres y caballos del Chaco (Monath *et al.*, 1985). En el norte de la provincia de Misiones, encuestas serológicas en aves han demostrado la presencia del virus (Flores *et al.*, 2017). A pesar de la historia de su circulación, se desconocen los potenciales vectores y hospedadores involucrados en el ciclo de transmisión, aunque se cree que *Culex* spp. podría ser el principal vector de VMAD, y tanto los humanos como animales domésticos, incluidos los equinos, no poseer un rol en la amplificación del virus (Aguilar *et al.*, 2005).

Virus Río Negro

El VRN o subtipo VI, forma parte del complejo antigénico VEEV conformado por 6 subtipos serológicamente diferentes (I al VI). El VEEV fue aislado en 1938, a partir de un equino enfermo durante un brote en Venezuela. En los años siguientes, se aislaron e identificaron virus relacionados con VEEV en múltiples localidades de América del Sur, América Central, Islas del Caribe y algunas regiones del sur de Estados Unidos (Griffin, 2013)

El subtipo I de VEEV fue subdividido serológicamente en cinco variedades, IAB, IC, ID, IE y IF y el subtipo III en IIIA, IIIB, IIIC y IIID (Young & Johnson, 1969; Weaver *et al.*, 2004; Weaver & Barrett, 2004).

Epidemiológicamente el complejo VEEV está clasificado en virus epidémicos/epizoóticos y virus enzoóticos, según sus ciclos de transmisión (Fig. 5). Los subtipos IAB y IC pertenecen al grupo de virus epizoóticos, los cuales emergen periódicamente causando brotes que afectan a humanos y equinos (Powers *et al.*, 1997; Griffin, 2013), con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Wang *et al.*, 2005). A diferencia de los equinos, los humanos no parecen actuar como amplificadores del virus debido a su menor exposición a las picaduras de mosquitos. Sin embargo, debe considerarse como una posibilidad ya que los humanos pueden desarrollar títulos virales similares a los de los equinos (Weaver *et al.*, 2004; Pisano *et al.*, 2013). Las principales especies de mosquitos involucradas en el ciclo de estos virus serían *Aedes* spp. y *Psorophora* spp. (Carrara *et al.*, 2005), y mosquitos del género *Ochlerotatus*, como *Ochlerotatus taeniorhynchus* que

probablemente sea el vector epizootico más importante en América del Sur (Weaver *et al.*, 2004).

Por otro lado, los subtipos ID, IE, IF, y del II al VI no han sido originalmente asociados con epidemias ni epizootias, y son llamados enzoóticos porque realizan su ciclo biológico en áreas naturales entre mosquitos vectores y roedores silvestres, aunque también pueden participar otros animales silvestres como aves o murciélagos (Aguilar *et al.*, 2011; Sotomayor-Bonilla *et al.*, 2017). Estos generalmente son no virulentos para equinos e incapaces de amplificar en ellos, no obstante, la mayoría de estos subtipos si pueden provocar enfermedades en humanos (Weaver *et al.*, 2004). A su vez se postula la posibilidad de la evolución periódica de cepas epizooticas de los subtipos IAB, IC y IE, a partir de progenitores enzoóticos de VEEV (Weaver *et al.*, 2004).

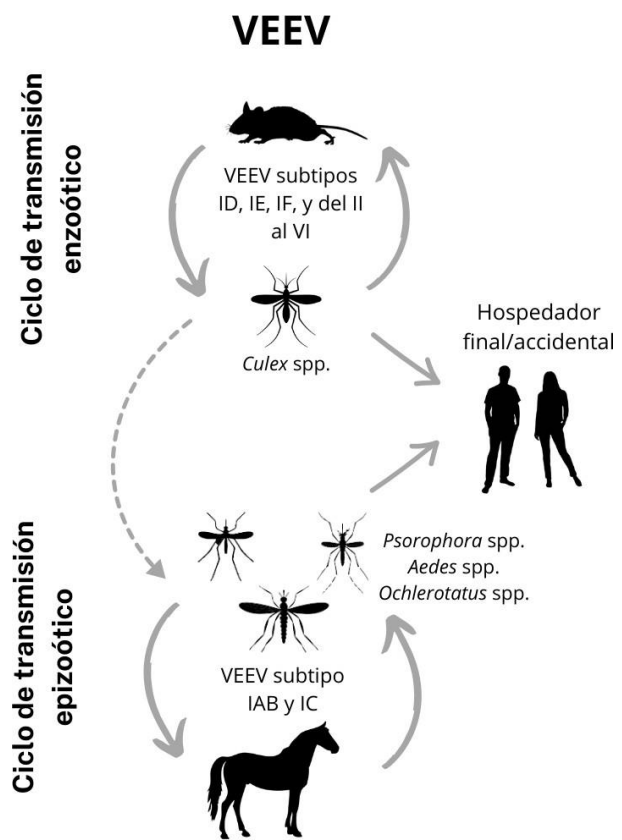


Fig. 5. Ciclo de transmisión del complejo VEEV. La línea de puntos representa la emergencia de cepas epizooticas a partir de mutaciones de cepas enzoóticas.

Diversos estudios serológicos, desde la década de 1950, mostraron la presencia de más de un subtipo enzoótico en las regiones subtropicales de Argentina (Cámara *et al.*, 2003; Pisano *et al.*, 2012; Pisano *et al.*, 2013). En 1955, se encontraron anticuerpos en sueros humanos de la provincia de Córdoba (Bettinotti *et al.*, 1957). En 1980, se aislaron 19 cepas enzoóticas de VEEV en mosquitos de la provincia de Chaco, incluido el subtipo VI o VRN (Mitchell *et al.*, 1985). En esta misma investigación epidemiológica, se encontraron anticuerpos en equinos en todas las provincias estudiadas (Córdoba, Santa Fe, Santiago del Estero, Chaco y Corrientes), mientras que en el caso de roedores, sólo se detectaron sueros positivos en la provincia de Chaco (Monath *et al.*, 1985). En 1989, el VRN fue el agente causante de un brote de enfermedad febril aguda en humanos, similar a

la infección por el virus dengue, en la provincia de Formosa, ya que se detectaron anticuerpos contra este virus (Contigiani *et al.*, 1993). En 1991, se aislaron cepas de VEEV pertenecientes al VRN en roedores del género *Akodon* capturados en Formosa (Cámara, 1997) y en ese mismo año se demostró presencia de anticuerpos en humanos para los subtipos del VRN y IAB en Formosa (Cámara *et al.*, 2003). Así mismo, Pisano *et al.*, (2012) han detectado VRN en mosquitos de Chaco, Tucumán y Córdoba, y virus pixuna (subtipo IV) en mosquitos de Chaco y Tucumán, demostrando la presencia y actividad de estos virus en la región norte-centro de Argentina. A su vez, se vio que VRN también circula en Paraguay ya que se han encontrado anticuerpos en humanos contra este virus entre 2012 y 2013 (Cardozo *et al.*, 2018) y también se ha encontrado en murciélagos en Uruguay (Moreira Marrero *et al.*, 2022). Por otro lado, se ha postulado a *Culex (Melanoconion) delponte* como el principal vector del VRN (Mitchell *et al.*, 1985), pero otros géneros o especies podrían estar involucrado en el ciclo enzoótico ya que investigaciones recientes han demostrado la presencia de este virus en *Culex coronator*, *Culex maxi*, *Psorophora cingulata* y otras especies de *Psorophora* (Pisano *et al.*, 2010). En los últimos años, análisis moleculares y serológicos han revelado una expansión del VRN hacia áreas previamente no afectadas de Argentina. Este fenómeno se atribuye posiblemente a cambios climáticos y ambientales que modifican la ecología de los vectores y huéspedes involucrados (Pisano *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la circulación de VEEV y/o VRN en la selva atlántica y Misiones.

Virus Mayaro

El VMAY fue aislado a partir del suero de humanos febriles en 1954 en Trinidad y Tobago (Anderson *et al.*, 1957). Posee cuatro genotipos: D (ampliamente distribuido), L (limitado al norte-central de Brasil), N (limitado a una región en Perú) y un genotipo recombinante D/L encontrado en Brasil y Haití (Auguste *et al.*, 2015; Mavian *et al.*, 2017). Desde entonces el virus se detectó en algunos países de América Central y del Sur, como en Bolivia, Brasil, Colombia, Guayana Francesa, Venezuela, Perú y Surinam (Auguste *et al.*, 2015). Si bien se han registrado brotes en grandes ciudades amazónicas, como en Manaus en 2007 (Mourão *et al.*, 2012), el resto de los casos de enfermedad por VMAY en

América del Sur son esporádicos y se registran en individuos con historia de actividad reciente en zonas selváticas (Weaver & Reisen, 2010).

Esto se debe a que es mantenido en la naturaleza en el ciclo enzoótico, donde sus principales vectores son mosquitos selváticos del género *Haemagogus* y primates no humanos como hospedadores, aunque otras especies de mosquitos y vertebrados como aves, roedores, y otros pequeños mamíferos podrían estar involucrados (Fig. 6) (Esposito & Fonseca, 2017; Celone *et al.*, 2021). El ser humano es propuesto como un importante hospedador (Griffin, 2013).

Diversos informes recientes advierten sobre un mayor riesgo de urbanización del VMAY en América Latina, ya que se han detectado casos urbanos en Trinidad y Tobago (2014), Guayana Francesa (2020), Perú (2016), Venezuela (2010) y Brasil (2015-2016) (Aguilar-Luis *et al.*, 2021; Auguste *et al.*, 2015; de Souza Costa *et al.*, 2019; González Escobar *et al.*, 2021; Organización Mundial de la Salud, 2020).

El VMAY en humanos provoca un cuadro de fiebre aguda, artralgia, artritis y erupción maculopapular. Otros síntomas que pueden ocurrir son: dolor de cabeza, dolor retro orbital, mialgia, vómitos y diarreas (Auguste *et al.*, 2015). La sintomatología clínica puede ser confundida con otras enfermedades provocadas por arbovirus, como el dengue, Zika y chikungunya (Mota *et al.*, 2015), lo cual podría llevar a una subestimación en la notificación de casos de VMAY.

Este virus pertenece al Complejo Semliki, un grupo de virus dentro del género *Alphavirus* que comparten similitudes antigénicas, lo que puede causar reactividad cruzada en pruebas serológicas, por lo que se requieren pruebas específicas para diferenciarlos y diagnosticar adecuadamente. Especialmente cuando hay otros virus del complejo circulando en simpatria. Este complejo incluye ocho virus de importancia médica y

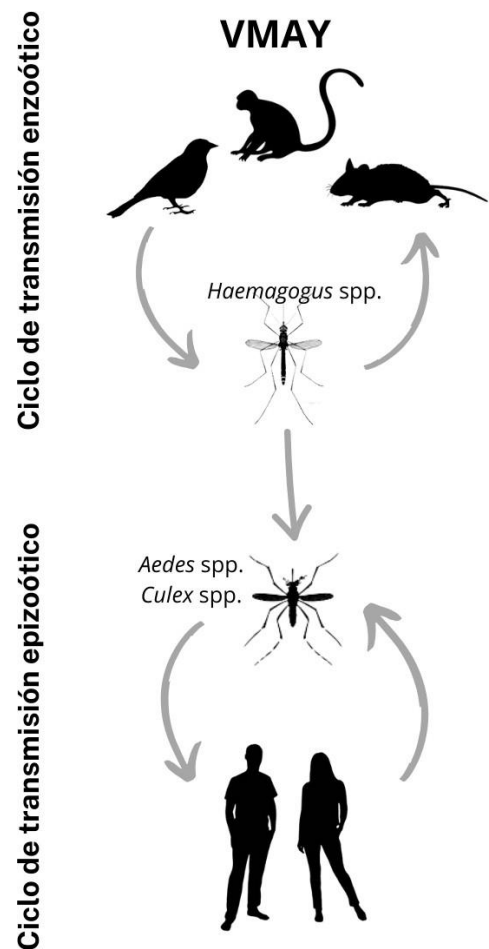


Fig. 6. Ciclos de transmisión propuesto del VMAY

veterinaria (Bebaru, chikungunya, Mayaro, Getah, Semliki Forest, Ross River, o'nyong-nyong y UNA) (Griffin, 2013; Esposito & Fonseca, 2017).

Conocer la distribución geográfica del VMAY, junto con sus potenciales vectores y hospedadores, es necesario para profundizar la comprensión sobre la evolución y dispersión de este alfavirus emergente en América, principalmente teniendo en cuenta la posibilidad de que el virus se adapte a mosquitos antropofílicos, como *Aedes aegypti*, lo que podría facilitar su propagación a otras regiones de Brasil, o a otros países de América (Esposito & Fonseca, 2017; Lorenz *et al.*, 2019). En este sentido, estudios de laboratorio han demostrado que tanto *Aedes albopictus* como *Aedes aegypti* podrían ser potenciales vectores competentes para la transmisión de VMAY (Smith & Francy, 1991; Mitchell, 1991; Long *et al.*, 2011). A su vez, Serra *et al.*, (2016), encontraron *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* infectados con VMAY en sus hábitats naturales en Cuiabá, Mato Grosso (Brasil). Sin embargo, en un estudio reciente, Beranek *et al.* (2024), demostraron que las poblaciones de *Aedes aegypti* de Buenos Aires, Córdoba y Rosario no serían competentes para transmitir el genotipo L del VMAY. Por otro lado, podría ser introducido por aves migratorias o viajeros enfermos (Figueiredo & Figueiredo, 2014). Tal como se ha reportado en los casos importados en Europa y E.E.U.U por turistas provenientes de zonas endémicas del VMAY (Hassing *et al.*, 2010; Receveur *et al.*, 2010; Neumayr *et al.*, 2012; Theilacker *et al.*, 2013; Llagonne-Barets *et al.*, 2016). Este panorama sugiere un escenario futuro en el que VMAY podría adaptarse al ciclo urbano y ser causante de grandes epidemias, imitando la progresión epidemiológica del virus chikungunya (Figueiredo & Figueiredo, 2014; Mota *et al.*, 2015).

En Argentina, se han realizado estudios serológicos para detectar anticuerpos contra VMAY (en humanos y primates no humanos) con resultados negativos (Díaz *et al.*, 2003, 2007; Jean *et al.*, 2013), por lo que hasta la fecha no se ha detectado la presencia del virus en el país. Sin embargo, existe un alto riesgo de introducción y establecimiento del VMAY debido a la conectividad ecológica con el sistema amazónico, donde el VMAY es endémico, a los casos humanos documentados en países vecinos, como Brasil, Bolivia y Paraguay, y al movimiento de personas entre regiones endémicas y Argentina, por lo que acciones de vigilancia y control del virus son esenciales.

Diagnóstico para infecciones de alfavirus

El diagnóstico etiológico de infecciones causadas por alfavirus puede realizarse por métodos directos o indirectos. Para muestras del período agudo de la infección, se recomienda el aislamiento viral, la detección de genoma viral y la detección de antígenos proteicos. Cuando los niveles de viremia son bajos y de corta duración (en las infecciones neurotrópicas), la principal modalidad de diagnóstico es por la detección de anticuerpos específicos en suero y líquido cefalorraquídeo en muestras obtenidas durante el periodo convaleciente (Fig. 7). La técnica serológica de mayor especificidad y sensibilidad utilizada para el diagnóstico de infecciones por arbovirus es la Neutralización (NT) en monocapa de cultivo celular (Piantadosi & Kanjilal, 2020). La NT es la prueba “*gold standard*” para la detección de los anticuerpos neutralizantes (AcNT) frente a la infección por arbovirus. Es una técnica con alta especificidad, pero muy laboriosa, por lo que se la utiliza para confirmar resultados obtenidos por técnicas de tamizaje menos específicas, como el enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). A pesar de que la NT es altamente específica, puede haber cierto grado de reactividad cruzada, por lo que es necesario utilizar un panel de alfavirus con actividad conocida en la región para confirmar los resultados. Las reacciones serológicas cruzadas son más comunes entre los virus que pertenecen al mismo serocomplejo (Griffin, 2013).

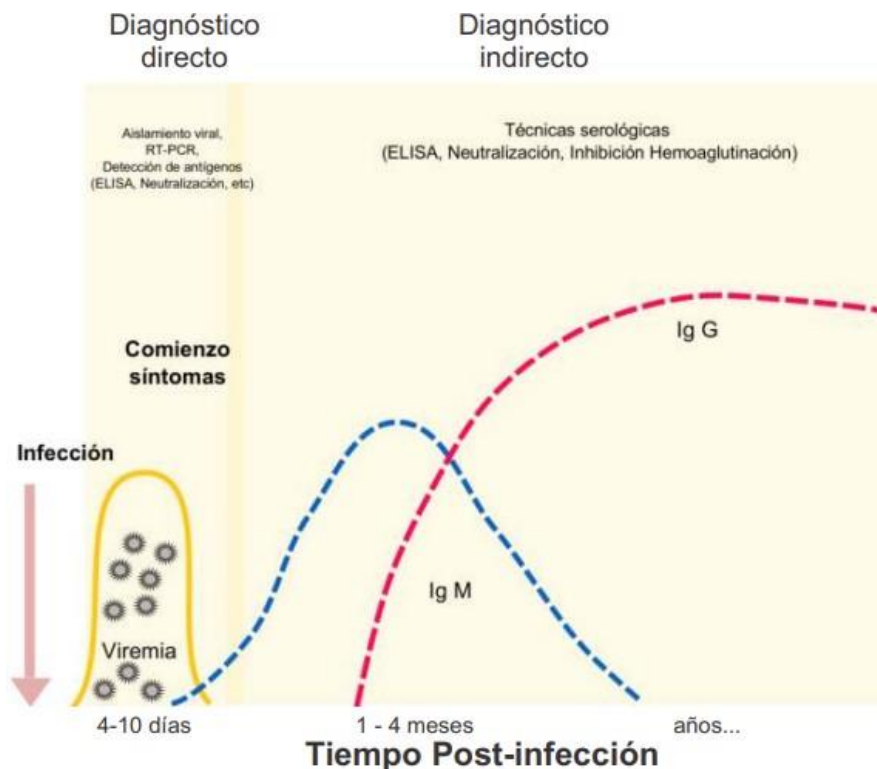


Fig. 7. Representación de la dinámica temporal de la replicación viral y la respuesta inmune en el hospedador vertebrado durante la infección por arbovirus. Los períodos indicados son estimaciones generales y pueden variar según el virus en cuestión (Diaz & Vezzani, 2016).

Estudios serológicos en animales silvestres y ciclos selváticos de arbovirus

Las encuestas serológicas sirven para detectar inicialmente posibles especies amplificadoras de arbovirus, identificando aquellas infectadas o con antecedentes de exposición. Por lo que el monitoreo serológico de animales silvestres para estos virus permite comprender las tendencias de transmisión, inferir sobre vectores y hospedadores implicados en las redes de mantenimiento enzoótico, evaluar el riesgo de emergencia y generar estrategias de prevención y control (Gilbert *et al.*, 2013). La detección de anticuerpos en especies residentes, como aves y roedores, es un indicador clave de la circulación viral en el ecosistema.

Para los alfavirus en cuestión, la transmisión vertical no se considera un factor significativo en la dinámica de mantenimiento viral (Kuno & Chang, 2007; Lequime *et al.*, 2016). Por lo tanto, la detección de anticuerpos en animales silvestres junto con la baja probabilidad de migración de mosquitos vectores refleja principalmente la exposición local a los arbovirus dentro del ecosistema. Por lo que, el reconocimiento de los hospedadores en la vida silvestre es importante para evaluar la evolución viral y el salto de los virus entre poblaciones de reservorios como así también comprender los ciclos de transmisión. Facilita la detección temprana de brotes mediante la identificación de especies centinela y permite avanzar en la mitigación del riesgo de transmisión en la interfaz entre animales y humanos. En este panorama, los estudios serológicos en animales silvestres en áreas naturales protegidas constituyen un paso inicial para evidenciar la circulación enzoótica en una región e identificar los potenciales hospedadores del ciclo de transmisión de estos virus (Kuno & Chang, 2007; Bicca-Marques & de Freitas, 2010; Gilbert *et al.*, 2013).

Objetivo general

Evaluar la existencia del mantenimiento enzoótico de alfavirus mediante el estudio de la exposición a la infección viral en potenciales hospedadores silvestres residentes en áreas protegidas del corredor verde misionero, en las provincias Paranaense y Bosque de Araucaria.

Objetivos específicos

- Detectar circulación de los virus Madariaga, Rio Negro y Mayaro en vertebrados silvestres (roedores y aves) en las áreas protegidas del Corredor Verde misionero.
- Describir variaciones en la ocurrencia de infección de los distintos alfavirus entre las áreas protegidas del Corredor Verde misionero.
- Identificar a través de la frecuencia de exposición, las especies de vertebrados silvestres (roedores y aves) potencialmente involucradas como hospedadores en los ciclos selváticos de alfavirus en las áreas protegidas del Corredor Verde misionero.

Hipótesis

Las áreas naturales protegidas en las provincias fitogeográficas Paranaense y Bosque de Araucaria poseen los componentes biológicos y ecológicos necesarios para que ocurran los ciclos enzoóticos de VMAD, VRN y VMAY.

Materiales y métodos

Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en cinco áreas naturales protegidas (ANP) en el Corredor Verde de la provincia de Misiones, Argentina (Fig. 8). El Corredor Verde, junto con áreas adyacentes de Paraguay y Brasil, conforman el fragmento de mayor tamaño del Bosque Atlántico del Alto Paraná (Di Bitetti *et al.*, 2003). Legalmente, el Corredor Verde es un área de conservación y uso sustentable de aproximadamente 1.000.000 ha, creada por Ley Provincial N° 3631 en 1999 (actualmente, Ley XVI 60), con el fin de proteger este gran remanente del Bosque Atlántico del Alto Paraná, manteniendo la conectividad entre las áreas protegidas. Las ANP son: Parque Nacional Iguazú (PNI), Parque Provincial Moconá (PPM) los cuales se encuentran dentro de la provincia biogeográfica Paranaense, particularmente en el distrito de Selvas Mixtas; Parque Provincial Piñalito (PPP) y Parque Provincial Cruce Caballero (PPCC) dentro de la provincia del Bosque de Araucaria; y el Parque Provincial Urugua-í (PPU) que está inmerso en ambas provincias biogeográficas (Arana *et al.*, 2021). Las actividades de recolección de muestras en PPU fueron realizadas en el sector del distrito de Selvas Mixtas (seccional Uruzú).

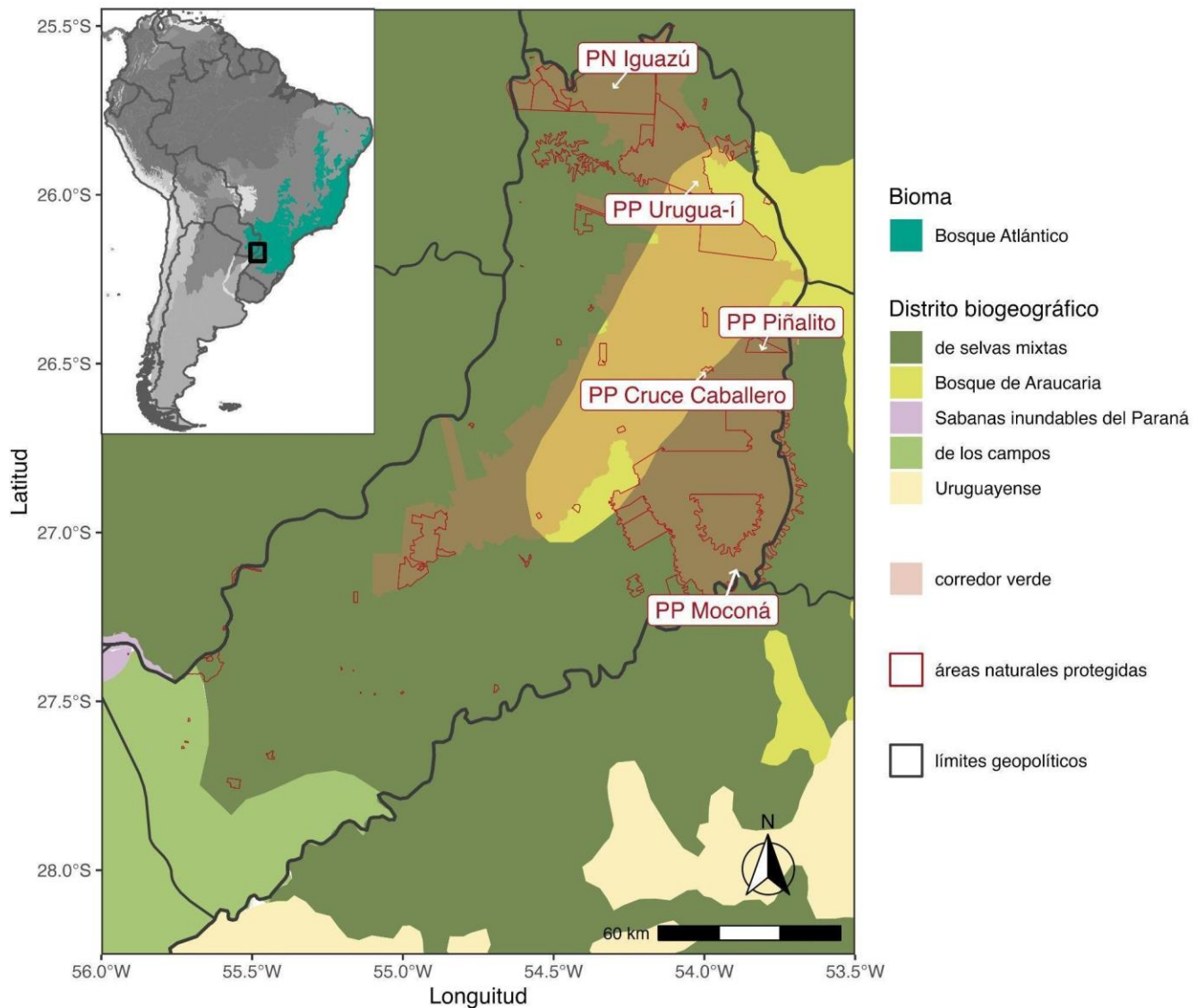


Fig. 8. Mapa del área de estudio, representando los distritos biogeográficos y las áreas naturales protegidas en la provincia de Misiones: Parque Nacional Iguazú, Parque Provincial Urugua-í, Parque Provincial Moconá, Parque Provincial Piñalito y el Parque Provincial Cruce Caballero.

El Parque y Reserva Nacional Iguazú-PNI ($25^{\circ}42'S$; $54^{\circ}18'O$) tiene una superficie de 67.620 ha según el Sistema de Información de Biodiversidad (SIB), <https://sib.gob.ar/portada>), de las cuales las 7.675 ha (ubicadas al Oeste, más próximas a la ciudad de Puerto Iguazú) se designan como Reserva Nacional y 59.945 ha restantes se clasifican como Parque Nacional. El relieve del área es ondulado e incluye parte de la Serranía de la Victoria, que actúa como divisoria de cuencas entre el río Iguazú y el arroyo Urugua-í. La altitud varía desde los 350 msnm en el sudeste a los 200 msnm en el extremo occidental. En la parte superior del río Iguazú, aflora el lecho rocoso creando numerosas

cataratas y saltos a lo largo de un tramo que se extiende aproximadamente 3,6 km (Chebez, 2005). El clima es subtropical cálido y húmedo, con precipitaciones media anuales de 1.800-2.000 mm. Si bien no tiene una estación seca marcada, entre los meses de marzo y agosto las precipitaciones son menores. La temperatura media anual es de 20,7°C, con medias máximas de 31,8°C (enero) y medias mínimas de 10,7°C (junio y julio) (plan de gestión Parque Nacional Iguazú, 2017-2023). El Parque Nacional Iguazú está dentro de la provincia fitogeográfica Paranaense y se encuentra en contacto con el Dominio Chaqueño al suroeste (Arana *et al.*, 2021), creando un ecotono donde se mezclan diversos tipos de vegetación: selvas húmedas, bosques secos, esteros y lagunas. Las selvas marginales de la provincia Paranaense se extienden a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay formando galerías boscosas angostas. La estructura de la vegetación se caracteriza por tener un estrato superior, con árboles de 30-40 metros, que alberga la mayor biodiversidad (Kullock *et al.*, 2006). El estrato medio lo componen arbustos y hierbas, incluyendo bambúseas y mirtáceas y el estrato muscinal se encuentra al ras del suelo. Enredaderas, lianas y epífitas, como orquídeas y claveles del aire, completan la estructura (plan de gestión Parque Nacional Iguazú, 2017-2023).

El Parque Provincial Urugua-í-PPU (25°58'S; 54°06'O) está ubicado en el extremo Nordeste de la provincia de Misiones, con una extensión de 84.000 ha, se destaca como la mayor área protegida estricta en Misiones (SIB). La altitud disminuye gradualmente de Este a Oeste, desde los 800 msnm en la localidad de Bernardo de Irigoyen, hasta los 100 msnm en su punto de unión con el río Paraná (Ambrosini *et al.*, 1986). El clima es subtropical húmedo y lluvioso, sin estación seca. Las precipitaciones anuales son de ~2.000 mm. La temperatura media anual varía entre 20°C y 21°C, con diferencia entre la temporada fría (15,1°C) y la cálida (24,5°C) (Bertolini & Gil, 1999). La vegetación dominante es la selva subtropical, formada por tres estratos arbóreos, uno arbustivo, uno herbáceo y uno muscinal (musgos y líquenes) y abundancia de epífitas y lianas. Sobre la meseta se hallan bosques de Araucaria (*Araucaria angustifolia*) y sabanas serranas y en las zonas más bajas se encuentran sabanas (Bertolini & Gil, 1999).

El Parque Provincial Moconá-PPM (27°09'S; 53°53'O) está localizado en el extremo sudeste de la provincia de Misiones, en el Municipio de San Pedro, Departamento de San Pedro con una superficie de 999 ha (SIB) e inmerso en la reserva de usos múltiples de la biosfera Yabotí (221.155 ha) (SIB). La altitud promedio es de 220 msnm, entre los 140 msnm y 349 msnm y se caracteriza por tener barrancos abruptos, pero a su vez zonas

de terreno llano. El parque está enmarcado por el Arroyo Yabotí o Pepirí Miní y el Río Uruguay, dos cursos de agua importantes que ejercen una fuerte influencia en el clima subtropical templado lluvioso, sin estación seca, con precipitaciones de ~2.020 mm anuales homogéneas durante todo el año (Bertolini, 1999a; Esposito, 2004). La temperatura media varía entre 20°C y 21°C (Cabrera, 1976). En cuanto a la estructura de la selva, en rasgos generales, pueden distinguirse tres estratos arbóreos, uno arbustivo y otro herbáceo. La zona se caracteriza por tres tipos de vegetación: el principal es el Bosque de Laurel y Guatambú, y hay dos comunidades secundarias de Bosque de Galería (en las orillas del río Uruguay) y Asociaciones de *Podostemaceae*, que crecen en rocas cerca de las cascadas (Cabrera, 1976; Bertolini, 1999a). El PPM se encuentra en buen estado de conservación debido a que solo se realizó extracción selectiva de madera y a su difícil acceso, determinado por las pendientes abruptas y su peculiar ubicación rodeada de cursos de agua. Esta configuración ha actuado como una suerte de barrera natural que ha limitado la explotación, permitiendo que hoy en día podamos disfrutar de una de las mejores representaciones de la Selva Paranaense (Espósito, 2004). Además, el parque está rodeado por la reserva de la biosfera Yabotí que actúa como zona de amortiguación.

El Parque Provincial Piñalito-PPP (26°30'S; 53°50'O), está ubicado en el departamento San Pedro de la provincia de Misiones, con una superficie aproximada de 3.800 ha (SIB). Se trata de un área de serranía, con un rango altitudinal de 300 a 800 msnm. Se caracteriza por su clima subtropical húmedo con estacionalidad térmica e hídrica, cuya temperatura media anual es entre 22°C y 25°C y con precipitaciones anuales que superan los 2.000 mm. La vegetación se clasifica como un bosque mixto de *A. angustifolia* (Crespo, 1954; Brown & Zunino, 1994). Este se encuentra en la zona de transición entre la selva misionera y la selva subtropical del Planalto, lo que le confiere una gran riqueza de especies remarcando su importancia como unidad de paisaje en el Corredor Verde Misionero.

El Parque Provincial Cruce Caballero-PPCC se halla al este de la provincia de Misiones, (26°28'S; 53°58'O) en el Departamento de San Pedro, con una superficie de 432 hectáreas (SIB). El relieve es ondulado, con una altitud promedio de 600 msnm (Gartland, 1984). Este parque resguarda uno de los más importantes relictos conservados del ecosistema de las Selvas Mixtas con *A. angustifolia* (Bertolini, 1999b). Asimismo, es un sitio de importancia para la conservación de especies asociadas o endemismos de los bosques de araucaria. El clima es subtropical húmedo, con una temperatura media anual de

17,5°C (Bertolini, 1999b). La temperatura media del mes de enero es de 22,5°C y la temperatura media del mes de julio es de 12,5°C. Las precipitaciones acumuladas anuales son de 1.912 mm y están homogéneamente distribuidas durante el año (Margalot, 1985). La vegetación dominante es la selva subtropical con sus tres estratos arbóreos bien diferenciados, un denso estrato arbustivo y una gran variedad de epífitas y lianas, pero sobre el planalto se hallan bosques de *A. angustifolia* y sabanas serranas, también en las zonas más bajas hay sábanas que están dominadas por gramíneas y hierbas, unas veces edáficas, otras inducidas por el hombre (Cabrera y Willink, 1980; Bertolini, 1999b)

Captura de aves y roedores

Las campañas de muestreos se realizaron durante los años 2021 y 2022. Se recolectaron muestras de sangre en el PNI (sendero macuco), en el PPU (seccional Uruzú), en el PPM (senderos cachi y la gruta), en el PPCC (sendero seccional guardaparque) y en el PPP (seccional Piñalito sur, sendero cancharana) (Tabla 1). La cantidad de campañas de muestreo y su duración estuvo comprometida por las inclemencias meteorológicas y la dificultad de acceso a las áreas de estudio. Esto llevó a que el marco muestral no sea balanceado.

Tabla 1. Información sobre la cantidad de campañas y días para cada ANP.

ANP	Unidad Biogeográfica	Mes/Año	Días
Parque Nacional Iguazú (PNI)	Selvas mixtas	11/2021	3
		04/2022	3
		11/2022	3
Parque Provincial Urugua-í (PPU)	Selvas mixtas	06/2021	4
		12/2021	4
Parque Provincial Piñalito (PPP)	Bosque de araucaria	04/2021	4
		11/2021	4
		02/2022	3
		04/2022	3
Parque Provincial Cruce Caballero (PPCC)	Bosque de araucaria	04/2021	3
		11/2021	2
		02/2022	3
		04/2022	3
Parque Provincial Moconá (PPM)	Selvas mixtas	04/2021	4
		11/2021	4

Para la captura de roedores se utilizaron trampas Sherman (Mills *et al.*, 1998) y redes de niebla para aves (Ralph *et al.*, 1996). Los roedores fueron inmovilizados con isofluorano (West *et al.*, 2014). Cada individuo capturado fue identificado, marcado, sexado, medido y pesado. Se tomó 100-200 µl de sangre para la posterior detección de anticuerpos neutralizantes (<1% del peso vivo). Los animales fueron liberados en el sitio de captura. La muestra de sangre fue diluida en PBS 1/10 en el caso de las aves y 1/5 en el caso de los roedores. Tanto las capturas como la obtención de muestras fueron supervisadas por veterinarios expertos en animales silvestres y aprobadas por los permisos para la recolección de muestras de la dirección de la Administración de Parques Nacionales y Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, provincia de Misiones (IF-2019-07044813-APN-DRNEA#APNAC). Las muestras de sangre fueron conservadas y trasladadas en frío hasta al laboratorio donde fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Detección de anticuerpos neutralizantes

La detección de AcNT para los diferentes alfavirus se realizó mediante NT (Earley *et al.*, 1967) en monocapas de células Vero Clon76 (riñón de mono verde africano). Se utilizaron las cepas de los VMAD cepa EEECb55 (Bettinotti & Aguirre, 1960), VRN (VEEV subtipo VI) cepa RNAG80-663 (Mitchell *et al.* 1985) y VMAY cepa BeAr20290 (Hoch *et al.*, 1981), mantenidas en el cepario del Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella (FCM, UNC). Con cada semilla se prepararon los stocks virales en cultivo celular los que posteriormente, fueron titulados con el fin de obtener la dilución que contenga aproximadamente 100/200 unidades formadoras de placas (ufp) (dilución viral de trabajo). Dicha dilución se utilizó para enfrentar a cada muestra de suero en la técnica de NT.

Los sueros fueron tratados a 60 °C durante 20', para eliminar inhibidores inespecíficos y posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30' para descontaminar. Posteriormente, la detección de AcNT se realizó mezclando partes iguales del suero y la dilución viral de trabajo. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 60' para permitir la unión de los AcNT a las partículas virales (período de neutralización). Al finalizar este período, se inoculó 100 µl de la mezcla (virus-suero) en cada orificio de una placa con monocapa de células VERO y se la incubó durante 60' en estufa a 37°C, 5% CO². Posteriormente se agregó 1 ml de medio nutritivo con agarosa al 1% a cada orificio y se incubó la placa en estufa a 37°C con atmósfera de 5% CO², durante 3 días. Al tercer día, se fijaron e inactivaron las placas agregando formol al 10% durante dos horas, se coloreó con cristal violeta y se realizó el cálculo del número de ufp en cada uno de los sueros testeados. Se consideró positivo a todo aquel suero que neutralizó el 80% o más de las ufp incluidas en la prueba.

Análisis estadístico

Composición específica y evaluación del estatus de residencia de las especies analizadas.

Los análisis de similitud (conocido como ANOSIM) y de escalamiento multidimensional no métrico (conocido como NMDS) fueron empleados para evaluar si la composición de especies analizadas en la encuesta serológica fue similar entre las áreas naturales estudiadas. La matriz de las campañas de muestreo por especies muestreadas y analizadas fue utilizada en el ANOSIM y NMDS. En el caso de las comunidades de roedores, la matriz incluye todas las especies muestreadas que fueron analizadas para

alguno de los virus. En el caso de las comunidades de aves se consideraron sólo aquellas especies con $n \geq 5$ analizadas para alguno de los virus para la construcción de la matriz respuesta. El ANOSIM se realizó considerando el índice de disimilitud Bray-Curtis y se estimó la significancia del estadístico R con un test de permutación ($n=9.999$, $\alpha=0,05$) (Palacio *et al.*, 2020). El estadístico R indica la diferencia entre la disimilitud dentro del grupo (campañas en un ANP o distrito biogeográfico) y la disimilitud entre grupos (ANP o distritos biogeográficos). Por ejemplo, cuando $R \approx 1$ indica que las campañas dentro de un ANP fueron más similares entre sí respecto a las campañas de otras ANP.

El NMDS se utilizó para representar gráficamente las campañas de muestreo (puntos en el biplot) en función de la similitud de la composición de las especies analizadas de estas campañas. Cuanto más similares sean las comunidades, más cercanos aparecen los puntos en el espacio, cuanto más diferentes más alejados. Para este análisis se realizó una transformación de raíz cuadrada y una estandarización doble de Wisconsin sobre la matriz de datos. Se consideró que el NMDS representaba adecuadamente el ordenamiento si el valor de stress $< 0,2$ (Palacio *et al.*, 2020). A su vez, para facilitar la visualización del grado de solapamiento entre las comunidades de los diferentes distritos biogeográficos, se incluyeron elipses de confianza (95%) respecto al centroide de cada distrito biogeográfico.

Determinar el estatus de residencia de las especies es relevante para comprender la circulación viral dentro de las ANP. Por ejemplo, como los posibles escenarios de exposición detectados por la seroencuesta responden a la picadura infectiva de vectores que podrían ser dentro o fuera de las ANP. De esta manera la capacidad de dispersión (km^2) de los roedores y el estatus migratorio (residente, migrante parcial, migrante de larga distancia) de las aves fueron obtenidos de los repositorios de rasgos de historia de vida como COMBINE (Soria *et al.*, 2021) y AVONET (Tobias *et al.*, 2022), respectivamente. Las diferencias en la capacidad de dispersión media entre los ensambles de roedores fueron exploradas por un análisis de la varianza (ANOVA) y las variaciones en la composición del estatus migratorio de las aves entre los sitios se analizaron con una prueba de χ^2 . Ambas pruebas fueron realizadas con un $\alpha=0,05$.

Circulación de alfavirus

La valoración empírica de hipótesis sobre las variaciones regionales, espaciales y de los rasgos de los hospedadores para cada virus no fue realizada debido a que la

frecuencia de exposición detectada para cada uno de los alfavirus analizados fue baja (ver sección resultados) y el tamaño de la muestra limita el poder estadístico para inferir sobre estas variaciones.

Por lo tanto, se decidió: 1- reportar los resultados de la seroprevalencia puntual e intervalo de confianza del 95% (IC95%) para cada alfavirus en las ANP; y 2- analizar las variaciones en la circulación viral para los tres alfavirus en conjunto. Este último punto consideró las variaciones en la circulación viral entre las biorregiones, la posibilidad de que las especies de mayor tamaño están más expuestas a la infección, así como la estructura del diseño de muestreo, a través del ajuste de un modelo generalizado mixto (GLMM; Anexo: Fórmula 1) (Inchausti, 2023). La variable respuesta del GLMM fue la exposición (valor 1) o no (valor 0) al menos a uno de los virus por NT en cada individuo analizado, de acuerdo a una distribución binomial de los errores. Las covariables incluidas fueron el distrito bigeográfico y el peso estandarizado de cada especie en referencia al promedio de las especies de roedores o de aves analizadas. La estructura anidada y desbalanceada en el diseño de muestreo (Tabla 1) fue incluida como factor aleatorio. La significancia de las covariables fue juzgada a través del análisis de la desviación (Test de *Wald*- χ^2 tipo II).

Todos los análisis fueron realizados en la plataforma R (R core Team, 2022) con la interfaz Rstudio y los paquetes *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022), *glmmTMB* (Brooks *et al.*, 2017), *binom* (Dorai-Raj, 2014) y los gráficos con *ggplot2* (Wickham, 2016).

Resultados

1. Descripción de las muestras analizadas

Se sangraron 881 animales silvestres, de los cuales se analizaron 459 muestras de roedores, pertenecientes a 7 especies y 263 muestras de aves pertenecientes a 59 especies (Anexo: Tabla 1). Debido al volumen de sangre obtenido, la cantidad de sueros analizados varió entre las especies virales analizadas. Por lo que en promedio el 82,8% (min= 40%; max= 95,1%) de las muestras de roedores recolectadas fueron analizadas para al menos un virus en las campañas de muestreo y el 65,5% (min= 30; max=89,5) de las aves fueron analizadas para el VMAD.

El estudio presenta un desbalance en el marco muestral ya que el número de muestras recolectadas no fue equitativo para todos los parques: PNI con 48 aves y 57 roedores; PPU con 84 roedores; PPM con 152 aves y 81 roedores, PPCC con 179 roedores; y PPP con 160 aves y 150 roedores.

2. Composición específica y evaluación del estado de residencia de las especies analizadas

Esta tesis no tiene alcance sobre las comunidades de aves y roedores en las ANP, sino que se pretende describir la composición específica de los sueros analizados para al menos un virus (n=722 de 459 roedores y 263 aves).

Se analizaron un total de siete especies de roedores cricétidos en los diferentes sitios y distritos biogeográficos (Fig. 9B). El rango de riqueza de las muestras analizadas fue estrecho entre las ANP (PNI=3 y PPU-PPM=6). Dentro de estas especies, *Akodon montensis* (familia Cricetidae) fue la dominante en todos los sitios, con una frecuencia de 88% en promedio, lo que indica que es una especie clave en los ensambles de roedores estudiados (Fig. 9C).

La composición de la comunidad de roedores analizada en la encuesta serológica demostró ser similar. En el análisis ANOSIM no se hallaron diferencias significativas en la composición de los ensambles de roedores entre sitios ($R= 0,02$; $p= 0,40$) ni entre distritos biogeográficos ($R= 0$; $p= 0,39$). El solapamiento de las elipses en el NMDS respalda estos hallazgos (Fig. 9A).

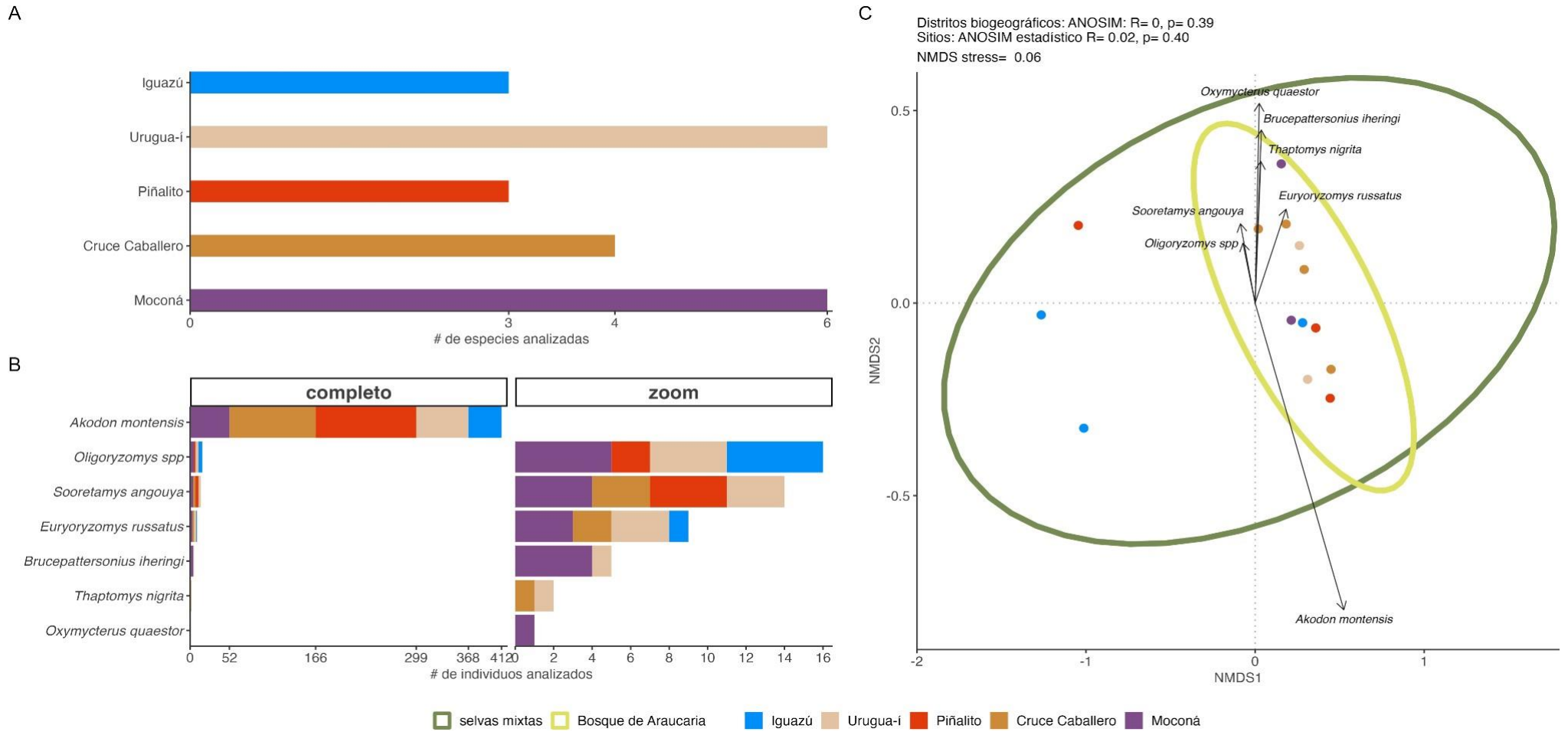


Fig. 9. Composición específica de los roedores analizados. A: NMDS sobre los muestreos de roedores. **B:** Número de especies analizadas de roedores por ANP. **C:** Porcentaje de individuos analizados por especie.

En cuanto a las aves se analizaron 59 especies (Anexo: Tabla 1), siendo el PPM donde se accedió a analizar la mayor cantidad de especies (Fig. 10B). El 21% de las aves analizadas corresponden a *Tachyphonus coronatus* (Frutero coronado) (familia Thraupidae, 11%, 29/263) y *Trichothraupis melanops* (Frutero corona amarilla) (familia Thraupidae, 10%, 27/263) que fueron las aves que dominaron el ensamble analizado y con una distribución similar entre ANP (Fig. 10C).

El segundo grupo mejor representado (20%) fueron *Turdus rufiventris* (Zorzal colorado), *Turdus amaurochalinus* (Zorzal chalchalero) (familia Turdidae) y *Schiffornis virescens* (Bailarín oliváceo) (familia Tityridae) con una abundancia promedio del 6%. *Schiffornis virescens* fue más prevalente en PPP.

Un total de 44 especies de aves ($n < 5$; 79 individuos) no fueron consideradas para explorar variaciones en la composición específica de la encuesta serológica. La composición de la comunidad de aves analizada en la encuesta serológica demostró ser similar, dado que no se hallaron diferencias significativas de la composición específica entre los distritos biogeográficos ($R= 0,18$; $p= 0,15$). Sin embargo, variaciones leves de la composición entre las ANP ($R= 0,48$; $p=0,016$) estuvieron vinculadas a la menor cantidad de especies analizadas en el PNI (eje 1 NMDS) y que *Schiffornis virescens* fue más abundante entre las muestras del PPP (eje 2 NMDS) (Fig. 10A).

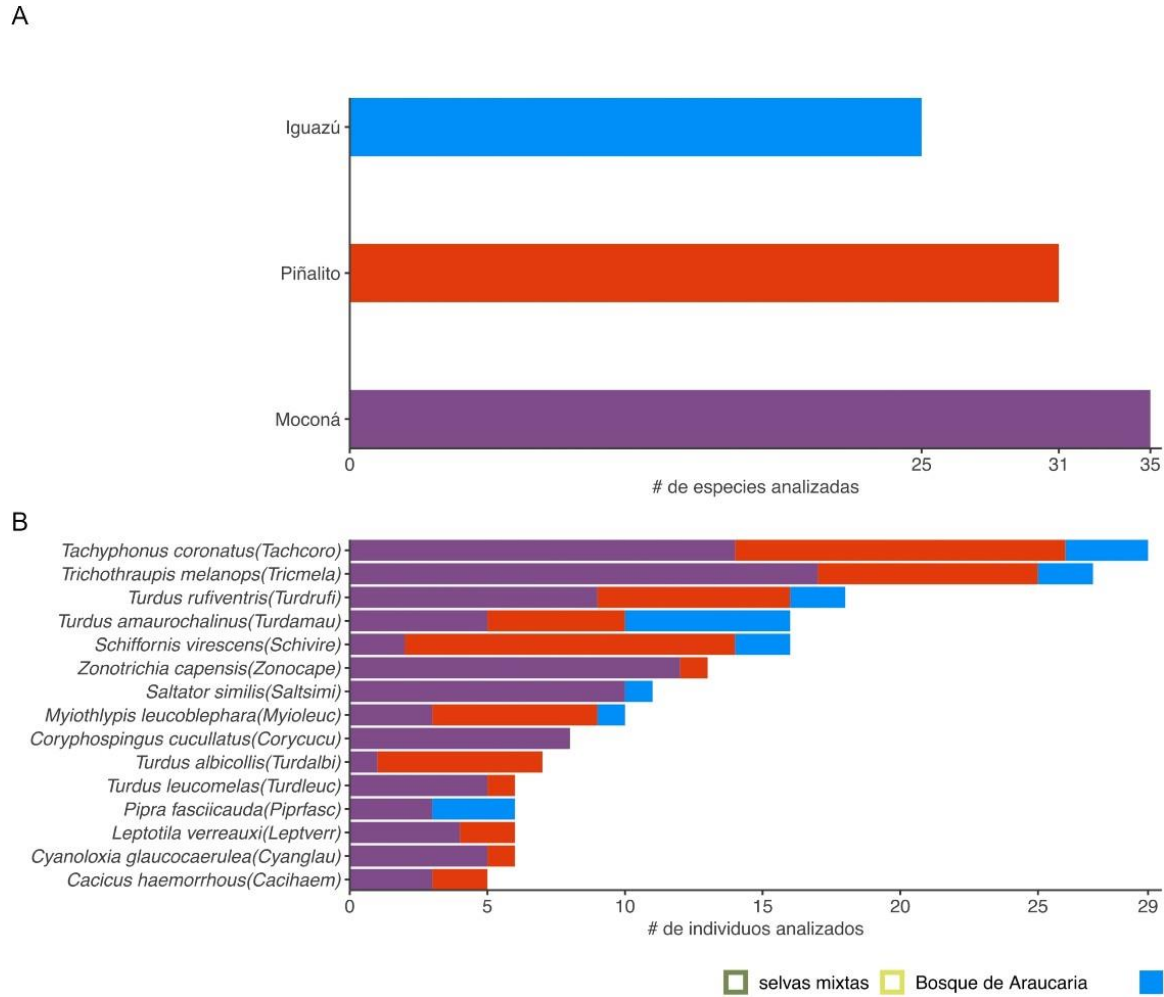


Fig. 10. Composición específica de las aves analizadas. A: NMDS sobre los muestreos de aves. **B:** Número de especies analizadas de aves por ANP. **C:** Porcentaje de individuos analizados por especie.

La potencial dispersión esperada del ensamble de roedores fue de 0,184 km (IC 95% [0,182; 0,187]) lo que indica el estatus residente de las especies. Además, la capacidad de dispersión fue similar entre sitios estudiados, ya que no se encontraron diferencias significativas en la dispersión entre sitios ($F= 1,56$; $gl= 454$; $p= 0,184$) (Fig.11).

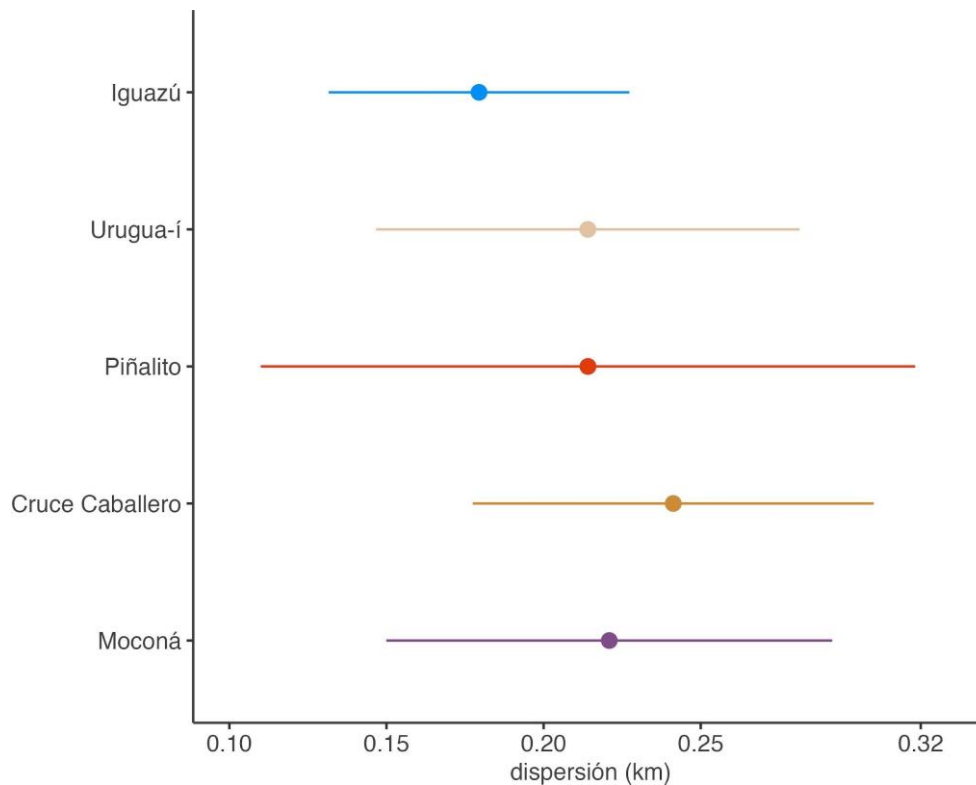


Fig. 11. Dispersión en km del ensamble de roedores muestreados en las ANP. Cada parque está representado por un color diferente

La composición del estatus migratorio de las aves fue similar en todos los sitios ($X^2= 4,93$; $gl= 4$, $p= 0,290$; Fig. 12). El ensamble de aves estuvo primariamente representado por especies residentes (62,1%), seguido de migrantes parciales (24,7%) y migrantes de larga distancia (7,22%) ($\chi^2= 154,8$; $gl=2$; $p<0,001$).

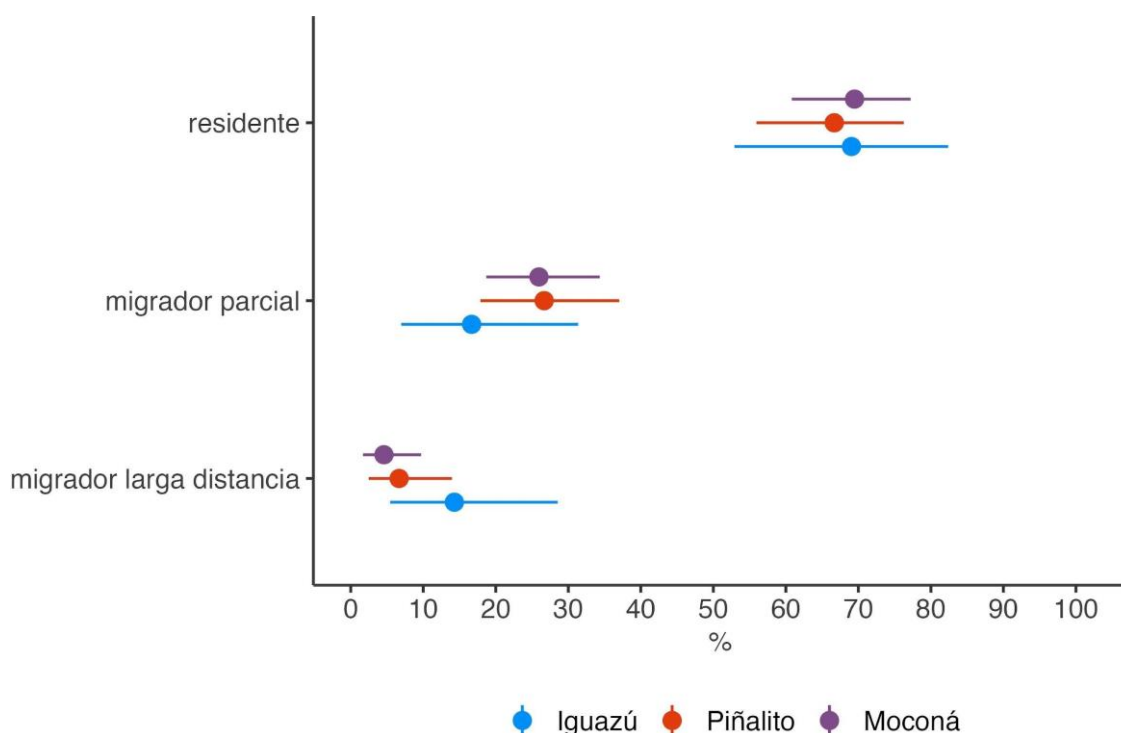


Fig. 12. Porcentaje de aves según el estatus migratorio en Parque Nacional Iguazú, Parque Provincial Piñalito y Parque Provincial Moconá.

3. Circulación de los alfavirus

La seroprevalencia global para el VMAD fue del 0,4% (3/722; IC 95% [0,09-1,21]) mientras que para el VMAY fue del 1,6% (7/438; IC 95% [0,64-3,27]). Para el VRN no se registraron animales seropositivos en ningún ANP (0/455).

En las aves se detectaron AcNT para VMAD en *Tachyphonus coronatus* (3,45%; 1/29) solo en el PPP. Mientras que, en roedores, *Akodon montensis* fue la única especie en la que se detectaron AcNT para el VMAD (0,48%; 2/412) y para el VMAY (1,79%; 7/391). (Tabla 2; Anexo: Tabla 2).

Los sueros de animales con AcNT para el VMAY fueron sometidos a análisis para descartar posibles cruces serológicos con el virus Una (VUNA), dado que ambos pertenecen al mismo complejo antigénico (Semlinki forest). Sin embargo, debido a la pequeña cantidad de sangre recolectada, sólo pudo realizarse en una muestra del PPP y PNI. Los resultados de ambas muestras fueron negativos para la presencia de AcNT contra el VUNA.

Tabla 2. Título de AcNT para los virus MAY y MAD en roedores y aves colectados en ANP.

Orden	Familia	Especie	Sitio	Campaña	Virus	Título*
Rodentia	Cricetidae	<i>Akodon montensis</i>	PPCC	4/2021	MAD	20
			PPP	4/2021	MAD	10
				4/2021	MAY	10
				4/2021	MAY	10
				2/2022	MAY	10
			PNI	4/2022	MAY	20
				11/2022	MAY	20
			PPU	6/2021	MAY	20
				12/2021	MAY	10
Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	PPP	11/2021	MAD	20

*los resultados son expresados como la recíproca del título de anticuerpos

La baja prevalencia y el tamaño muestral no permiten realizar análisis estadísticos para valorar la diferencia en la circulación viral entre ANP o especies. A pesar de estas limitaciones, se observó similar circulación de los virus en los diferentes sitios, ya que los intervalos de confianza de la seroprevalencia se solapan (Fig. 13). La mayor prevalencia hallada corresponde al VMAY en roedores del PNI (4%; 2/50; IC 95% [0,49-13.71]).

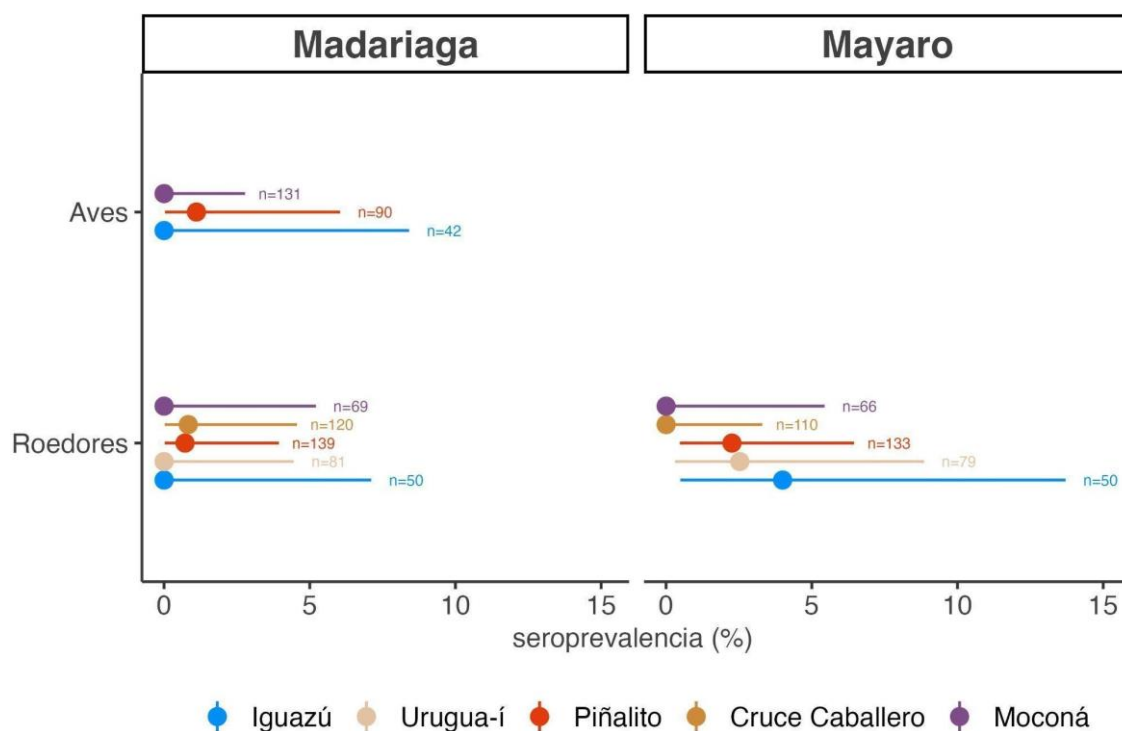


Fig. 13. Seroprevalencia del VMAD y VMAY en roedores y aves en las ANP.

Es posible hacer el análisis del patrón de circulación entre distritos biogeográficos considerando la exposición para al menos uno de los virus en cada evento de muestreo. De igual manera, se puede evaluar si las especies de mayor tamaño son las más expuestas a picaduras. Teniendo esto en cuenta, los resultados indicaron que la exposición de los hospedadores a los virus estudiados no estuvo influenciada con la unidad biogeográfica de residencia ($\chi^2= 0,433$; gl= 716; p= 0,51). Tampoco hay una relación entre el tamaño del hospedador y la probabilidad de exposición ($\chi^2= 0,97$; gl= 716; p= 0,33).

Discusión

En las últimas décadas se ha observado un incremento y resurgimiento a nivel mundial de enfermedades transmitidas por arbovirus (Weaver & Reisen, 2010). A pesar de su impacto en la salud pública y alcance geográfico, aún no se comprenden del todo las características epidemiológicas de estos arbovirus en muchas regiones de América, incluyendo Argentina. Este trabajo contribuye al conocimiento sobre la ocurrencia de los ciclos de transmisión del VMAD, VRN y VMAY en el Corredor Verde Misionero. Aportando evidencia sobre la capacidad de las provincias biogeográficas de selvas mixtas y de Bosque de Araucaria para el mantenimiento de los virus MAD y MAY. A su vez, identifica especies de roedores y aves que merecen mayor atención como potenciales hospedadores de los ciclos selváticos para estos alfavirus.

La encuesta serológica realizada en las aves y roedores del Corredor Verde Misionero reveló la presencia de actividad viral enzoótica de VMAD y VMAY, ya que se detectaron animales seropositivos en todas las ANP a excepción del Parque Provincial Moconá. Específicamente, se detectaron AcNT para VMAD en aves y roedores en los Parques Provinciales Piñalito y Cruce Caballero, y AcNT para VMAY en roedores de los Parques Piñalito, Iguazú y Urugua-í. Sin embargo, la seroprevalencia global fue baja, con títulos iguales o inferiores a 1/20. Esto sugiere diversas posibilidades, como una reciente introducción del virus en la zona, que no se encuentren circulando activamente en la región al momento del estudio o que estén circulando en áreas no muestreadas. A su vez puede significar una baja tasa de transmisión o una alta tasa de recuperación entre los individuos infectados si la vida media de los AcNT es corta (Gilbert *et al.*, 2013). Estos hallazgos serían consistentes con los resultados previamente obtenidos por Flores *et al.* (2019), quienes encontraron pocas aves seropositivas en el Parque Nacional Iguazú para VMAD, con una seroprevalencia de 0,54% en 2015 y 0,62% en 2016. Esto sugiere que el no haber hallado aves y roedores seropositivos para VMAD en PNI, estaría más vinculado a la poca cantidad de muestras analizadas en este parque, más que a la ausencia de circulación del VMAD.

Todos los roedores con AcNT tanto para VMAD como para VMAY, pertenecían a la especie *Akodon montensis*, la cual se caracteriza por su dispersión limitada, lo que refleja su estatus residente (Soria *et al.*, 2021). Esto indica que los roedores fueron infectados por vectores locales, evidenciando que los ciclos enzoóticos de VMAD y

VMAY ocurrirían localmente. En cuanto a las aves, *T. coronatus* fue la única especie con AcNT para VMAD. Esta especie se considera parcialmente migratoria, lo que significa que una minoría de la población realiza migraciones a largas distancias, mientras que la mayor parte de la población experimenta migraciones a corta distancia (Tobias *et al.*, 2022), sin embargo información detallada sobre los patrones de movimientos en Misiones aún se desconocen. Esto sugiere que si la especie *T. coronatus* fuera un hospedador competente para el VMAD, podría facilitar la introducción y dispersión del virus. Este hallazgo representa un aporte significativo al posible rol de las aves en el ciclo del VMAD. En conjunto, estos datos respaldan la presencia de los virus MAD y MAY en la región del Corredor Verde Misionero.

Si bien en este estudio no se encontraron AcNT contra VRN, no se puede descartar que esté circulando en el Corredor Verde misionero, ya que estudios previos han encontrado AcNT en esta región (Contigiani *et al.*, 1993; Cámara *et al.*, 2003; Pisano *et al.*, 2012). Se requieren futuros estudios al respecto sobre la extensión de la idoneidad para la circulación de VRN en el NEA. Por ejemplo, estudios que consideren la similitud de las comunidades de hospedadores y vectores en los ecosistemas de la región del NEA, así como la realización de encuestas serológicas con mayor esfuerzo de muestreo.

La vigilancia epidemiológica, incluyendo actividades como el monitoreo de la actividad viral en comunidades de hospedadores a través de encuestas serológicas, es fundamental para la prevención de enfermedades zoonóticas. Especialmente cuando el conocimiento sobre la presencia de un arbovirus y los componentes para su mantenimiento es limitado. En el caso de los virus VMAD y VMAY, la vigilancia es crucial, ya que no existía evidencia empírica sobre la posibilidad de que VMAY se mantuviera en el territorio argentino (Díaz *et al.*, 2003, 2007; Jean *et al.*, 2013; Beranek *et al.*, 2024) y la información sobre el VMAD es escasa. Cabe destacar que, aunque el VMAY no ha sido detectado en Argentina hasta la fecha, sí se ha registrado en Brasil, donde ha aumentado su actividad en zonas rurales y ha provocado numerosos brotes en seres humanos (Esposito & Fonseca, 2017). Un claro ejemplo de la importancia de sostener la vigilancia epidemiológica de virus mantenidos en ciclos selváticos es la actual epizootia de VEEO en Argentina. El último registro de este virus ocurrió durante el verano de 1988-89 (Sabattini *et al.*, 1998), y las actividades de vigilancia y vacunación en equinos fueron paulatinamente relajándose. El VEEO reapareció a fines del 2023 con una alarmante mortandad de equinos en 18 provincias de Argentina y casos humanos confirmados (Ministerio de Salud de la

Argentina, Alerta Epidemiológica: Encefalitis Equina del Oeste en equinos SE48/2023). Esta reaparición del virus después de 35 años refuerza la necesidad de mantener una vigilancia constante para detectar, prevenir y controlar a tiempo la reemergencia de enfermedades.

El Corredor Verde Misionero, es un lugar que por su gran biodiversidad representa un hábitat idóneo para el mantenimiento de patógenos, muchos de ellos posiblemente desconocidos a nivel local o global. Este fenómeno, donde la biodiversidad actúa como fuente de diversidad de patógenos, ha sido descrito por Keesing *et al.* (2010). Dentro de estas ANP se encuentran especies que podrían ser potenciales vectores para estos virus, las cuales presentan diferentes niveles de antropofilia. El estudio de Brivido *et al.* (2023) identificó mosquitos de los géneros *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Haemagogus* y *Culex* entre otros, los cuales son potenciales vectores de estos virus. Sin embargo, se requieren estudios específicos para confirmar su rol en los ciclos de mantenimiento de estos alfavirus en la naturaleza y como vectores puente a los seres humanos y animales domésticos. Es importante destacar que las ANP prospectadas en esta investigación no son entornos totalmente prístinos, que las muestras fueron recolectadas en los senderos para visitantes y que el vecindario de estos parques es un mosaico donde se desarrollan diferentes actividades agroforestales. Por lo tanto, estos sitios configuran escenarios donde los virus MAY y MAD podrían saltar a los humanos y animales domésticos. Este riesgo se ve incrementado por la afluencia de turistas, el personal de los parques, las poblaciones que residen en los límites de las ANP y sus animales. Estas condiciones configuran un escenario propicio para el salto interespecífico y la potencial emergencia de enfermedades por estos patógenos (Muehlenbein & Ancrenaz, 2009; Keesing *et al.*, 2010).

A pesar de que el VMAY no está genéticamente relacionado al virus de fiebre amarilla (VFA), comparten numerosas similitudes en cuanto a su propagación y epidemiología. Ambos virus afectan principalmente a personas que ingresan a regiones boscosas y selváticas, pudiendo infectar a diversas especies de primates no humanos. Existe la preocupación de que VMAY pueda seguir una trayectoria similar a la de VFA, el cual se ha vuelto más frecuente en el sur de Brasil, por lo que podrían esperarse epidemias del VMAY de una escala similar a las registradas en la región amazónica en el sur del Bosque Atlántico (Caicedo *et al.*, 2021). Las investigaciones sobre VFA pueden proporcionar valiosas lecciones para comprender y abordar la propagación de VMAY. Se ha demostrado que el VMAY puede ser transmitido por *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

al igual que el VFA (Smith & Francy, 1991; Mitchell, 1991; Long *et al.*, 2011), aumentando la posibilidad de transmisión del VMAY en el entorno urbano. La amplia distribución de estos mosquitos en Argentina, junto con la exposición de turistas a vectores selváticos en las ANP de Misiones, configura un escenario preocupante para el ingreso del virus a zonas urbanas, lo que podría desencadenar la eventual emergencia del VMAY en el país. Aunque esta expansión podría estar limitada por la baja competencia vectorial de las poblaciones de *Aedes aegypti* en Argentina, ya que Beranek *et al.* (2024) hallaron que las poblaciones de este mosquito en Buenos Aires, Córdoba y Rosario son menos competentes de lo esperado para transmitir el genotipo L del VMAY. Es necesario realizar futuras investigaciones para evaluar la competencia vectorial con otros genotipos del VMAY y poblaciones de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* del noreste de Argentina.

Particularmente el PNI representa un sitio potencial de riesgo para el ingreso de nuevas cepas/variantes/genotipos que enriquezcan la población del VMAY en el compartimiento selvático, así como para el *spillover* de VMAY al ciclo urbano. En la encuesta serológica la mayor prevalencia VMAY correspondió al PNI, aunque sin certeza estadística sobre la diferencia en la magnitud de circulación con las otras ANP. De todas maneras, el PNI tiene un considerable flujo de visitantes, con un crecimiento exponencial de la actividad turística, y es un centro turístico de interés tanto nacional como internacional, lo que sugiere que la intensa actividad turística podría facilitar la interacción entre turistas susceptibles y los vectores del virus en esta área, así como para la dispersión del VMAY a través de visitantes virémicos. Teniendo en cuenta los resultados de esta encuesta, se plantea la necesidad de promover la vigilancia y control por parte de las autoridades de salud pública y de las direcciones de áreas protegidas. Así mismo, se destaca la importancia de mejorar la recopilación de datos epidemiológicos y la vigilancia de enfermedades emergentes en entornos naturales donde los determinantes para el *spillover* estarían configurados.

El VMAY al formar parte del complejo de Semliki puede presentar reactividad cruzada con otros virus del complejo, como el virus UNA. Este último se encuentra ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales de América Central y Sur, incluyendo el NEA y NOA de Argentina (Sabattini *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2007; Jean *et al.*, 2013). Para descartar este posible cruce se hizo pruebas de seroprevalencia cruzada con el VUNA, si bien no se pudo realizar con los 7 animales

positivos para VMAY, los resultados negativos en dos de ellos sugieren la ausencia de reactividad cruzada en estos casos particulares, aunque no debe descartarse por completo.

A partir de los análisis ANOSIM y NMDS realizados sobre los roedores muestreados, se observó que el ensamble de especies entre las diferentes ANP aparentemente no divergen notoriamente, lo que indica homogeneidad en términos de dominancia y composición de especies. Esta uniformidad podría explicarse por la similitud fisonómica y ecológica de los sitios muestreados. Las cinco ANP se ubican en la región subtropical del noreste de Argentina, caracterizada por climas y hábitats similares, por lo que hay baja variación ambiental donde predominan principalmente bosques mesófilos y selvas misioneras (Arana *et al.*, 2021). A su vez, la fragmentación y la pérdida de vegetación nativa, está llevando a una pérdida de diversidad, lo que podría estar contribuyendo a la homogeneización de las comunidades de roedores (García, 2018).

Las comunidades de aves muestreadas presentan aparentes diferencias entre ANP, pero no entre distritos biogeográficos. El ensamble de aves migratorias fue diferente entre las ANP, esto se ve reflejado en que en el PPM y PPP las aves dominantes fueron *Tachyphonus coronatus* y *Trichothraupis melanops*, mientras que *Turdus amaurochalinus* fue la especie dominante de los muestreos del PNI. De todas maneras, corresponde ser cautelosos dado la pérdida de datos de campo durante este proyecto. Esto limitó la posibilidad de ejecutar un marco analítico que respalde si la composición de las especies analizadas en la encuesta serológica reflejó la composición de hospedadores en las ANP.

Ciertas características de *Akodon montensis*, como su alta abundancia, susceptibilidad a la infección natural y capacidad de adaptación a diversos entornos (Kuno & Chang, 2005, Keesing *et al.*, 2010), sugieren proponer esta especie como un potencial hospedador de mantenimiento de los virus MAD y MAY. La presencia de AcNT contra ambos virus en esta especie, junto con la predominancia de *Akodon montensis* en todas las ANP muestreadas, representando el 88% de los roedores capturados, refuerzan la idea que esta especie participa en los ciclos enzoóticos de estos alfavirus. El rol de los roedores en los ciclos enzoóticos de estos alfavirus también fue expuesto a través de encuestas serológicas (Vittor *et al.*, 2016; Esposito & Fonseca, 2017). Esta alta abundancia coincide con estudios ecológicos previos hechos en Brasil y en la provincia de Misiones, donde se indica que *Akodon montensis* es una especie abundante en comparación de otras especies

de roedores sigmodontinos, tanto en hábitats naturales como disturbados del Bosque Atlántico (Cirignoli *et al.*, 2011; Galiano *et al.*, 2013; García 2018).

También es importante considerar que este trabajo permitió ampliar el rango de hospedadores susceptibles al VMAY. Hasta el momento las familias de roedores *Echimyidae*, *Dasyproctidae*, *Erethizontidae*, *Cuniculidae* cuentan con información serológica para proponerlas como hospedadores de mantenimiento (Celone *et al.*, 2021) y aquí se incluye el primer registro de un cricétido como potencial hospedador. Además, los géneros de primates no humanos, marsupiales y xenartros implicados como hospedadores del VMAY (Celone *et al.*, 2021) co-ocurren en las ANP donde el VMAY fue prevalente (Categorización de Mamíferos de Argentina). Por lo tanto, en las 5 ANP el componente de hospedadores de la red transmisión del VMAY indicaría la idoneidad para el mantenimiento enzoótico del virus.

Conclusión

Si bien el estudio presenta limitaciones por el tamaño de la muestra, el desbalance temporal y espacial, los resultados obtenidos proporcionan información valiosa sobre la epidemiología de los virus MAD y MAY en las poblaciones de animales silvestres estudiados. Esta información puede ser utilizada para el diseño de estrategias de control y prevención, que aborden las problemáticas de la salud humana y animal desde el enfoque de una única salud. La presencia de estos virus en esta región con gran actividad de ecoturismo donde los visitantes están expuestos a vectores selváticos implica un alto riesgo de transmisión a humanos y animales domésticos, lo que enfatiza la necesidad de la vigilancia de los casos febriles indiferenciados (Marcondes *et al.*, 2017). Esto se debe al subdiagnóstico de casos de encefalitis y fiebre de Mayaro, ya que al presentar síntomas muy similares a otras enfermedades producidas por arbovirus como el dengue, son clínicamente indistinguibles unas de otras, lo que lleva a un subregistro de casos. Se recomienda realizar estudios adicionales para comprender mejor la dinámica de transmisión de estos alfavirus, incluyendo la identificación de vectores y hospedadores, la caracterización de la circulación viral en otras áreas y la evaluación del riesgo para la salud del personal de las ANP, gendarmes, colonos y chacareros del Corredor Verde Misionero.

Referencias bibliográficas

- AGUILAR, P. V., S. PAESSLER, A. S. CARRARA, S. BARON, J. POAST, E. WANG, A. C. MONCAYO, M. ANISHCHENKO, D. WATTS, R. B. TESH & S. C. WEAVER. 2005. Variation in interferon sensitivity and induction among strains of eastern equine encephalitis virus. *Journal of virology*, 79(17), 11300-11310.
- AGUILAR, P. V., J. G. ESTRADA-FRANCO, R. NAVARRO-LOPEZ, C. FERRO, A. D. HADDOW & S. C. WEAVER. 2011. Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: hidden under the dengue umbrella. *Future virology*, 6(6), 721-740.
- AGUILAR-LUIS, M. A., J. DEL VALLE-MENDOZA, I. SANDOVAL, W. SILVA-CASO, F. MAZULIS, H. CARRILLO-NG, Y. TARAZONA-CASTRO, J. MARTINS-LUNA, R. AQUINO-ORTEGA, I. PEÑA-TUESTA, A. CORNEJO-TAPIA & L. J. DEL VALLE. 2021. A silent public health threat: emergence of Mayaro virus and co-infection with Dengue in Peru. *BMC Research Notes*, 14, 1-7.
- AMBROSINI, S., C. GALLIARI & O. VACCARO. 1986. Informe Grupo Mamíferos. Plan de Relevamiento Faunístico y Florístico de la Cuenca del Arroyo Urugua-í, Misiones. Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables de la Provincia de Misiones y Electricidad de Misiones Sociedad Anónima en Convenio con el Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires
- ANDERSON, C. B., W. G. DOWNS, G. H. WATTLBY, N. W. AHIN & A. A. BEESB. 1957. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, BWI. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6).
- ANYAMBA, A., K. J. LINTHICUM, J. L. SMALL, K. M. COLLINS, C. J. TUCKER, E. W. PAK, S. C. BRITCH, J. R. EASTMAN, J. E. PINZON & K. L. RUSSELL. 2012. Climate teleconnections and recent patterns of human and animal disease outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), e1465.
- ARANA, M. D., E. S. NATALE, N. E. FERRETTI, G. M. ROMANO, A. J. OGGERO, A., G. MARTÍNEZ, P. E. POSADAS & J. J. MORRONE. 2021. Esquema biogeográfico de la República Argentina. *Opera Lilloana*, 56, 1-238
- ARRIGO, N. C., A. P. ADAMS & S. C. WEAVER. 2010. Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *Journal of Virology*, 84(2), 1014-1025.

- AUGUSTE A. J., J. LIRIA, N. L. FORRESTER, D. GIAMBALVO, M. MONCADA, K. C. LONG, D. MORON, N. DE MANZIONE, R. B. TESH, E. S. HALSEY, J. K. TEDEUSZ, R. HERNANDEZ, J. C. NAVARRO & S. C. WEAVER. 2015. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1742.
- AZAR, S. R., R. K. CAMPOS, N. A. BERGREN, V. N. CAMARGOS & S. L. ROSSI. 2020. Epidemic alphaviruses: ecology, emergence and outbreaks. *Microorganisms*, 8(8), 1167.
- BELLARD, C., C. LECLERC, B. LEROY, M. BAKKENES, S. VELOZ, W. THUILLER & F. COURCHAMP. 2014. Vulnerability of biodiversity hotspots to global change. *Global Ecology and Biogeography*, 23(12), 1376-1386.
- BETTINOTTI, C. M. 1957. Incidencia de anticuerpos fijadores de complemento para virus de encefalitis (cuatro especies diferentes) en la población general de Córdoba. Buenos Aires. *Sem. méd.(B. Aires)*, 110, 393-409.
- BETTINOTTI, C. M. & H. AGUIRRE. 1960. Aislamiento del virus de la encefalomielitis tipo "este" en un equino en Córdoba (RA). *Gaceta Veterinaria* 22:182-187.
- BERANEK, M. D., O. GIAYETTO, S. FISCHER & A. DIAZ. 2024. Assessment of Mayaro virus vector competence of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) populations in Argentine using dose–response assays. *Medical and Veterinary Entomology*.
- BERTOLINI, M. & G. GIL. 1999. Plan de manejo del Parque Provincial Urugua-í.
- BERTOLINI, M. 1999a. Plan de Manejo del Parque Provincial Moconá.
- BERTOLINI, M. 1999b. Plan de Manejo del Parque Provincial Cruce Caballero. Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, Gobierno de la Provincia de Misiones. 121p.
- BICCA-MARQUES, J. C. & D. S. DE FREITAS. 2010. The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health. *Tropical Conservation Science*, 3(1), 78-89.
- BRIVIDORO, M. V., E. MUTTIS, I. AGOSTINI, M. V. MICIELI & L. B. TAURO. 2023. Diversidad de mosquitos (Diptera, Culicidae) en áreas de importancia epidemiológica en el Bosque Atlántico del Alto Paraná de Misiones, Argentina. *Ecología Austral*, 33(2), 314-324.

- BROOKS, M. E., K. KRISTENSEN, K. J. VAN BENTHEM, A. MAGNUSSON, C. W. BERG, A. NIELSEN, H. J. SKAUG, M. MAECHLER & B. M. BOLKER. 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R journal*, 9(2), 378-400.
- BROWN, A. D. & G. E. ZUNINO. 1994. Hábitat, densidad y problemas de conservación de los primates de Argentina. *Vida Silvestre Neotropical* 3(1):30-40.
- CABRERA, A. L. 1976. Regiones fitogeográficas de la República Argentina. Editorial ACME, Buenos Aires.
- CABRERA, A. & A. WILLINK. 1980. Biogeografía de América Latina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Serie de Biología. Monografía, (13).
- CAICEDO, E. Y., K. CHARNIGA, A. RUEDA, I. DORIGATTI, Y. MENDEZ, A. HAMLET, J. P. CARRERA & Z. M. CUCUNUBÁ. 2021. The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(6), e0009418.
- CÁMARA A. 1997. Tesis Doctoral: Encefalitis Equina Venezolana. Estudios comparativos seroepidemiológicos, biológicos y antigénicos de dos cepas enzoóticas del subtipo VI. [s.n.]. Universidad Nacional de Córdoba.
- CÁMARA, A., G. DÍAZ, V. VEGA, M. BASUALDO, & M. CONTIGIANI. 2003. Seroprevalence of antibodies to Venezuelan equine encephalitis complex (subtypes IAB and VI) in humans from General Belgrano Island, Formosa, Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45, 201-204.
- CARDOZO, F., B. KONIGHEIM, G. ALBRIEU-LLINÁS, M. E. RIVAROLA, J. AGUILAR, A. ROJAS, A. I. QUAGLIA, M. PÁEZ, Y. GUILLÉN, A. DÍAZ, M. A. VALLEJOS, L. HEREBIA, M. L. RECALDE, M. S. CONTIGIANI & L. MENDOZA. 2018. Alphaviruses: serological evidence of human infection in Paraguay (2012–2013). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(5), 266-272.
- CARRARA, A. S., G. GONZALES, C. FERRO, M. TAMAYO, J. ARONSON, S. PAESSLER, M. ANISHCHENKO, J. BOSHELL & S. C. WEAVER. 2005. Venezuelan equine encephalitis virus infection of spiny rats. *Emerging infectious diseases*, 11(5), 663.
- CARRERA, J. P., N. FORRESTER, E. WANG, A. Y. VITTOR, A. D. HADDOW, S. LÓPEZ-VERGÈS & S. C. WEAVER. 2013. Eastern equine encephalitis in Latin America. *New England Journal of Medicine*, 369(8), 732-744.

- CELONE, M., B. OKECH, B. A. HAN, B. M. FORSHEY, A. ANYAMBA, J. DUNFORD, G. RUTHERFORD, N. K. MITA-MENDOZA, E. L. ESTALLO, R. KHOURI, I. C. DE SIQUEIRA & S. POLLETT. 2021. A systematic review and meta-analysis of the potential non-human animal reservoirs and arthropod vectors of the Mayaro virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(12), e0010016.
- CHEBEZ, J. C. 2005. Guía de las reservas naturales de la Argentina: nordeste (Vol. 3). Editorial Albatros.
- CIRIGNOLI, S., C. A. GALLIARI, U. F. PARDIÑAS, D. H. PODESTÁ & R. ABRAMSON. 2011. Mamíferos de la Reserva Valle del Cuña Pirú, Misiones, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 18(1), 25-43.
- CONTIGIANI, M. S., M. DE BASUALDO, A. CÁMARA, A. RAMÍREZ, G. DÍAZ, D. GONZÁLEZ, S. MEDEOT & D. OSUNA. 1993. Presencia de anticuerpos contra el virus de la encefalitis equina venezolana subtipo VI en pacientes con enfermedad aguda febril. *Revista Argentina de Microbiología*, 212-20.
- CRESPO, J. A. 1954. Presence of the reddish howling monkey (*Alouatta guariba clamitans* Cabrera) in Argentina. *Journal of Mammalogy*, 35(1), 117-118.
- DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM & A. D. HYATT. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443-449.
- DE SOUZA COSTA, M. C., L. S. MAIA, V. C. DE SOUZA, A. M. GONZAGA, V. C. DE AZEVEDO, L. R. MARTINS, J.H. CHÁVEZ PAVONI, F. G. NAVECA & R. D. SLHESSARENKO. 2019. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. *Acta Tropica*, 190, 395-402.
- DÍAZ, L. A., L. I. SPINSANTI, W. R. ALMIRÓN & M. S. CONTIGIANI. 2003. UNA virus: first report of human infection in Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45, 109-110.
- DÍAZ, L. A., M. DEL PILAR DÍAZ, W. R. ALMIRÓN & M. S. CONTIGIANI. 2007. Infection by UNA virus (Alphavirus; Togaviridae) and risk factor analysis in black howler monkeys (*Alouatta caraya*) from Paraguay and Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(10), 1039-1041.
- DÍAZ, L. A. & D. VEZZANI. 2016. ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS. En: Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomón OD, Schweigmann N, editors. *Investigaciones sobre*

- mosquitos de Argentina. Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata; 2016. p. 156–221.
- DI BITETTI, M. S., G. PLACCI., & L. A. DIETZ. 2003. Una Visión de Biodiversidad para la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un Paisaje para la Conservación de la Biodiversidad y prioridades para las acciones de conservación. World Wildlife Fund, 154.
- DORAI-RAJ, S. 2014. binom: Binomial confidence intervals for several parameterizations. R package version 1.1-1. <https://CRAN.R-project.org/package=binom>
- EARLEY, E., P. H. PERALTA & K. M. JOHNSON. 1967. A plaque neutralization method for arboviruses. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 125(3), 741-747.
- ESPÓSITO, C. C. 2004. Parque Provincial Moconá. diagnóstico para su desarrollo turístico. Tesis de licenciatura en Turismo. Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires. 119pg.
- ESPOSITO, D. L. A. & B. A. L. D. FONSECA. 2017. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 21, 540-544.
- FIGUEIREDO, M. L. G. D. & L. T. M. FIGUEIREDO. 2014. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 47, 677-683.
- FLORES F. S., B. KONIGHEIM, J. AGUILAR, O. SALOMÓN, M. CONTIGIANI. 2017. Detección de arbovirosis (Alphavirus y Flavivirus) en aves silvestres del Parque Nacional Iguazú, Misiones, Argentina. XII Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-46701-0-6.
- GALIANO, D., B. B. KUBIAK, J. R. MARINHO & T. R. O. DE FREITAS. 2013. Population dynamics of *Akodon montensis* and *Oligoryzomys nigripes* in an Araucaria forest of Southern Brazil. Mammalia, 77(2), 173-179.
- GARCÍA, G. V. 2018. Efecto de las plantaciones de pino sobre la diversidad y composición de un ensamble de micromamíferos no voladores del Bosque Atlántico del Alto Paraná en el norte de la provincia de Misiones, Argentina (Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- GARTLAND, M. 1984. Los rodales semilleros nativos de *Araucaria angustifolia* en la provincia de Misiones. III Jornadas Técnicas Bosque Implantados (Silvicultura). El Dorado, Argentina, 3-5.

- GIL, L. H., T. MAGALHAES, B. S. SANTOS, L. V. OLIVEIRA, E. F. OLIVEIRA-FILHO, J. L. CUNHA, & E. A. COSTA. 2021. Active circulation of madariaga virus, a member of the eastern equine encephalitis virus complex, in northeast Brazil. *Pathogens*, 10(8), 983.
- GILBERT, A. T., A. R. FOOKS, D. T. S. HAYMAN, D. L. HORTON, T. MÜLLER, R. PLOWRIGHT, A. J. PEEL, R. BOWEN, J. L. N. WOOD, J. MILLS, A. A. CUNNINGHAM & C. E. RUPPRECHT. 2013. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. *EcoHealth*, 10, 298-313.
- GO, Y. Y., U. B. BALASURIYA, & C. K. LEE. 2014. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and experimental vaccine research*, 3(1), 58-77.
- GONZALEZ-ESCOBAR, G., C. CHURAMAN, C. RAMPERSAD, R. SINGH & S. NATHANIEL. 2021. Mayaro virus detection in patients from rural and urban areas in Trinidad and Tobago during the Chikungunya and Zika virus outbreaks. *Pathogens and Global Health*, 115(3), 188-195.
- GOULD, E., J. PETTERSSON, S. HIGGS, R. CHARREL & X. DE LAMBALLERIE. 2017. Emerging arboviruses: why today?. *One health*, 4, 1-13.
- GRIFFIN, D. E. 2013. Alphaviruses. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 1, pp. 652–686.
- GUBLER, D. J. 2001. Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951(1), 13-24.
- GUZMÁN, C., A. CALDERÓN, S. MATTAR, L. TADEU-FIGUEREIDO, J. SALAZAR-BRAVO, N. ALVIS-GUZMÁN, E. ZAKZUK MARTINEZ & M. GONZÁLEZ, M. 2020. Ecoepidemiology of alphaviruses and flaviviruses. In *Emerging and reemerging viral pathogens*, pp. 101-125. Academic Press.
- HASSING, R. J., I. LEPARC-GOFFART, S. N. BLANK, S. THEVARAYAN, H. TOLOU, G. VAN DOORNUM & P. J. VAN GENDEREN. 2010. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. *Journal of Infection*, 61(4), 343-345.
- HOCH, A. L., N. E. PETERSON, J. W. LEDUC & F. P. PINHEIRO. 1981. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. *The American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(3), 689-698.
- HOLZ, S., & G. PLACCI. 2003. Socioeconomic roots of biodiversity loss in Misiones. *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook*, 207-226.

- INCHAUSTI, P. 2023. *Statistical Modeling With R: a dual frequentist and Bayesian approach for life scientists*. Oxford University Press.
- JEAN, A., A. FARÍAS, M. CACACE, B. PISANO, B. KONIGHEIM, J. AGUILAR & J. A. NOELIA. 2013. Artículo original Estudios serológicos de Virus Una y Mayaro (Alphavirus), en humanos de la localidad de Orán, Salta Argentina.
- JONES, K. E., N. G. PATEL, M. A. LEVY, A. STOREYGARD, D. BALK, J. L. GITTLEMAN & P. DASZAK. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- KEESING, F., L. K. BELDEN, P. DASZAK, A. DOBSON, C. D. HARVELL, R. D. HOLT, P. HUDSON, A. JOLLES, K. E. JONES, C. E. MITCHELL, S.S. MYERS, T. BOGICH, & R. S. OSTFELD. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647-652.
- KAHN, L. H., B. KAPLAN & T. P. MONATH. 2009. One health'in action series: nos 1-8.
- KULLOCK D., A. ISARRÍA, H. CIVELLI, M. JAGER, G. MEITÍN & C. FORTE. 2006. *Geo Argentina 2004: Perspectivas del medio ambiente en Argentina*. Buenos Aires, Argentina: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación.
- KUNO, G., & G. J. J. CHANG. 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 608-637.
- LEQUIME, S., R. E. PAUL & L. LAMBRECHTS. 2016. Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS pathogens*, 12(5), e1005548.
- LEUNG, J. Y. S., M. M. L. NG & J. J. H. CHU. 2011. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Advances in virology*, 2011.
- LLAGONNE-BARETS, M., V. ICARD, I. LEPARC-GOFFART, C. PRAT, T. PERPOINT, P. ANDRÉ & C. RAMIÈRE. 2016. A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. *Journal of Clinical Virology*, 77, 66-68.
- LONG, K. C., S. A. ZIEGLER, S. THANGAMANI, N. L. HAUSSER, T. J. KOCHER, S. HIGGS & R. B. TESH. 2011. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(4), 750.
- LORENZ, C., A. F. RIBEIRO, & F. CHIARAVALLI-NEITO. 2019. Mayaro virus distribution in South America. *Acta tropica*, 198, 105093.
- MARCONDES, C. B., M. CONTIGIANI & R. M. GLEISER. 2017. Emergent and reemerging arboviruses in South America and the Caribbean: why so many and why now?. *Journal of medical entomology*, 54(3), 509-532.

- MARGALOT, J. A. 1985. Geografía de Misiones. Buenos Aires, 236 pp
- MAVIAN, C., B. D. RIFE, J. J. DOLLAR, E. CELLA, M. CICCOCCHI, M. C. PROSPERI, J. LEDNICKY, J. G. MORRIS, I. CAPUA & M. SALEMI. 2017. Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. *Scientific reports*, 7(1), 8718.
- MILLS, J. N., J. E. CHILDS, T. G. KSIAZEK, C. J. PETERS & W. M. VELLECA. 1998. Métodos para trapeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos.
- MITCHELL, C. J., T. P. MONATH, M. S. SABATTINI, C. B. CROPP, J. F. DAFFNER, C. H. CALISHER, W. L. JAKOB & H. A. CHRISTENSEN. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34(5), 945-955.
- MITCHELL, C. J. 1991. Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(3), 446-451.
- MONATH, T. P., M. S. SABATTINI, R. PAULI, J. F. DAFFNER, C. J. MITCHELL, G. S. BOWEN & C. B. CROPP. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. IV. Serologic surveys and sentinel equine program. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34(5), 966-975.
- MOTA, M. T. D. O., M. R. RIBEIRO, D. VEDOVELLO & M. L. NOGUEIRA. 2015. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future virology*, 10(9), 1109-1122.
- MOREIRA MARRERO, L., G. BOTTO NUÑEZ, S. FRABASILE & A. DELFRARO. 2022. Alphavirus Identification in Neotropical Bats. *Viruses*, 14(2), 269.
- MOURÃO, M. P. G., M. D. S. BASTOS, R. P. DE FIGUEIREDO, J. B. L. GIMAQUE, E. DOS SANTOS GALUSSO, V. M. KRAMER, C. M. COSTA DE OLIVIERA, F. GOMES NAVECA & L. T. M. FIGUEIREDO. 2012. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 42-46.
- MUEHLENBEIN, M. P., & M. ANCRENAZ. 2009. Minimizing pathogen transmission at primate ecotourism destinations: the need for input from travel medicine. *Journal of Travel Medicine*, 16(4), 229-232.

- MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G. A. DA FONSECA & J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- NEUMAYR, A., M. GABRIEL, J. FRITZ, S. GÜNTHER, C. HATZ, J. SCHMIDT-CHANASIT & J. BLUM. 2012. Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. *Emerging infectious diseases*, 18(4), 695.
- OKSANEN J., G. BLANCHET, R. KINDT, P. LEGENDRE, P. R. MINCHIN, R. B. O'HARA, G. L. SIMPSON, P. SÓLYMOS, M. H. H. STEVENS & H. WEEDON. 2022. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Organización mundial de la salud. 2020. Mayaro virus disease—French Guiana. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/mayaro-virus-disease—french-guiana-france>
- PALACIO, F. X., M. J. APODACA & J. V. CRISCI. 2020. Análisis multivariado para datos biológicos: teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R.
- PFEFFER, M., & G. DOBLER. 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & vectors*, 3(1), 35.
- PIANTADOSI, A. & S. KANJILAL. 2020. Diagnostic approach for arboviral infections in the United States. *Journal of clinical microbiology*, 58(12), 10-1128.
- PISANO, M. B., V. E. RÉ, L. A. DÍAZ, A. FARIAS, M. STEIN, M. P. SANCHEZ-SECO, A. TENORIO, W. R. ALMIRÓN & M. S. CONTIGIANI. 2010. Enzootic activity of pixuna and Rio Negro viruses (Venezuelan equine encephalitis complex) in a neotropical region of Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(2), 199-201.
- PISANO, M. B., L. I. SPINSANTI, L. A. DÍAZ, A. A. FARÍAS, W. R. ALMIRÓN, V. E. RÉ, & M. S. CONTIGIANI. 2012. First detection of Rio Negro virus (Venezuelan equine encephalitis complex subtype VI) in Córdoba, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 125-128.
- PISANO, M. B., G. ORIA, G. BESKOW, J. AGUILAR, B. KONIGHEIM, M. L. CACACE, M. STEIN, & M. S. CONTIGIANI. 2013. Venezuelan equine encephalitis viruses (VEEV) in Argentina: serological evidence of human infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(12), e2551.

- POWERS, A. M., M. S. OBERSTE, A. C. BRAULT, R. RICO-HESSE, S. M. SCHMURA, J. F. SMITH, W. KANG, W. P. SWEENEY & S. C. WEAVER. 1997. Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *Journal of virology*, 71(9), 6697-6705.
- R CORE TEAM. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- RALPH, C. J., G. R GEUPEL, P. PYLE, T. E. MARTIN, D. F. DESANTE, & B. MILÁ. 1996. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR159. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 46 p.
- RECEVEUR, M. C., M. GRANDADAM, T. PISTONE & D. MALVY. 2010. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. *Eurosurveillance*, 15(18), 19563.
- RÜCKERT, C., & G. D. EBEL. 2018. How do virus–mosquito interactions lead to viral emergence?. *Trends in parasitology*, 34(4), 310-321.
- RUPASINGHE, R., B. B. CHOMEL & B. MARTÍNEZ-LÓPEZ. 2022. Climate change and zoonoses: A review of the current status, knowledge gaps, and future trends. *Acta Tropica*, 226, 106225.
- SABATTINI, M. S., G. AVILES, & T. O. MONATH. 1998. Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. In *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries* (pp. 113-34).
- SERRA, O. P., B. F. CARDOSO, A. L. M. RIBEIRO, F. A. L. D. SANTOS & R. D. SLHESSARENKO. 2016. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111, 20-29.
- SILVA, M. L. C. R., A. J. AUGUSTE, A. C. B. TERZIAN, D. VEDOVELLO, F. RIET-CORREA, V. M. K. MACÁRIO, M. P. G. MOURÃO, L. S. ULLMANN, J. P. ARAÚJO JR, S. C. WEAVER & M. L. NOGUEIRA. 2017. Isolation and characterization of madariaga virus from a Horse in Paraíba State, Brazil. *Transboundary and emerging diseases*, 64(3), 990-993.
- SMICHOWSKI, H., & F. I. CONTRERAS. 2020. Seguimiento de la deforestación del bosque nativo en el departamento de Iguazú (Misiones, Argentina): Período

- 1985-2018. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. Instituto de Investigaciones Geográficas de la Patagonia; Párrafos Geográficos; 19; 1; 9-2020; 73-88
- SMITH, G. C., & D. B. FRANCY. 1991. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(1), 89-93.
- SORIA, C. D., M. PACIFICI, M. DI MARCO, S. M. STEPHEN & C. RONDININI. 2021. COMBINE: a coalesced mammal database of intrinsic and extrinsic traits. *Ecology* 102(6):e03344. 10.1002/ecy.3344
- SOTOMAYOR-BONILLA, J., C. A. ABELLA-MEDRANO, A. CHAVES, P. ÁLVAREZ-MENDIZÁBAL, Ó. RICO-CHÁVEZ, S. IBÁÑEZ-BERNAL, M. ROSTAL, R. OJEDA-FLORES, A. BARBACHANO-GUERRERO, G. GUTIÉRREZ-ESPELETA, A. AGUIRRE, P. DASZAK & G. SUZÁN. 2017. Potential sympatric vectors and mammalian hosts of Venezuelan equine encephalitis virus in Southern Mexico. *Journal of wildlife diseases*, 53(3), 657-661.
- STECHINA, O. S., G. I. ORIA, C. TORRES, L. A. DIAZ, M. CONTIGIANI, & M. STEIN. 2019. First detection of Madariaga virus in mosquitoes collected in a wild environment of Northeastern Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 916.
- THEILACKER, C., J. HELD, L. ALLERING, P. EMMERICH, J. SCHMIDT-CHANASIT, W. V. KERN & M. PANNING. 2013. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-4.
- TOBIAS, J. A., C. SHEARD, A. L. PIGOT, A. J. DEVENISH, J. YANG, F. SAYOL, ... & M. SCHLEUNING. 2022. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters*, 25(3), 581-597.
- VITTOR, A. Y., B. ARMIEN, P. GONZALEZ, J. P. CARRERA, C. DOMINGUEZ, A. VALDERRAMA, E. G. GLASS, D. BELTRAN, J. CISNEROS, E. WANG, A. CASTILLO, B. MORENO & S. C WEAVER. 2016. Epidemiology of emergent Madariaga encephalitis in a region with endemic Venezuelan equine encephalitis: initial host studies and human cross-sectional study in Darien, Panama. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(4), e0004554.
- WANG, E., S. PAESSLER, P. V. AGUILAR, D. R. SMITH, L. L. COFFEY, W. KANG, M. PFEFFER, J. OLSON, P. J. BLAIR, C. GUEVARA, J. ESTRADA-FRANCO &

- S.C. WEAVER. 2005. A novel, rapid assay for detection and differentiation of serotype-specific antibodies to Venezuelan equine encephalitis complex alphaviruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(6), 805-810.
- WANZELLER, A. L. M., F. S. DA SILVA, L. H. A. HERNÁNDEZ, L. J. L. BARROS, M. N. O. FREITAS, M. N. SANTOS, ... & E. V. P. DA SILVA. 2023. Isolation of Flaviviruses and Alphaviruses with Encephalitogenic Potential Diagnosed by Evandro Chagas Institute (Pará, Brazil) in the Period of 1954–2022: Six Decades of Discoveries. *Viruses*, 15(4), 935.
- WEAVER, S. C., & A. D. BARRETT. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 789-801.
- WEAVER, S. C., C. FERRO, R. BARRERA, J. BOSHELL, & J. C. NAVARRO. 2004. Venezuelan equine encephalitis. *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 141-174.
- WEAVER, S. C. 2013. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in microbiology*, 21(8), 360-363.
- WEAVER, S. C., & W. K. REISEN. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85(2), 328-345.
- WEST, G., D. HEARD & N. CAULKETT. 2014. *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*. John Wiley & Sons.
- WICKHAM, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York,
- YOUNG, N. A. & K. M. JOHNSON. 1969. Antigenic variants of Venezuelan equine encephalitis virus: their geographic distribution and epidemiologic significance. *American Journal of Epidemiology*, 89(3), 286-307.

Anexo

La variable respuesta del GLMM fue la exposición (valor 1) o no (valor 0) a al menos uno de los virus por NT en cada individuo analizado, de acuerdo a una distribución binomial de los errores. Las covariables incluidas fueron el distrito bigeográfico (ki) y el peso estandarizado de cada especie en referencia al promedio de las especies de roedores o de aves analizadas ($\square 1(\text{masa})$). La estructura anidada y desbalanceada en el diseño de muestreo fue incluida como factor aleatorio ($\alpha_j[i]$). (Fórmula 1)

Fórmula 1.

$$\begin{aligned} \text{Alphavirus}_i &\sim \text{Binomial}(n = 1, \text{prob}_{\text{Alphavirus}=1} = \hat{P}) \\ \log \left[\frac{\hat{P}}{1 - \hat{P}} \right] &= \alpha_{j[i],k[i]} + \beta_1(\text{masa}) \\ \alpha_j &\sim N \left(\mu_{\alpha_j}, \sigma_{\alpha_j}^2 \right), \text{ for muestreo:ANP } j = 1, \dots, J \\ \alpha_k &\sim N \left(\gamma_0^\alpha + \gamma_1^\alpha(\text{biogeo}_{\text{selvas mixtas}}), \sigma_{\alpha_k}^2 \right), \text{ for ANP } k = 1, \dots, K \end{aligned}$$

Tabla 1. Especies de aves analizadas de las ANP del Corredor Verde Misionero durante 2021 y 2022.

Familia	Especie	Nombre Común	N.º
Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Frutero coronado	29
Thraupidae	<i>Trichothraupis melanops</i>	Frutero corona amarilla	27
Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	Zorzal colorado	18
Turdidae	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Zorzal chalchalero	16
Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	Bailarín oliváceo	16
Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	Chingolo	13
Thraupidae	<i>Saltator similis</i>	Pepitero verdoso	11
Parulidae	<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	Arañero silbón	10
Thraupidae	<i>Coryphospingus cucullatus</i>	Brasita de fuego	8
Turdidae	<i>Turdus albicollis</i>	Zorzal collar blanco	7
Pipridae	<i>Pipra fasciicauda</i>	Bailarín naranja	6
Turdidae	<i>Turdus leucomelas</i>	Zorzal sabiá	6
Cardinalidae	<i>Cyanoloxia glaucocaerulea</i>	Reina mora chica	6
Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Yerutí gris	6
Icteridae	<i>Cacicus haemorrhous</i>	Boyero cacique	5
Momotidae	<i>Baryphthengus ruficapillus</i>	Yeruva	4
Parulidae	<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	Arañero cara negra	4
Furnariidae	<i>Sittasomus griseicapillus</i>	Tarefero	4
Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Batará negro	4
Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Bailarín azul	4
Conopophagidae	<i>Conopophaga lineata</i>	Chupadientes	4
Thraupidae	<i>Thlypopsis pyrrhocomma</i>	Pioro	4

Thamnophilidae	<i>Thamnophilus caeruleus</i>	Choca común	3
Tyrannidae	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Burlesco cola castaña	3
Furnariidae	<i>Lepidocolaptes squamatus</i>	Chincheru escamado	3
Tyrannidae	<i>Mionectes rufiventris</i>	Mosquero ladrillito	2
Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Benteveo	2
Thraupidae	<i>Sicalis flaveola</i>	Jilguero dorado	2
Tyrannidae	<i>Corythopsis delalandi</i>	Mosquero	2
Cardinalidae	<i>Habia rubica</i>	Fueguero morado	2
Parulidae	<i>Basileuterus culicivorus</i>	Arañero coronado chico	2
Furnariidae	<i>Syndactylarufosuperciliata</i>	Ticotico común	2
Furnariidae	<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	Trepador oscuro	2
Tyrannidae	<i>Myiarchus ferox</i>	Burlesco pico negro	1
Troglodytidae	<i>Troglodytes aedon</i>	Ratona común	1
Furnariidae	<i>Automolus leucophthalmus</i>	Ticotico ojo blanco	1
Tyrannidae	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Mosqueta ceja blanca	1
Thraupidae	<i>Poospiza ornata</i>	Monterita canela	1
Furnariidae	<i>Dendrocincla turdina</i>	Arapasu	1
Tyrannidae	<i>Piprites chloris</i>	Bailarín verde	1
Trogonidae	<i>Trogon rufus</i>	Surucua amarillo	1
Picidae	<i>Celeus galeatus</i>	Carpintero canela	1
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus doliatus</i>	Choca listada	1
Strigidae	<i>Glaucidium brasilianum</i>	Caburé chico	1
Thraupidae	<i>Haplospiza unicolor</i>	Afrechero plomizo	1
Tyrannidae	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Mosqueta corona parda	1
Tyrannidae	<i>Elaenia mesoleuca</i>	Fiofío oliváceo	1

Phylloscopidae	<i>Phylloscopus collybita</i>	Mosquitero común	1
Furnariidae	<i>Anabacerthialichtensteini</i>	Ticotico ocráceo	1
Cardinalidae	<i>Amaurospiza moesta</i>	Reina mora enana	1
Cardinalidae	<i>Cyanocompsa brissonii</i>	Reina mora grande	1
Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	Choca amarilla	1
Thraupidae	<i>Sicalisluteola</i>	Misto	1
Cuculidae	<i>Coccyzus melacoryphus</i>	Cuclillo canela	1
Tyrannidae	<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Picochato grande	1
Vireonidae	<i>Vireo olivaceus</i>	Vireo ojirrojo	1
Thraupidae	<i>Hemithraupis guira</i>	Saira Dorada	1
Thraupidae	<i>Saltator aurantiirostris</i>	Pepitero de collar	1
Fringillidae	<i>Chlorophonia cyanea</i>	Tangará bonito	1

Tabla 2. Seroprevalencia y cantidad de animales muestreados para VMAD y VMAY en cada ANP, durante 2021 y 2022.

Áreas naturales protegidas	Unidad Biogeográfica	VMAD (%)		VMAY (%)
		Roedores	Aves	Roedores
Parque Nacional Iguazú	Selvas mixtas	0 (0/50)	0 (0/42)	4 (2/50)
Parque Provincial Urugua-í	Selvas mixtas	0 (0/81)	-	2,53 (2/79)
Parque Provincial Piñalito	Bosque de Araucaria	0,72 (1/139)	1,11 (1/90)	2,26 (3/133)
Parque Provincial Cruce Caballero	Bosque de Araucaria	0,83 (1/120)	-	0 (0/110)
Parque Provincial Moconá	Selvas mixtas	0 (0/69)	0 (0/131)	0 (0/68)