

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA GENÉTICA A LA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA EN CABALLOS DE UNA ZONA ENDÉMICA DE LA
ARGENTINA**

Ana Gabriela Espasandin

**Tesis presentada a la Carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias como
requisito para acceder al grado de**

**DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE EN
CIENCIAS VETERINARIAS**

**Facultad de Ciencias Veterinarias
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**

Corrientes, Diciembre 2022

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA GENÉTICA A LA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA EN CABALLOS DE UNA ZONA ENDÉMICA DE LA
ARGENTINA**

Ana Gabriela Espasandin

Director de tesis Cipolini Galarza María Fabiana

Co-director Díaz Silvina

Jurado de Tesis:

.....

Dra. María Edith BARRANDEGUY

**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Facultad de Ciencias
Agrarias y Veterinarias Universidad del Salvador**

.....

Dra. Silvia Irene BOEHRINGER

Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE

.....

Dra. Cynthia Soledad CARAMELLO

Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico muy especialmente a mis hijos, mis grandes amores Vicente y Salvador, ellos son mis pilares y mi inspiración a seguir adelante. Agradezco a ellos cada día por acompañarme y entenderme en cada momento que no pude compartir con ellos para alcanzar mi meta. A mi esposo José quien con amor me acompañó y ayudó en distintas etapas del trabajo, y estuvo ahí para alentarme a no bajar los brazos y seguir adelante. A mis padres, mi gran ejemplo de vida, quienes me enseñaron que todo se puede con esfuerzo y amor a lo que queremos.

«El único modo de hacer un gran trabajo es amar lo que haces»

[Steve Jobs.](#)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis directoras María Fabiana Cipolini y Silvina Díaz quienes fueron mis motores, mis guías y apoyo en todo momento en este recorrido. A los veterinarios José Molinari y Juan Ignacio Beltrame quienes fueron de gran ayuda para la obtención de las muestras y los animales del ensayo, sin ellos gran parte del trabajo no podría haberse realizado. A Carlos Storani quien me guió y acompañó siempre en el trabajo de laboratorio y actividades afines. A Pedro Soto y todo su equipo por su generosidad y apoyo en varios momentos de este camino. A Nolly Monzón porque siempre que necesite una mano estuvo ahí para dármele no solo como compañera de trabajo sino también como amiga.

A todo el equipo de docentes de la cátedra de Enfermedades Infecciosas de la UNNE que cada uno desde su lugar aportó su granito de arena.

A todo el equipo del IGEVET de la Facultad de Veterinaria de La Plata, entre ellos a Guillermo Giovambattista y Hernán, quienes junto a Silvina Díaz colaboraron en los análisis de estudios genómicos.

A mi familia, hermanas/o y amigas porque siempre que necesite algo cada uno estuvo ahí de diferente modo para apoyarme y darme una palabra de aliento.

Además junto con mis directoras expresamos reconocimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste y a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, especialmente a la Cátedra de Enfermedades Infecciosas y al Laboratorio de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos (GAD-IGEVET) del Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout”.

Este trabajo de Tesis Doctoral fue financiado por los proyectos:

- PICT2012-2610 “Estudio de Patologías de Origen Genético y Susceptibilidad a Enfermedades con Impacto Sanitario-productivo en Caballos de Argentina” de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, FONCYT
- PICT2016-1134 “Análisis de factores genéticos del hospedador que influyen la infección por anemia infecciosa equina y tripanosomosis en caballos de regiones

enzoóticas de Argentina de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, FONCYT.

- Proyecto “Epidemiología y utilidad de pruebas diagnósticas para Anemia Infecciosa Equina en un área endémica de la República Argentina”. Código 16B007. Período 2017-2020. Resolución N° 970/2016-CS. Subsidiado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica-UNNE.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE.....	iv
LISTADO DE TABLAS.....	vi
LISTADO DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La Anemia Infecciosa Equina (AIE).....	1
1.1.1. Virus.....	1
1.1.2. Ingreso y Replicación Viral	2
1.1.3. Transmisión	4
1.1.4. Patogenia.....	5
1.1.5. Diagnóstico y control de AIE.....	7
1.2. Situación en Argentina.....	10
1.3. Estudios de asociación genética con enfermedades infecciosas en equinos.....	13
1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	17
1.5. OBJETIVO GENERAL.....	17
1.6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
II. METODOLOGÍA.....	19
2.1. Características de las poblaciones a analizar.....	19
2.2. Establecimientos.....	19
2.2.1 Establecimiento 1.....	19
2.2.2 Establecimiento 2.....	20
2.3. Extracción de Sangre.....	20
2.4. Serología.....	21
2.4.1. Test de Coggins por la técnica de IDGA.....	21
2.4.2. Enzimoimmunoassay de competición (ELISA-c).....	23
2.4.3. Polarización de Fluorescencia (FPA).....	24
2.5. Estudio genómico.....	25

2.5.1. Selección y preparación de las muestras.....	25
2.5.2. Animales del Establecimiento 1.....	25
2.5.3. Animales del Establecimiento 2.....	25
2.6. Análisis Estadístico.....	26
2.6.1. Serológicos.....	26
2.6.2. Análisis de datos genómicos.....	26
2.6.2.1 Genotipificación con arreglo de ADN de mediana densidad.....	26
2.6.2.2. Controles de calidad de los datos del arreglo de ADN.....	27
2.6.2.3. Análisis de la diversidad genómica.....	27
2.6.2.4. Análisis de asociación (GWAS).....	29
2.6.2.5 Análisis funcional y enriquecimiento génico.....	29
III.RESULTADOS.....	31
3.1. Establecimientos.....	31
3.2. Serología.....	33
3.3. Estudio genómico.....	43
3.3.1 Definición de Fenotipos.....	43
3.3.2 Control de calidad de la genotipificación.....	46
3.3.3. Diversidad genómica.....	47
3.3.4 Estadísticos F de Wright.....	48
3.3.5. Asociación genómica.....	49
3.3.6. Análisis funcional y enriquecimiento génico.....	53
IV DISCUSIÓN.....	60
4.1 Establecimientos.....	60
4.2 Serología.....	63
4.3 Asociación genómica	65
V CONSLUSIONES.....	70
VI PROPUESTAS.....	71
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	72
ANEXO.....	82

LISTADO DE TABLAS

Tabla N°1: Porcentajes de determinaciones positivas por provincias/regiones.....	11
Tabla N°2: Resultados obtenidos por establecimiento con los 3 test serológicos realizados sobre un total de 71 muestras.....	33
Tabla N° 3: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el FPA de los E1, E2 y del total de las muestras (E1yE2), con software MedCalc.....	33
Tabla N° 4: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el ELISAc de los E1, E2 y del total de las muestras (E1yE2), con software MedCalc.....	34
Tabla N°5: Tabla de contingencia para la evaluación del FPA frente al Test de Coggins sobre el total de las muestras.....	36
Tabla N°6: Tabla de contingencia para la evaluación del ELISAc frente al Test de Coggins sobre el total de las muestras.....	37
Tabla N°7: Concordancias expresadas en valor Kappa entre las técnicas Test de Coggins y FPA y entre Test de Coggins y ELISAc de sueros equinos.....	37
Tabla N°8: Resultados de las 114 muestras procesadas por medio de las técnicas de Coggins, ELISAc y FPA.....	37
Tabla N°9: Resultados de las 1079 muestras procesadas por medio de las técnicas de Coggins y FPA.....	38
Tabla N°10: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el FPA en 114 sueros equinos de un laboratorio de Red.....	38
Tabla N°11: Análisis ROC entre el Test de Coggins y ELISAc en sueros equinos de un área enzoótica.....	39
Tabla N°12: Tabla de contingencia para la evaluación de la técnica de FPA frente al Test de Coggins, sobre un total de 114 muestras.....	41
Tabla N°13: Tabla de contingencia para la evaluación de la técnica de ELISAc frente al Test de Coggins, sobre un total de 114 muestras.....	41
Tabla N°14: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el FPA en 1079 sueros equinos de un laboratorio de Red.....	42
Tabla N°15: Tabla de contingencia de 1079 muestras para la evaluación de la técnica de FPA frente al Test de Coggins.....	43

Tabla N°16: Número de SNPs resultantes de la tipificación con el arreglo de ADN GGPEquine70K.....	46
Tabla N°17: Resultados del estudio GWAS identificando los SNPs.....	50
Tabla N°18: Enriquecimiento génico de los SNPs.....	54
Tabla N°19: Anotación funcional de 43 genes.....	57
Tabla N°20: Anotación funcional por agrupamiento de 43 genes mostrando tres clusters funcionales.....	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura N° 1. Mapa que muestra la densidad de RENSPAs muestreados y establecimientos positivos a AIE durante 2017.....	12
Figura N° 2: Esquema de siembra en el agar.....	22
Figura N° 3: representación esquemática de la estructura familiar de los animales seleccionados para la tipificación.....	26
Figura N° 4. Flujo de trabajo para el análisis de los datos genómicos.....	30
Figura N° 5: Resultados de 19 muestras de equinos de 2014 barras azul y 2017 barras rojas procesadas por la técnica de FPA.....	32
Figura N° 6: Resultados de 19 muestras de equinos analizadas por la técnica de ELISAc de 2014 barras azules y 2017 barras rojas.....	32
Figura N° 7: Análisis ROC entre la técnica de FPA y el Test de Coggins.....	35
Figura N° 8: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc y el Test de Coggins.....	35
Figura N° 9: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc, FPA y el Test de Coggins. Especificidad y sensibilidad obtenida para ambas técnicas.....	36
Figura N° 10: Análisis ROC entre la técnica de FPA y el Test de Coggins.....	39
Figura N° 11: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc y el Test de Coggins.....	40
Figura N° 12: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc, FPA y el Test de Coggins. Especificidad y sensibilidad obtenida para ambas técnicas.....	40
Figura N° 13: Análisis ROC entre la técnica de FPA y el Test de Coggins.....	42
Figura N° 14: Criterios de definición por fenotipos de AIE para tipificación genómica en los 40 equinos del E1.....	44
Figura N°15: Representación esquemática de la estructura familiar de los animales seleccionados para la tipificación del E2.....	45
Figura N°16: Criterios de definición por fenotipos de AIE seropositivos y seronegativos para tipificación genómica en los 11 equinos del E2.....	45
Figura N°17: Valores de Diversidad genómica (He) estimada en cada cromosoma.....	48
Figura N°18: Estimación media y ponderada de la diferenciación genética.....	49
Figura N°19: Plot de Manhattan obtenido a partir de los <i>p</i> -valores estimados para la asociación de SNPs únicos.....	50

Figura N°20: Clasificación por ontología génica de los genes identificados en las regiones con asociación significativa en los 44 caballos.....	56
Figura N°21: Genes relacionados con actividad kinasa, identificados por anotación funcional.....	59

ABREVIATURAS

AC: Anticuerpo

AIE: anemia infecciosa equina

AUC: Area under curve

AVE: Arteritis viral equina

BIOTANDIL[®]: Laboratorio Biológico de Tandil SRL

Cr: Cromosoma

E1y2: Establecimientos 1 y 2

ECA: Equine Chromosome

EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético

ELISAc: Enzimoimmunoassay de competición

ELR1: *Equine Lentivirus Receptor 1*

Env: envoltura

FPA: Fluorescencia Polarizada

Gag: grupo antígeno específico de género

GWAs: Genome Wide Association Analysis

H3BO3: Acido bórico

He: heterocigosis esperada

HIV: Virus de la inmunodeficiencia Humana

Ho: heterocigosis observada

HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium)

IC: Intervalo de confianza

IDGA: inmunodifusión en gel de agar

IL-6: Interleucina 6

LD: desequilibrio de ligamiento (Linkage disequilibrium)

MAF: frecuencia del alelo menor

ml: mililitro

Mm: milímetros

NaOH: Hidróxido de sodio

nm: nanometro

μl: microlitro

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGE 2: Prostaglandina E2

Pol: Polimerasa

OMIA: Online Mendelian Inheritance in Animals

OIE: Organización mundial de sanidad animal

RENSPA: Registro Nacional Sanitario de Productores Agropecuarios

ROC: Receiver Operator Characteristic

RT- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se: Sensibilidad

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Animal

SIGLAB: Sistema Integrado de Gestión de Laboratorios

SNP: Polimorfismo de un solo (simple) nucleótido

Sp: Especificidad

TGF β : Factor de crecimiento transformante β

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

VAIE: Virus de anemia infecciosa equina

RESUMEN

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad viral, transmisible de distribución mundial, causada por un virus ARN, Familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, específico de la especie *equidae*. Las medidas de prevención, lucha y control consisten en la detección de los portadores y la eliminación de positivos. Las enfermedades infecciosas suceden por la interacción de caracteres genéticos complejos y de las distintas variantes lo cual determina la infección. Existen equinos con determinadas características genéticas que son resistentes a la infección por el virus de AIE. Teniendo en cuenta esto, el objetivo del presente trabajo fue analizar la relación entre la infección con el virus AIE y las características genómicas de los caballos de una zona endémica de Argentina, los cuales se encontraban en su hábitat natural y condiciones de manejo sanitario controlado. Se utilizaron muestras de caballos de dos establecimientos de la provincia de Corrientes y sueros de un laboratorio de Red de la zona noroeste de Argentina. El diagnóstico serológico se realizó mediante el Test de Coggins, ELISAc y FPA. Para el análisis genómico se utilizaron muestras de pelo de cola de equinos seleccionados, para la genotipificación con el arreglo de mediana densidad GGPEquine65K (Illumina). Se analizó la asociación de genoma amplio (GWAS) a través del análisis de marcadores únicos. La prevalencia obtenida en el E1 fue de 76,4% (84/110), los animales seronegativos disminuyeron de 26 a 12 durante el ensayo. En el E2, 10 hembras y 1 macho, resultaron seropositivos al Test de Coggins. La primera camada de 7 potrillos resultó negativos al Test de Coggins, y la segunda camada de 9 potrillos, resultaron 8 seronegativos y 1 seropositivo. La Se y Sp obtenidas para las técnicas de FPA y ELISAc fueron: 100% /96,9% y 94,7% /100% respectivamente; y las concordancias fueron: FPA/Coggins 0,93 y ELISAc/Coggins 0,96. El GWAS a partir de 60.717 SNPs, mostró 110 variantes con *p*-valor significativo, y el enriquecimiento génico reveló la identidad de 60 genes, incluyendo 43 genes codificantes y 9 especies de ARNs no codificantes. En el presente trabajo no se detectó evidencia de que la presencia de determinados SNPs en los loci génicos analizados determinen la infección por el VAIE. Este estudio no reveló evidencia de que un único SNP o combinaciones de SNPs están directamente asociados con la infección por el virus de AIE; sin embargo, algunos SNPs estadísticamente significativos dentro de ciertos genes están relacionados con funciones génicas que podrían influenciar el resultado de la infección en algunos caballos.

Palabras claves: equinos, FPA, ELISAc, asociación genómica, genes.

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia is a disease caused by an *equidae* species-specific ARN virus. Some equines have genetic characteristics that make them immune to this disease. The aim of the present study was to analyze the relationship between infection by the EIA virus and horse's genetic characteristics, in an endemic region of Argentina. Horse samples were taken from 2 farms in Corrientes province, and serum samples were provided by an official lab from the area. Serologic diagnosis was done by using the Coggins Test, cELISA and FPA techniques, and genomic typing was performed by the GGPEquine65K array. Sensitivity and Specificity obtained were as follows: FPA and cELISA 100%/96,9% and 94,7%/100% respectively. The genome-wide association study (GWAS) from 60.717 SNPs allowed the identification of 60 genes, including 43 coding genes and 9 non-codifying ARNs species. This study did not reveal evidence that a unique SNP or SNP combinations were directly associated to the EIA virus infection; however, some statistically significant SNPs within certain genes are related to gene functions that may influence the infection outcome in some horses.

Keywords: equine, FPA, cELISA, genomic association, genes.

INTRODUCCIÓN

1.1 La Anemia Infecciosa Equina

La anemia infecciosa equina (AIE) es una enfermedad viral, transmisible con una distribución mundial, es causada por un virus ARN, Familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* y afecta a los equinos, asnos y mulas (Craig y Montelaro, 2008; Soutullo, 2008). Ligné en el año 1843 reportó el primer caso de AIE con todas las etapas de la enfermedad, agudo, subagudo y crónico (Leroux, *et al.* 2004). En Colombia fue registrada en el año 1984 en el departamento de Guajira (Ramírez e Hincapié 1976). En Chile, la enfermedad se diagnosticó por primera vez en el año 1980 y logró erradicarse un año después (Etchegaray, 2001). Monteverde, Moran y Garbers, en 1964 (como se citó en Soutullo, 2008) informaron el primer caso de AIE en la Argentina. Luego, en el año 1904 Carre y Valle continuaron realizando estudios y se confirmó la transmisión de la misma por medio de sangre e informaron sobre la persistencia de la enfermedad en aquellos animales que ya no presentaban síntomas, denominando al virus como “agente filtrable” (Cook *et al.*, 2013; Soutullo, 2008; Leroux *et al.*, 2004; Clements y Zink, 1996).

1.1.1. Virus

El virus de la AIE pertenece a los retrovirus. La propiedad que caracteriza a esta familia es la retro transcripción, proceso que consiste en sintetizar una molécula de ADN a partir de ARN viral por medio de una enzima transcriptasa reversa. La familia de los Retrovirus comprende 7 géneros, el Virus de la AIE (VAIE) pertenece al género *Lentivirus* por producir evolución de la infección lenta, junto con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y de la inmunodeficiencia felina (VIF). Cabe destacar que el VAIE presenta una alta variación antigénica y la particularidad de que principalmente en los brotes agudos de la enfermedad se suceden con una rápida replicación viral y el proceso es generalmente variable y dinámico. (Leroux *et al.*, 2004; Stanchi *et al.*, 2010; Montelaro, *et al.* 1993). Solo posee un antígeno específico de grupo importante, p26 que se conserva y constituye la base de las pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y Enzimoimmunoensayo competitivo (ELISAc) (Coggins y Norcross, 1970).

Estructuralmente, el VAIE presenta una forma oval o circular de aproximadamente unos 115 nanómetro (nm) de diámetro, con un núcleo cónico lentiviral encerrado en una matriz proteica y delimitado por una membrana lipídica con proyecciones de 6 a 8 nm. El genoma del VAIE es pequeño (tamaño), genéticamente simple que codifica proteínas estructurales por medio de sus genes gag (grupo antígeno específico de género), pol (polimerasa) y env (envoltura). El gen gag codifica para las proteínas p26, p15, p11 y p9, presentes en la cápside viral; el gen pol codifica para las enzimas transcriptasa inversa, integrasas y proteasas, y el gen env codifica las glicoproteínas de transmembrana, gp45, y de superficie, gp90. Estas últimas se encuentran en un número de 72 en la superficie en forma de espículas, llamadas peplómeros. Estas glicoproteínas gp90 y gp45 son las encargadas de la adhesión del VAIE a la membrana citoplasmática de la célula huésped (Weiland *et al.*, 1977; Clements y Zink, 1996; Leroux *et al.* 2004; Cook *et al.*, 2013).

En el núcleo hay dos copias del ARN genómico monocatenario. Este ARN después de la infección, se somete a una transcripción reversa por medio de la transcriptasa reversa viral codificada y la ARNasa H, produciendo una cadena ligada doble de moléculas de ADN designada como provirus o ADN proviral (Cook *et al.*, 2013). La fosfoproteína periférica de la nucleocápside denominada p15 o antígeno de matriz (MA), se encuentra en la superficie interna de la membrana viral subyacente, y participa en los estadios iniciales de la replicación (Provitera *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2013). La misma envuelve a un núcleo constituido por el genoma viral encapsulado por la p26 o antígeno de la cápside viral (Cook *et al.*, 2013; Leroux *et al.*, 2004). En su interior además de la proteína enzimática transcriptasa reversa, se encuentran otras proteínas estructurales, tales como la p11 quien se une al ácido nucleico y la p9 proteína ácida única en los lentivirus (Clements & Zink, 1996; Montelaro *et al.*, 1984).

1.1.2. Ingreso y Replicación Viral

Se han realizado numerosas investigaciones con diferentes cepas virales y en las mismas se pudo demostrar que los principales órganos donde se produce la transcripción viral dentro de los macrófagos tisulares, son hígado, bazo, pulmones, nódulos linfáticos y riñones, principalmente durante la fase subclínica de la enfermedad. Los macrófagos de tejidos maduros de casi todos los órganos son la fuente principal de una alta viremia,

presente durante la infección aguda con VAIE, lo que lo hace diferente a otros lentivirus (Sellon *et al.*, 1992; Campbell y Robinson, 1998; Leroux *et al.*, 2004).

Los lentivirus ingresan a la célula huésped a través de receptores, en su mayoría necesitan de correceptores para realizar este pasaje. En cambio, el VAIE ingresa por medio de un solo receptor, el que se encuentra en la pared de monocitos y macrófagos y es denominado *Equine Lentivirus Receptor 1* (ELR1). Este receptor es una proteína de la familia de los factores de necrosis tumoral presente en células tales como los monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares del hígado, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea, donde el VAIE tiene una atracción selectiva. En monocitos circulantes, los niveles de expresión del ELR1 están duplicados respecto de los hallados en otras células, y en macrófagos tisulares se encuentran triplicados (Jin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Algunos autores sostienen que la fusión entre el ELR1 y el virus es por vía endocítica dependiente de pH bajo y se daría por medio de la proteína gp90, lo cual produciría cambios conformacionales en la proteína gp45 y ello sería lo que permitiría infectar la célula huésped (Montelaro *et al.*, 1984; Clements y Zink, 1996; Jin *et al.*, 2005). Una vez que el virus ingresa al citoplasma celular, realiza una copia del ARN de cadena simple en un provirus de ADN de doble cadena por medio de la enzima transcriptasa reversa, y el provirus es llevado al núcleo e integrado al ADN de la célula huésped. Aparentemente una integrasa viral sería la encargada de incorporar el provirus a los cromosomas (Cr) y se estima que habría aproximadamente 10 copias de ADN proviral por célula infectada (Leroux *et al.*, 2004; Craigo y Montelaro, 2008).

Una vez integrado al genoma de los macrófagos y monocitos el virus podría permanecer latente y sin expresarse, lo que evita la detección por parte del sistema inmune del huésped y facilita la diseminación viral como verdaderos “Caballos de Troya” (Clements y Zink, 1996; Oaks *et al.*, 1998; Leroux *et al.*, 2004;).

La persistencia de la infección por el VAIE se debe a que, como todos los lentivirus, posee un genoma altamente variable, y la mayoría de las aparentes mutaciones génicas centralizadas dentro de la proteína de envoltura. Los lentivirus tienen una alta capacidad de superar rápidamente factores tales como anticuerpos (AC) y linfocitos, entre otros que puedan suprimir su replicación; estas características tienen implicancias profundas sobre su capacidad para evadir la respuesta del sistema inmune, así como también para el desarrollo de una vacuna eficaz (Craigo y Montelaro, 2010; Craigo y Montelaro, 2011).

1.1.3. Transmisión

La transmisión viral es principalmente mecánica, mediante sangre o sus productos. Los artrópodos hematófagos son los vectores mecánicos más comunes, por ejemplo, el *Tábanus sp.* (mosca de los caballos) y *Stomoxys calcitrans* (mosca brava) (Stein *et al.*, 1942; Foil 1983; Foil *et al.*, 1984; Issel y Foil, 1984; Craigo y Montelaro, 2008; Cook *et al.*, 2013). Si bien el virus no se replica dentro de estos insectos, los mismos, mantienen su capacidad infecciosa entre 30 minutos y dos horas, pudiendo ser transferido por otro equino (Sponseller & Sprayberry, 2003; Cicciarella y Bosisio, 2005).

En entornos naturales, la transmisión se produce más frecuentemente durante las estaciones en las que los vectores están presentes y son abundantes, y con la presencia de equinos infectados como reservorios. El virus debe encontrarse en cantidad suficiente para que los vectores al alimentarse de sangre lo recojan y lo transfieran mecánicamente a un segundo huésped (Foil e Issel, 1991). Está claro que la transmisión del virus del VAIE por insectos hematófagos es un fenómeno casual, y la probabilidad de transmisión se modifica exponencialmente según la cantidad de VAIE en la sangre, lo que no se puede predecir con precisión. La recomendación general para el control de AIE es controlar y separar los equinos infectados con VAIE (Cook *et al.*, 2013).

La iatrogenia es una vía de transmisión muy importante, propagando la enfermedad con el empleo de instrumentos quirúrgicos o agujas contaminadas o por la inyección de cantidades diminutas del virus, y el uso de agujas comunes cuando se inyecta a grupos de caballos puede dar lugar a un brote de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2013).

También puede producirse una infección intrauterina que provoque abortos o el nacimiento de potros infectados, que a menudo mueren en los meses siguientes (Coggins *et al.* 1972; Issel *et al.*, 1992; Radostits *et al.*, 2002). La literatura contiene numerosos comentarios sobre la probabilidad de transmisión de los équidos infectados por el VAIE por contacto directo, a través de la reproducción (venérea), por exposición transovárica / perinatal y otros. Basta decir que tales exposiciones tienen el potencial de transmisión y se esperaría que tal riesgo aumente si se producen niveles de viremia más altos, por ejemplo, durante episodios febriles (Cook *et al.*, 2013).

Investigaciones realizadas por McConnico *et al.* (2000) recolectaron muestras de 23 yeguas y sus potrillos, 12 yeguas mostraron resultados positivos a la serología y fueron

sacrificadas. Los potrillos fueron aislados y realizaron un seguimiento serológico donde pudieron ver que los ACs eran de origen pasivo y que disminuían a lo largo del tiempo, y los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) mostraron resultados negativos. Coggins *et al.* (1972) mencionan que la vía digestiva podía ser una posible ruta de transmisión del virus, y la ocular, en la que la infección se produciría si el virus toma contacto con los ojos del equino en forma directa. También afirmó que el semen de padrillos portadores inaparentes no contiene virus, pero sí aquellos que presentan cuadros severos de la enfermedad (Coggins *et al.*, 1972). En estos últimos, en los que la tasa viral es alta, son capaces de transmitir a la hembra durante el coito. El virus de la AIE puede ser aislado del calostro, de la leche, del semen y de la orina, y en el caso de que existan heces sanguinolentas, también pueden ser fuentes de infección (Nachón Cicciarella y Bosisio, 2005).

1.1.4. Patogenia

La infección por el VAIE produce inicialmente un curso generalmente agudo, bastante rápido, variable y dinámico, lo que lo diferencia de otros lentivirus que producen un curso lento, crónico y progresivo. El curso agudo es producido por una replicación viral agresiva y pueden exhibir síntomas que tienden a no ser específicos, acompañados siempre de picos febriles intensos, en algunos casos los animales mueren en un periodo de 2 o 3 semanas aproximadamente (Leroux *et al.*, 2004; Ruiz-Sáenz *et al.*, 2008). Esta forma de la enfermedad es dañina y difícil de diagnosticar porque los síntomas aparecen rápidamente, y a menudo se nota solamente una elevada temperatura corporal. Los síntomas clínicos de la forma aguda de la AIE tienden a ser inespecíficos, y en los casos leves, la fiebre inicial puede ser de corta duración. Como resultado, cuando un caballo se infecta con el VAIE, puede que los propietarios y los veterinarios no se den cuenta del síntoma inicial (Ruiz-Sáenz *et al.*, 2008). Los caballos infectados a menudo se recuperan tornándose en portadores crónicos de la infección. En este estadio, aparecen episodios agudos de la enfermedad los que duran entre 3-5 días sin signos clínicos detectables o con signos como fiebre, letargia, edema, anemia y trombocitopenia. Este periodo de la enfermedad se ha definido como forma crónica de AIE, la cual típicamente ocurre entre los 8-12 meses pos-infección. La enfermedad posee un periodo de transición durante el primer año pos-infección, va desde una forma crónica a una etapa inaparente de infección

durante la cual la viremia usualmente es indetectable. Esta forma puede acompañar al animal hasta 20 años, el caballo afectado con la AIE crónica es el clásico “habitante del pantano”, ha perdido su salud, se presenta letárgico, anoréxico, con un hematocrito bajo, y una persistente trombocitopenia, especialmente coincidiendo con la fiebre causada por el virus de la AIE (Issel y Foil, 1984; Hammond *et al.*, 1997; Harrold *et al.*, 2000; Leroux *et al.*, 2004). Los signos clínicos asociados con el periodo agudo de la enfermedad estarían mediados por citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) que son liberados cuando las cargas virales llegan a niveles umbrales (Costa *et al.*, 1997; Tornquist y Crawford, 1997; Tornquist *et al.*, 1997; Sellon *et al.*, 1994). La liberación de la IL-6 y el TNF- α inducen una respuesta febril con activación de la vía araquidónica y aumentando la producción de prostaglandina E2 (PGE2) (Tornquist y Crawford, 1997).

Los caballos infectados de forma aguda con VAIE presentan niveles elevados de IgM e IgG unida a las plaquetas, estos hallazgos son consistentes con un mecanismo de trombocitopenia mediado por el sistema inmunitario, muy probablemente debido a la unión de complejos inmunes en las plaquetas, esto ayudaría la diseminación viral hacia las células de Kupffer hepáticas y macrófagos esplénicos, este proceso produce una severa esplenomegalia y hepatomegalia (Clabough *et al.*, 1991). La anemia es inducida principalmente porque los eritrocitos son recubiertos por el C3 del complemento y de esta manera sufren una importante fagocitosis, lo que también genera la presencia de hemosiderina en los macrófagos del hígado, bazo y ganglios linfáticos (Perryman *et al.*, 1971; y Sentsui y Kono, 1987). La mayoría de los équidos infectados con VAIE a menudo tienen mechones glomerulares engrosados en el riñón asociados con la deposición de inmunoglobulina y complemento C3 en las membranas basales y áreas mesangiales (Henson y McGuire, 1971).

Los signos clínicos de la AIE se desencadenan cuando las cargas virales alcanzan un valor umbral crítico (Cook *et al.*, 2003); no obstante, alcanzar o superar el umbral depende de la cepa del virus, del grado de resistencia innata individual a la enfermedad y de la especie equina (Cook *et al.*, 2013). En estudios comparativos con cepas de VAIE virulentas en el equino, caballos y ponies experimentaron signos clínicos de enfermedad, que en algunos casos fueron graves, en cambio los burros (*Equus asinus*) se mantuvieron asintomáticos durante un año, solo presentaron leves reducciones transitorias en el

recuento de plaquetas. En la actualidad, se desconoce si los burros sufrieron una adaptación al virus o exhiben una resistencia a la enfermedad. (Cook *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2013).

1.1.5. Diagnóstico y control de AIE

Los estudios sobre la patogénesis del VAIE y del virus del HIV han demostrado que ambos virus poseen un genoma extremadamente variable con la mayoría de las mutaciones genéticas centralizadas dentro de la proteína env. Ello tiene efectos profundos en el control inmunitario del huésped frente a la infección y la enfermedad, así como en el desarrollo de una vacuna eficaz. Esto ha demostrado que la obtención de una vacuna eficaz contra la enfermedad será una tarea complicada (Craig y Montelaro, 2010; Craig y Montelaro, 2013;). En la actualidad los controles de AIE se realizan sobre la base de la reglamentación vigente por Resolución 617/05 del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), que consiste en diagnóstico de la enfermedad y eliminación del animal positivo.

Debido a que los signos clínicos principales de la enfermedad, como así también los hallazgos hematológicos de laboratorio, no son patognomónicos de la AIE, es necesario recurrir a la serología. La Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) recomienda como método diagnóstico de elección la prueba de IDGA, desarrollada por Leroy Coggins en 1972, por ser la única prueba que detecta proteínas de la cápside, con máxima seguridad a los portadores de virus sin manifestaciones clínicas. El Test de Coggins reconoce ACs específicos contra la cápside proteica del virus (Sellon *et al.* 1994). El mismo presenta limitaciones dando resultados falsos negativos durante los primeros 20 a 25 días de infección aguda debido a la baja tasa de ACs presentes (Issel y Cook, 1993). También, puede proporcionar resultados falsos positivos en aquellos animales recién nacidos y hasta los 8 meses de vida, por la presencia de ACs calostrales provenientes de yeguas infectadas (Sellon y Long, 2007). Otro factor condicionante es el tiempo que demora el diagnóstico, hasta 72 horas, periodo en que el individuo deberá permanecer aislado debido a que es una fuente importante de diseminación de la enfermedad.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes test de enzimoimmunoensayo (ELISA) para el diagnóstico de AIE. En 1984, Shane *et al.* desarrollaron un test de ELISA “sándwich” que identificaba ACs anti-p26, con el que obtuvieron buenos resultados en

las muestras en las que el test de Coggins daba resultados equivocados (Shane *et al.*, 1984). En el año 1989 se desarrolló un test de ELISA de competición, que mostró muy buena concordancia con la técnica de IDGA; además se demostró que el mismo tiene una alta sensibilidad, pero no especificidad como el test de Coggins, ya que puede dar reacciones cruzadas con otros virus (Matsushita *et al.*, 1989). En general los test de ELISA han demostrado dar buenos resultados, aunque hay una diferencia entre los ELISAs contra la proteína p-26 y aquellos contra la gp45, la misma radica en que esta última presentaría una menor precisión (Paré y Simard, 2004).

La Polarización de la Fluorescencia (FPA), es una técnica que se encuentra en desarrollo, es un procedimiento simple para medir la interacción antígeno - AC, ya utilizada en veterinaria para el diagnóstico de Brucelosis (OIE, 2016). La prueba de FPA es un método de diagnóstico sencillo y rápido de alta sensibilidad y especificidad (Weber, 1952; Weber, 1956). La Polarización de la Fluorescencia es un ensayo homogéneo que sólo requiere la adición de un antígeno marcado a las muestras de sueros diluidos adecuadamente. El valor obtenido de manera objetiva mediante el empleo de un polarímetro, está basado en la rotación aleatoria de moléculas en solución, donde la velocidad está influenciada por el tamaño de las moléculas con una relación de proporcionalidad inversa. Las moléculas grandes (AC – antígeno - fluorocromo) poseen una rotación más lenta y emiten mayor luz polarizada en un mismo plano, mientras que las más pequeñas (antígeno - fluorocromo) rotan más rápido, emitiendo luz despolarizada (Nielsen *et al.*, 2001; Sánchez-Villalobos *et al.*, 2010).

Tencza *et al.*, (2000) evaluaron mediante la prueba de FPA, la capacidad de varios péptidos sintéticos lineales para detectar la presencia de ACs contra proteínas estructurales del virus de la AIE. Así estos autores, desarrollaron una nueva prueba para el diagnóstico de AIE mediante FPA, específica, sencilla, rápida siendo una herramienta de gran valor para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Juliarena *et al.* en 2006 evaluaron la eficacia de la prueba de FPA para el diagnóstico de AIE mediante la utilización de péptidos sintéticos con modificaciones de la configuración espacial de las moléculas y conjugadas con fluoresceína. Con estas modificaciones los resultados de la prueba de FPA tuvieron una correlación con la técnica de IDGA, mostrando una mayor sensibilidad que los péptidos lineales. A su vez Espasandin *et al.* (2018) evaluaron el kit experimental de FPA para AIE elaborado por BIOTANDIL® (Laboratorio Biológico de

Tandil SRL) como alternativa diagnóstica a la técnica de referencia IDGA empleando sueros de equinos sanos e infectados de Argentina obteniendo una sensibilidad del 94.5% y una especificidad de 95.2%.

En aquellos casos en que las tasas iniciales de replicación de VAIE suelen ser altas, los equinos recientemente infectados pueden representar mayor riesgo de transmisión antes de convertirse en seropositivos, por ello es de gran importancia poder detectar la presencia del virus en la forma más temprana posible. Las pruebas de Reacción en cadena a la polimerasa (PCR) también se pueden utilizar para complementar o confirmar las pruebas serológicas, en particular, cuando existen resultados dudosos, o cuando se sospecha de la existencia de una infección y la serología da un resultado negativo o equivocado (por ej. en la etapa temprana, cuando no se han desarrollado los ACs). No obstante, éstas técnicas que ponen en evidencia al virus en distintas fases de la enfermedad, presentan ciertas limitaciones. Una de ellas sería la selección de los “primers”, que se torna compleja debido a la variabilidad de cepas existentes (Nagarajan y Simard, 2001). Además, la baja replicación viral no permitiría la detección de RNA viral plasmático en portadores asintomáticos (Oaks *et al.*, 1998)

En los últimos años, las distintas técnicas basadas en PCR estuvieron orientadas en la detección de componentes víricos de los ácidos nucleicos VAIE. La mayoría de los procedimientos publicados para detectar estos ácidos nucleicos se han basado en la amplificación de las secuencias del gen gag (Nagarajan y Simard, 2001; Cook *et al.*, 2002; Capomaccio *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2012). Estas técnicas presentan diversos inconvenientes, entre ellos que las secuencias de VAIE son muy variables entre aislamientos geográficamente distintos y en animales infectados individualmente por distintas cepas virales. Por lo cual para el desarrollo de técnicas de PCR exitosas es primordial identificar regiones altamente conservadas dentro del genoma VAIE (Cook *et al.*, 2002).

1.2. Situación en Argentina

Las medidas preventivas, de lucha y control que se aplican en los distintos países del mundo responden a las características de la enfermedad, y se concentran en: a) la detección de los portadores mediante el test diagnóstico de laboratorio; b) la eliminación de los mismos, mediante sacrificio o envío a faena. El objetivo de estas medidas es evitar la difusión territorial del virus y el incremento de equinos portadores. El sostenimiento

de este sistema, permite en algunos casos y regiones que, en condiciones ecológicas favorables y con la participación responsable y activa de todos los actores ligados al caballo, al ámbito rural y ecuestre, pueda ser controlado o erradicado paulatinamente. Las medidas de prevención pueden ser modificadas según se hable de regiones libres de la enfermedad, o con presencia enzoótica de la misma, los cuales pueden ser diferenciados en zonas según el nivel de prevalencia de la enfermedad (de la Sota, 2005).

La enfermedad se encuentra incorporada mediante el Decreto N° 991 de fecha 14 de marzo de 1969, al grupo de enfermedades a que refiere el artículo 6° del Reglamento General de Policía Sanitaria. Por lo tanto, son de aplicación todas las regulaciones previstas en la Ley N° 3959 de Policía Sanitaria de los animales y su decreto reglamentario, lo que incluye la denuncia obligatoria, la interdicción preventiva ante la presencia de casos y la eliminación de portadores de acuerdo al articulado de las normas específicas para la Anemia Infecciosa. La notificación, vigilancia y seguimiento epidemiológico, análisis de riesgo y emergencias sanitarias, así como los procedimientos que contemplan los aspectos de protección y lucha contra la enfermedad y los diferentes niveles de responsabilidad de los distintos actores en la misma, se encuentran establecidos en las Resoluciones SENASA N° 422/03 y N° 617/05 de la ex Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos (de la Sota, 2005).

En la actualidad, la Argentina posee normativas oficiales para el control de la AIE, sin embargo esta patología ha constituido un enigma para los productores y propietarios, adquiriendo importancia no sólo en relación a pérdidas directas sino también a las limitaciones, necesariamente estrictas, que imponen las exportaciones y el sostenido tráfico del comercio caballar y las actividades ecuestres (de la Sota, 2005).

Las diferencias en la prevalencia e incidencia de esta enfermedad dependen de diversos factores, como la región geográfica y sus ecosistemas, la densidad de población de équidos y su dinámica regional. También del nivel socio cultural de sus propietarios y consecuentemente la asistencia sanitaria y profesional de los equinos, y por ende del conocimiento o no de la enfermedad, muy en especial de las formas de transmisión. Es determinante el cumplimiento responsable de las medidas de prevención y control, ya sean estas las impuestas por la autoridad sanitaria oficial o simplemente las de propia incumbencia y responsabilidad del propietario. (De la Sota, 2005).

La prevalencia de equinos positivos a AIE para Argentina, de acuerdo al relevamiento realizado en el año 2002 dentro del marco del Convenio SENASA y Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires, fue del 15,4% (intervalo de confianza de 16,54% al 14,32%).

Los datos de SENASA, de la Red de Laboratorios oficiales, sobre 210.924 animales de todo el país, presentes en la tabla N°1 arrojaron un total del 0,95% de animales positivos (Durante *et al.* 2008).

Tabla N°1: Porcentajes de determinaciones positivas por provincias/regiones, obtenidos de la Red de Laboratorios oficiales de SENASA año 2008.

Provincia o Región	Porcentajes
Buenos Aires	0,12%
Santa Fe	35%
Córdoba	0,55%
Corrientes y Misiones	4,3%
NOA (Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca)	1,2%
Entre Ríos	2,9%
Patagonia	0%
La Pampa y San Luis	0%
Cuyo (Mendoza, La Rioja, San Juan)	0,4%
Chaco y Formosa	29%

A partir de año 2017 las autoridades del SENASA comenzaron a implementar un nuevo procedimiento informático por el que, los laboratorios de red, deben informar periódicamente todos los resultados obtenidos de los diferentes diagnósticos efectuados de AIE por medio del Sistema Integrado de Gestión de Laboratorios (SIGLAB). Los datos de 15.227 establecimientos incluidos dentro del Registro Nacional Sanitario de Productores Agropecuarios (RENSPAs), en los que se recolectaron muestras serológicas para el diagnóstico de la enfermedad durante el período bajo estudio, se obtuvo información epidemiológica en el año 2017; en 407 de estos establecimientos se detectó

al menos un animal positivo, y la cantidad total de sueros analizados fue de 140.204, de los cuales 918 resultaron positivos a AIE (Figura N° 1).

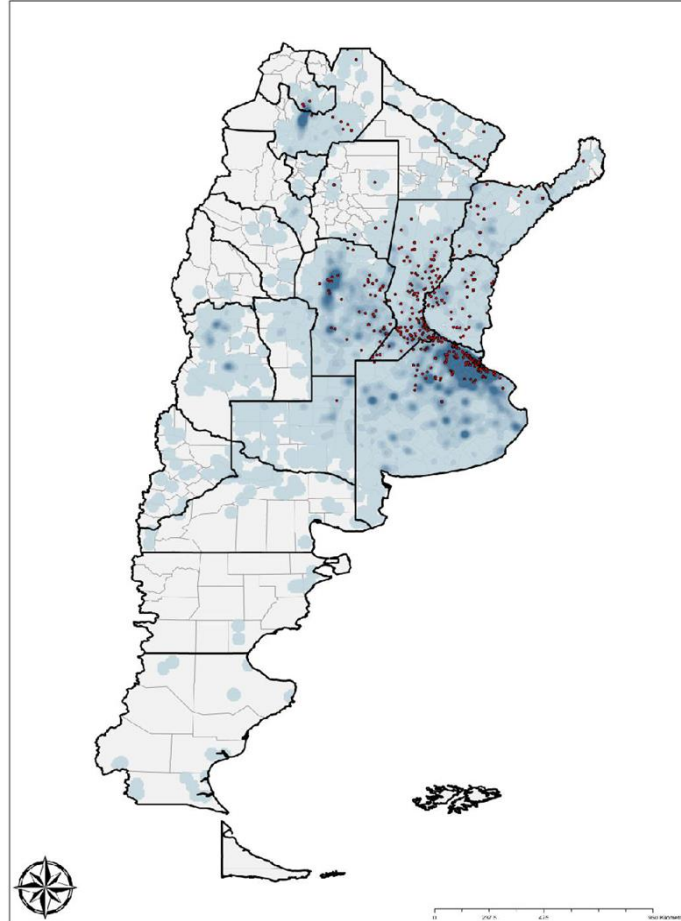


Figura N° 1. Mapa que muestra la densidad de RENSAPs muestreados y establecimientos positivos a AIE durante 2017. La coloración de celeste claro a azul intenso muestra, respectivamente, la menor y mayor densidad de RENSAPs muestreados (15.227). Los puntos de color rojo los RENSAPs georreferenciados que resultaron positivos a Anemia Infecciosa Equina (407)

1.3. Estudios de asociación genética con enfermedades infecciosas en equinos

Las enfermedades infecciosas son resultado de una interacción compleja entre el agente patógeno infeccioso (microorganismo), las condiciones del medio ambiente y varios factores dependientes del hospedador. Suelen existir diferencias de susceptibilidad en los distintos individuos ante una determinada enfermedad infecciosa en una población expuesta al mismo agente infeccioso. Lo anteriormente mencionado podría deberse a diferencias genéticas (Hill, 1999; Thursz, 2000; Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005;

Clementi y Di Gianantonio, 2006; Kalemkerian, 2014). La variación individual en la constitución genética influye marcadamente en el curso de varias enfermedades causadas por microorganismos infecciosos (Hill, 1999), por lo que es importante identificar los genes que pueden tener un rol e influenciar la evolución de la enfermedad. Los genes de susceptibilidad presentan mutaciones que generan variaciones que alteran el riesgo de ocurrencia de la patología (Díaz *et al.*, 2005). Las variaciones pueden ocurrir en regiones codificantes de los genes, por ejemplo, cambios en las regiones de reconocimiento de antígenos que afectan la interacción antígeno-AC, mutaciones en genes que regulan la expresión de otros genes, o en regiones no codificantes, como las que intervienen en el corte y empalme de intrón y exón (*splicing*), o las regiones que controlan la transcripción de los genes y de esta manera modifican sus niveles de expresión (Díaz *et al.*, 2005).

Sin embargo, la mayoría de las enfermedades infecciosas suceden como consecuencia de la interacción de caracteres genéticos complejos, por lo que cada variante genética individual tiene sólo un pequeño efecto, y a través de la interacción de las distintas variantes se determina el resultado de la infección (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005), y en estos casos, el riesgo se mide de manera probabilística (Salas y Carracedo, 2007).

El primer relevamiento genético en relación con AIE y resistencia en Argentina fue realizado en un grupo de caballos de la provincia de Chaco (cofinanciado por AAVE y ANPCyT mediante proyecto PID2007-011). Esta caracterización consistió en evaluar la posible existencia/susceptibilidad genética a la infección por AIE mediante el estudio de genes del sistema inmune y marcadores relacionados. Los datos preliminares exhibieron una asociación estadística con marcadores genéticos de tipo microsatélite localizados en regiones cromosómicas con alta densidad de genes inmunes (Díaz *et al.*, 2012). No obstante, es necesario realizar una validación de las asociaciones estadísticas halladas, teniendo en cuenta las diferencias genéticas entre razas o poblaciones de caballos. Teniendo en cuenta estas características es importante complementar el estudio en otras poblaciones equinas, atendiendo a las diferencias entre las mismas en relación a su bagaje genético, como así también a las condiciones de cría y manejo sanitario empleadas en cada caso.

Existen distintas estrategias para analizar la asociación genética de los genes del hospedador que contribuyen a determinar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas

(Hill, 1998; Hill, 1999), y las que en términos generales consisten en identificar las variantes genéticas que influyen el riesgo de enfermedad sobre la base de la comparación de los genotipos en individuos afectados y no afectados (Díaz *et al.*, 2005).

En el estudio de asociación genética, se determinan y comparan las frecuencias génicas o genotípicas de genes candidatos, en individuos que presentan la enfermedad en casos (afectados) y en controles (no afectados) (Hill, 1998; Hill, 1999; Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005). En individuos no emparentados se analizan las frecuencias génicas o genotípicas entre individuos casos contra individuos controles mediante un test chi cuadrado o similar (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005).

En el “rastreo del genoma”, se realiza una búsqueda intensiva para localizar en todo el genoma, para localizar e identificar las regiones o los genes principales que afectan la susceptibilidad o resistencia. Tradicionalmente, se utilizan marcadores genéticos altamente variables, generalmente de tipo microsatélite (secuencias repetidas en tándem), distribuidos en todo el genoma o en un cromosoma determinado y se realiza un análisis de ligamiento para identificar el o los marcadores que puedan estar relacionados con la susceptibilidad a la enfermedad (Díaz *et al.*, 2005). De esta manera, se localiza (mapea) la región cromosómica asociada a la susceptibilidad (Hill, 1999). A continuación, se realiza un estudio de asociación para identificar los genes que segregan en forma conjunta con el carácter, y posteriormente se evalúa cuál de ellos, según su función, podrían influir en la susceptibilidad/resistencia a la enfermedad en cuestión (Hill, 1999). Este método permite que genes desconocidos puedan ser mapeados e identificados sin información previa acerca de su función (Hill, 1999). Requiere el estudio de muchas familias con hermanos afectados para obtener una evidencia sólida de ligamiento, pero en el caso de enfermedades infecciosas poligénicas, presenta menor poder para la detección (Hill, 1998). El poder estadístico de este método es generalmente menor que en el estudio de tipo caso-control (Hill, 1999). En casos en los que la susceptibilidad a una enfermedad depende de gran número de genes con pequeño efecto aditivo, puede no detectarse por el análisis de ligamiento. Sin embargo, permite mediante el rastreo del genoma, orientar la búsqueda hacia genes de susceptibilidad con mayor influencia o aquellos genes de mayor interés biológico (Hill, 1999). Una aproximación alternativa para identificar marcadores en el gen o región de interés es el desequilibrio de ligamiento (LD por sus siglas en inglés *linkage disequilibrium*). Es posible determinar patrones de LD y luego seleccionar una

fracción de polimorfismo de un solo (simple) nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*) que indiquen (o etiqueten) la mayoría de las restantes variantes. El análisis de ligamiento resulta sumamente útil en casos de enfermedades debidas a un único gen, y aunque también se ha aplicado a rasgos complejos, requiere tamaños de muestras grandes y mapeos con alta densidad de marcadores (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005).

El tipo más frecuente de variación genética es el SNP, y consiste en la sustitución de un único nucleótido en una secuencia determinada de ADN. Generalmente son bialélicos y presentan una baja tasa mutacional. La mayoría de estas variantes se encuentran en regiones no codificantes, pero aquellas que se localizan en un gen o en una región regulatoria podrían modificar la función de la proteína que codifica, y por lo tanto podrían tener un rol en la susceptibilidad a la enfermedad. Al utilizar genes candidatos, la utilidad radica en que presenten variantes que resulten en un cambio de aminoácido en la transcripción; los SNPs que implican sustitución de aminoácidos son más probables de ser deletéreos o beneficiosos evolutivamente y por lo tanto más probables de ser variantes funcionales que contribuyen a una enfermedad común (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005) y se seleccionan considerando aquellos que podrían tener una función en la fisiopatología e inmunología de la enfermedad de interés, lo que podría influir en la susceptibilidad/resistencia a esa enfermedad (Hill, 1999; Díaz *et al.*, 2005). La asociación con una enfermedad puede analizarse en cada marcador de manera individual o en haplotipos de múltiples marcadores. El uso de los haplotipos es útil cuando los marcadores no tienen efecto detectable si se consideran individualmente, y permite testear simultáneamente muchas variantes causales. Además, pueden testearse los haplotipos debido a que pueden estar próximos a marcadores causales no tipificados (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005).

En equinos, se encuentran disponibles varios arreglos de ADN de diferente densidad. El arreglo de genotipificación denominado Axiom™ Equine Genotyping Array (Affymetrix) diseñado por Affymetrix en colaboración con la Universidad de Minnesota y el Consorcio de Diversidad Genética Equina (Equine Genetic Diversity Consortium), tiene utilidad para testear 20 razas equinas diferentes, contiene 670.796 marcadores SNPs, seleccionados a partir del rastreo de 2 millones de marcadores para brindar una cobertura

del genoma optima entre razas de caballos. Este microarreglo es de alta densidad, pero tiene un costo muy elevado para afrontar su uso en tareas de investigación.

Por otra parte, el microarreglo de ADN “EquineSNP50 Genotyping BeadChip” (Illumina) posee más de 54.000 SNPs distribuidos y validados en todo el genoma, derivados del ensamble del genoma equino EquCab2. Este arreglo representa una opción económicamente más accesible, y brinda una genotipificación de mediana densidad de alta calidad, útil para diversas aplicaciones y estudios en investigación equina.

La utilidad de los SNPs se ha puesto en evidencia en numerosos estudios de asociación del genoma completo (del inglés *genome-wide association study*- GWAS). En equinos, esta estrategia ha posibilitado determinar la asociación, localización y relación directa de regiones cromosómicas con caracteres y enfermedades equinas. Las prevalencias de infección por el virus de la Arteritis Viral Equina (AVE) parece diferir entre las diferentes razas de caballos, lo que refuerza el supuesto de influencia genética en la susceptibilidad/resistencia a la infección, como en el caso de la marcada disparidad entre equinos de razas Standardbred y Thoroughbred. En Estados Unidos la AVE es endémica en caballos de razas Standardbred con prevalencias de hasta 84,3% en cambio en las razas de caballos Thoroughbred las prevalencias de la enfermedad solo alcanzan a un 5,4% de los equinos (Go *et al.*, 2010). En estudios de identificación de regiones cromosómicas y genes candidatos asociados con la susceptibilidad / resistencia de los linfocitos T CD3 a la infección por VAE en caballos mediante el GWAS, los fenotipos susceptibles / resistentes no se asociaron con la edad, la exposición previa al virus o la presencia de ACs, pero parecería mostrar una asociación con la raza en estudios preliminares (Go *et al.*, 2011). El acceso a las secuencias del genoma y el desarrollo de tecnologías de detección en todo el genoma nos brindan oportunidades para identificar variantes asociadas con la susceptibilidad / resistencia a agentes infecciosos (Dávila y Hibbert, 2009). Mediante el uso de GWAS se identificaron varios genes celulares que pueden estar asociados con rasgos de la susceptibilidad / resistencia a los linfocitos T CD3 in vitro a la infección por AVE (Go *et al.*, 2011).

Un GWAS es un enfoque utilizado en la investigación genética para asociar variaciones genéticas específicas con ciertas enfermedades. El método implica el análisis de los genomas de muchos individuos diferentes y la búsqueda de marcadores genéticos que se pueden utilizar para predecir la presencia de una enfermedad. El desarrollo de los

microarrays hizo posible analizar centenares de miles de SNP en forma más eficiente, con pequeñas muestras de ADN y costos muchos menores que el que supondría estudiar los SNP de manera individual. Al estar esos SNP distribuidos por todos los cromosomas fue posible explorar todo el genoma sin hipótesis previas y sin elección de genes candidatos previamente. Los GWAS representan un enorme avance tecnológico que colaboro en la identificación de nuevos genes asociados con distintas enfermedades en animales y humanos, ofreciendo a su vez posibilidades de poder desarrollar nuevos tratamientos. En cuanto a la predicción del riesgo global de ciertas afecciones aún no ha mostrado resultados del todo satisfactorios y es un área en el cual son necesarias más investigaciones (Riancho, 2012).

1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existen equinos con determinadas características genéticas que son resistentes a la infección por el virus de Anemia Infecciosa Equina.

1.5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la relación entre la infección con el virus de la AIE y las características genéticas de los caballos de una zona endémica de Argentina en su hábitat natural y condiciones de manejo sanitarias controladas.

1.6. OBJETIVOS PARTICULARES

1.6.1. Evaluar la transmisión de la enfermedad en dos establecimientos para determinar la condición de infectado o no ante la enfermedad a través de la respuesta serológica por la técnica de referencia internacional, Test de Coggins.

1.6.2. Identificar los equinos seropositivos y negativos en dos establecimientos ubicados en una zona endémica con diferentes condiciones de manejo sanitario.

1.6.3. Valorar el rendimiento y el grado de acuerdo de las técnicas de ELISAc y FPA, versus la técnica de referencia.

1.6.4. Redefinir los grupos de estudio según su fenotipo, en infectados (AIE-positivos) y no-infectados (AIE-negativos).

1.6.5. Determinar las características genéticas de los equinos de ambos grupos por medio de marcadores moleculares de tipo SNP.

1.6.6. Realizar un estudio de asociación entre las características genéticas de los grupos infectados (AIE-positivos) y no-infectados (AIE-negativos) por medio de un estudio amplio de genoma (Genome Wide Analysis - GWAS).

II. METODOLOGÍA

2.1. Características de las poblaciones a analizar

El desarrollo de este trabajo se efectuó utilizando un total de 1330 caballos; 137 animales de cruza Quarto de Milla y mestizos, provenientes de dos establecimientos (E1 y E2) de la localidad de San Luis del Palmar, provincia de Corrientes, y 1193 muestras de suero de equinos de la zona noroeste argentino, principalmente de las provincias de Corrientes, Chaco, Formosa y Misiones.

Los animales de E1 y E2 se identificaron *a priori* y se generó una ficha de identificación única de cada animal con datos filiatorios: sexo, año de nacimiento edad aproximada, pelaje, señas individuales, para asegurar la supervisión individual durante el estudio, que incluyó el seguimiento para los controles serológicos, por medio del test de Coggins. Todas las intervenciones realizadas en el establecimiento se realizaron bajo normas de bienestar animal, evitando la iatrogenia y cumpliendo las medidas de bioseguridad. Además, durante el estudio, se aplicaron las medidas sanitarias de desparasitación y vacunación en las manadas. El proyecto de Tesis fue presentado al Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias, siendo aprobado y avalado, Protocolo N°0072/2017. Cada muestra tomada se codificó con una sigla y un número, para la manipulación de las mismas durante todo el trabajo.

2.2 Establecimientos

2.2.1. Establecimiento 1 (E1): Según la anamnesis realizada en el establecimiento en el año 2013, se desconocía el estado serológico de AIE de los equinos, y solo se contaba con información sobre el ingreso de animales seronegativos al rodeo. Con sospechas de la presencia de la enfermedad. En el año 2014 se realizó el análisis serológico a la totalidad de la manada (N=110). Los animales AIE-positivos y AIE-negativos se identificaron para formar dos grupos que convivieron bajo las mismas condiciones de manejo, y durante un periodo de 4 años, se realizó el seguimiento serológico a todos los animales mediante el Test de Coggins.

El seguimiento se realizó por etapas, a saber:

a) **2014:** el primer muestreo a todos los equinos del establecimiento (N=110).

- b) **2015:** re-muestreo de 50 caballos, incluyendo los caballos AIE-seronegativos en 2014 (N = 26), caballos nuevos en el plantel con serología desconocida (N = 4) y animales AIE-seropositivos muestreados en 2014 (N = 20).
- c) **2016:** re-muestreo de los animales negativos en 2015 (N=21)
- d) **2017:** muestreo de animales AIE-seronegativos en 2016 (N=19), caballos nuevos dentro de la población (N=5) y animales AIE-seropositivos al azar de la población equina total con registro de diagnóstico positivo en años anteriores (N=20).

2.2.2. Establecimiento 2 (E2): En este establecimiento el manejo consistió en separar animales AIE-seropositivos de AIE-seronegativos. Tanto el padrillo positivo como las yeguas madres positivas tenían antecedentes de descendencia negativa. Los animales fueron identificados por nombre, sexo y edad, y se llevó el registro de los padres y hermanos de dos cohortes sucesivas. El estado de AIE-negativo de los potrillos se determinó al momento del destete, y fueron separados y llevados a otro rodeo compuesto por animales AIE-negativos. El seguimiento serológico de las dos cohortes mediante el Test de Coggins se realizó como se detalla a continuación:

- a) **2015:** se muestrearon el padrillo y 10 yeguas madres para determinar el estado de AIE.
- b) **2016:** muestreo de los potros nacidos para determinar estado de AIE (N=7) al destete, el mismo fue realizado a los 11 meses de vida de los potros;
- c) **2017:** muestreo de los potros nacidos para determinar estado de AIE (N=9) al destete, el mismo fue realizado a los 8 meses de vida de los potros.

Además, se llevó a cabo el procesamiento de 1193 muestras de equinos de la zona noroeste del país principalmente de las provincias de Corrientes, Chaco, Formosa y Misiones. Las mismas provenían de un laboratorio de red de SENASA. En estos animales (N=114) se analizaron muestras por medio de las técnicas: Test de Coggins, ELISAc y FPA; en tanto que las 1079 muestras restantes se analizaron por medio del test de Coggins y la técnica de FPA.

2.3. Extracción de sangre: Se extrajeron muestras por medio de venopunción yugular con guantes, agujas y jeringas descartables para cada animal. El material descartable utilizado para la extracción fue eliminado de acuerdo a las normativas del servicio de recolección de residuos patológicos que presta servicios a la Facultad de Ciencias

Veterinarias. Para el diagnóstico serológico la extracción de sangre se realizó sin anticoagulante y para extracción de ADN la misma fue recolectada con anticoagulante (EDTA); por otra parte, se obtuvo una muestra de pelos de la cola de cada caballo, los que se almacenaron en sobres de papel madera con su código correspondiente, para la genotipificación con el arreglo de ADN.

2.4. Serología:

El diagnóstico serológico mediante el Test de Coggins de todos los animales en cada muestreo se realizó a partir de la muestra de sangre sin anticoagulante. Además, se aplicaron las técnicas diagnósticas ELISAc y FPA a las muestras del año 2017 y del año 2014 del E1 y todas las muestras tomadas en el E2.

2.4.1. Test de Coggins por la técnica de IDGA: Se llevó a cabo el diagnóstico serológico de todos los muestreos por medio de la técnica de IDGA, ya que es la prueba aprobada como técnica de oro o *Gold Standard* a nivel mundial por la OIE para el diagnóstico de la AIE (OIE, 2004). Esta técnica detecta ACs anti-p26 que se hacen visibles mediante líneas de precipitación que se producen entre el antígeno y el suero del animal enfermo. Se pueden llegar a producir resultados falsos negativos solo en los casos en los que los animales recién iniciaron el proceso de infección y no presentan título de AC suficiente para dar positivos a la prueba por el contrario se puede dar un mal llamado falso positivo a aquellos potrillos que son nacidos de madres seropositivas y han calostrado de la misma, esos AC maternos podrían interferir con el diagnóstico y el potrillo resultar sano. En ambas situaciones los diagnósticos deben ser repetidos. En el caso del animal que recién inicia la enfermedad, transcurridos aproximadamente 15 a 20 días, ya debería dar un resultado positivo. En los potrillos se estima que la interferencia se da hasta los 8 meses de vida (Issel y Cook 1993; OIE 2004).

Procedimiento de la prueba: Para la misma se utilizaron kits comerciales que contenían antígeno rp-26 y control positivo.

- **Obtención de muestras y preparación de análisis:** las muestras de suero se almacenaron refrigerados entre 2° y 8° C, por un máximo de 5 días, o congelados a 20°C por más tiempo. Aquellas con presencia de turbidez, hemólisis o indicios visibles de crecimiento bacteriano que podían interferir con el rendimiento y la exactitud del análisis, no se utilizaron.

- Preparación de las placas de agar: en las placas de Petri se prepararon con una solución de agar noble al 1% en hidróxido de sodio (NaOH) 0,2% y ácido bórico (H₃BO₃) 0,9%, y se almacenaron en heladera (4-8°C), para ser usadas dentro de los 7 días. Se recortan con sacabocado 6 pocillos periféricos alrededor de uno central, todos de 5,3mm de diámetro y separados entre sí por una distancia de 2,4mm.
- Llenado de las placas de incubación: se colocaron 50 ul del suero control positivo AIE en 3 pocillos exteriores en forma alternada (Figura N° 2) y 50 ul del antígeno rp-26 en el pocillo central. En cada uno de los pocillos exteriores vacíos se colocaron 50 ul de las muestras de suero a analizar. Se incubaron las placas en cámara húmeda a temperatura ambiente entre 24-48 horas.

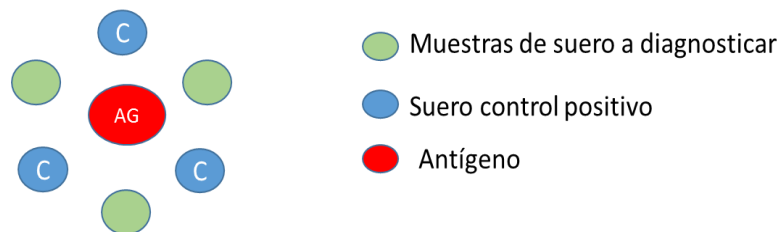


Figura N° 2: Esquema de siembra en el agar.

- Interpretación del resultado: las líneas de precipitación fueron visibles luego de 24 horas, pero se intensificaron luego de 48 horas de incubación, por ello el resultado se determinó al cabo de 48 horas. Las líneas de precipitación debían ser claramente visibles y estar a una distancia equidistante entre los pocillos de antígeno y de suero control positivo. La ausencia de líneas de precipitación entre el pocillo del suero a analizar y el pocillo del antígeno indicó que el suero correspondía a un animal no infectado con VAIE. Si entre el pocillo del antígeno y el pocillo del suero a analizar se formaba una línea de precipitación, que se juntó con la línea de precipitación entre el pocillo del antígeno y el pocillo de suero control positivo, indicaba que la línea de precipitación era una línea de identidad, y que el suero analizado tenía ACs contra VAIE (el animal estaba infectado). Cuando el suero de un animal infectado con VAIE contaba con bajo nivel de ACs, la línea de precipitación entre el pocillo del antígeno y el pocillo del suero control positivo se curvaba muy poco hacia el pocillo del suero a analizar.

2.4.2. Enzimoimmunoensayo de competición (ELISA-c): Existen diferentes tipos de ELISA que han sido elaborados y aprobados a nivel mundial, un ELISA de competición

y tres ELISA de no competición. Para el trabajo se utilizó un kit comercial de ELISAc de laboratorios IDEXX. Este ELISA de competición detecta ACs utilizando un antígeno de AIE purificado y ACs monoclonales frente a la p26 (OIE 2004). La prueba se realiza en placas de microtitulación tapizadas con el AC monoclonal anti p26, el cual se incubaba con el suero equino y el conjugado de antígeno AIE, aquí los ACs séricos compiten por la unión al antígeno p26, con los ACs monoclonales que tapizan la placa. Luego se procede al lavado y posterior agregado del sustrato, van a una segunda incubación para finalmente agregar la solución de frenado (IDEXX - ELISAc - AIE). En las muestras de los equinos que no presentaban ACs frente a la AIE, el antígeno p26 quedaba libre para unirse al AC monoclonal produciendo el color azul intenso en la reacción. En las muestras positivas frente a la AIE pasaba lo contrario por ello había un color azul muy débil o hasta podía llegar a ser incoloro. Al finalizar la prueba se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (ELX 800) con una longitud de onda de 630 nm. La interpretación de los resultados, se realizó teniendo en cuenta el valor y el color del control positivo, entonces aquellas muestras que mostraron una densidad óptica menor o igual al control positivo fueron consideradas positivas y aquellas con una densidad óptica mayor al control positivo fueron consideradas negativas.

Procedimiento de la prueba:

- Preparación de la placa. Con pipeta automática utilizando una punta (tip) y un pocillo por cada suero a procesar, se añadieron 100 µl de cada muestra en los pocillos correspondientes, incluyendo control positivo y control negativo. En todos los pocillos se añadieron 50 µl de conjugado de antígeno de EIAV. Luego se mezcló bien, golpeando en forma suave el soporte unas 10 veces. La incubación se realizó por 30 minutos a 37°C.
- Pasada la incubación, cada pocillo se lavó con un volumen de 350 µl de agua desionizada, mediante el uso de un lavador de placas automático, de 3 a 5 veces. A continuación, se dispensaron 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo. Se mezcló bien golpeando en forma suave el soporte unas 10 veces. La incubación de la placa se realizó por 15 minutos a una temperatura de entre 18 y 25 °C. Cumplido este tiempo se agregó la solución de frenado en cada pocillo.
- Observación del cambio de color. Se utilizó un lector de placas ELX 800, se midió los valores de absorbancia (densidad óptica) de todos los pocillos a una longitud de onda de 640 nm. Resultados: El control negativo tomó color azul oscuro y el control positivo, azul

claro. La densidad óptica del control positivo fue menor o igual a 0,150. La densidad óptica del control positivo fue menor o igual a 70% de la DO del control positivo. Muestra positiva: DO fueron menores o iguales a la DO del control positivo. Muestra negativa: DO fue mayor a la DO del control positivo.

2.4.3. Ensayo de polarización fluorescente (FPA): La prueba de fluorescencia polarizada es una técnica de diagnóstico sencilla y rápida utilizada originalmente para el diagnóstico de Brucelosis. Es un ensayo homogéneo que sólo requiere la adición de un antígeno marcado a las muestras de prueba diluidas adecuadamente. La técnica está basada en la rotación aleatoria de moléculas en solución, y la velocidad está influenciada por el tamaño de las moléculas con una relación de proporcionalidad inversa. Las moléculas grandes (AC-Antígeno-Fluorocromo) emiten mayor luz polarizada en un mismo plano mientras que las más pequeñas (Antígeno-Fluorocromo) rotan más rápido, emitiendo luz despolarizada. (Nielsen *et al.* 2001; Sánchez-Villalobos *et al.* 2010). Para la prueba se utilizó un kit de FPA de BIOTANDIL® el mismo contenía un antígeno conjugado con isocionato de fluoresceína, y un buffer concentrado. Para la determinación se diluyeron 20 µl de cada suero sanguíneo problema en 1 ml de buffer diluido al 5%, tras incubación de 5 minutos se realizó una primera lectura en el equipo (Sentry 200). A esta mezcla se agregaron 20 µl de solución de antígeno y tras 15 min se repitió la lectura. El resultado obtenido por el equipo se expresó en unidades de milipolarización (mP).

Procedimiento para la prueba:

1- Condiciones del laboratorio para realizar la técnica

Ambiente del laboratorio: Temperatura 22°C ±4 °C

Las muestras de sueros para diagnóstico y los reactivos del kit se retiraron de la heladera un tiempo antes de iniciar la técnica para que estos adquieran la temperatura ambiente de 22°C aproximadamente.

Control del ensayo con los sueros control.

2- Técnica

Por cada suero a diagnosticar se preparó un tubo de borosilicato de 12 x 75 mm, además de los tubos específicos para control positivo y negativo.

En cada tubo se colocó 1 ml de buffer diluido, posteriormente se adicionaron 20 µl de cada suero a testear. Se mezcló con vortex y se aguardaron 5 minutos luego de agitado el último tubo. Se realizó la lectura de los blancos en el equipo. A continuación, se

adicionaron 20 µl de la dilución de antígeno. Se mezcló con vortex y se esperaron 15 minutos después de agitado el último tubo. Finalmente se realizó la lectura de la reacción.

Los resultados se expresaron en unidades de milipolarización (mP). El punto de corte estimado en ensayos preliminares fue de 98.6 mP. Todas aquellas muestras que presentaron valores por debajo del mismo fueron consideradas negativas y por encima de ese valor, positivas.

2.5. Estudio genómico:

2.5.1. Selección y preparación de las muestras: Para el análisis a nivel genómico se seleccionaron animales a partir de los muestreos realizados en ambos establecimientos (E1 y E2). Las muestras seleccionadas consistieron en pelos de la cola, y se enviaron en sobres individuales identificados con códigos a Neogen Corporation (Geneseek; Lincoln, NE, EEUU) para la extracción de ADN y genotipificación con el arreglo de mediana densidad GGPEquine65K (Illumina). Para la selección de las muestras, se consideraron, por una parte, el resultado de los tres test serológicos, y por otra parte, las relaciones de parentesco entre los animales. De este modo se conformaron dos grupos definidos con las siguientes características:

2.5.2. Animales del Establecimiento 1: muestras de 40 equinos (27 machos y 13 hembras), de los cuales, se clasificaron en AIE-seropositivos (N=24) y AIE-seronegativos (N=16).

2.5.3. Animales del Establecimiento 2: el grupo familiar de 27 caballos la raza Cuarto de Milla, estaba conformado por 1 padrillo, 10 yeguas madre y 16 productos (cuatro pares de propios hermanos). Se incluyeron muestras de 11 equinos, 1 padrillo, 5 yeguas madre y sus productos (Figura N° 3).

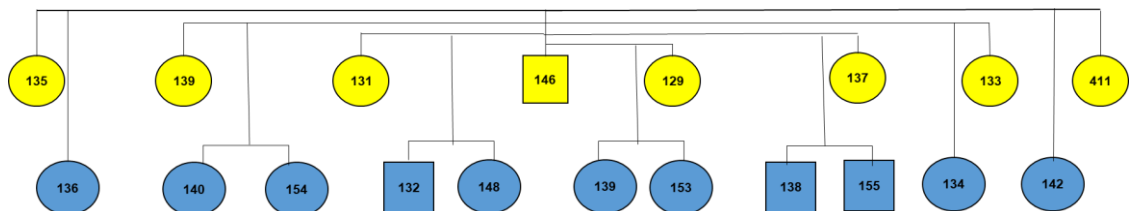


Figura N° 3: representación esquemática de la estructura familiar de los animales seleccionados para la tipificación con el arreglo genómico GGPEquine65K del Establecimiento 2.

2.6. Análisis Estadístico

2.6.1. Serológicos: El análisis se llevó a cabo estadísticamente mediante la estimación de AUC ROC (Área Under Curve ROC – Receiver Operator Characteristic), medida de la eficiencia global de cada técnica (ELISAc/FPA) comparadas con otra de referencia (IDGA). Se obtuvo además el índice de Youden, medida estadística que informa sobre el rendimiento y la calidad de la prueba, cuanto más cercana a 1 se encuentre la prueba es más efectiva (Schisterman, *et al.*, 2005). Se estimó el Intervalo de Confianza (IC – 95%) y se analizaron la Sensibilidad (Se) y Especificidad (Sp) diagnósticas. También se analizaron los datos utilizando el valor de corte óptimo obtenido por el ROC, empleando el programa Win Episcopy 2.0 (Thrusfield *et al* 2001). El cual consistió en obtener el grado de acuerdo y el valor Kappa (acuerdo no debido al azar, $p=0.01$) entre la técnica de IDGA con las técnicas de ELISAc y FPA; este parámetro está considerado como la proporción de resultados coincidentes positivos y negativos entre pruebas. La interpretación de estos coeficientes se realizó siguiendo la escala establecida por De Blas *et al.* (2008) basada en las propuestas por Landis y Koch y por Thrusfield, $(-\infty, 0.0)$ Desacuerdo, $(0.0, 0.2)$ Escaso, $(0.2, 0.4)$ Débil, $(0.4, 0.6)$ Moderado, $(0.6, 0.8)$ Adecuado, $(0.8, 1.0)$ Excelente.

2.6.2. Análisis de datos genómicos.

2.6.2.1 Genotipificación con arreglo de ADN de mediana densidad: Las muestras de pelo de los animales seleccionados se enviaron a Neogen Corporation (Geneseek; Lincoln, NE, EEUU) para la extracción de ADN y genotipificación. Como plataforma de genotipificación se utilizó el microarreglo de mediana densidad GGP Equine70k (Illumina, San Diego, USA) que contiene 71.947 SNPs distribuidos uniformemente y derivados de la colección de EquCab3.0 compilada por *The Broad Institute at MIT and Harvard*. El conjunto de sondas que integran el arreglo fue obtenido a partir de la secuenciación de 7 razas equinas representativas de caballos modernos y ancestrales, y en una segunda generación, presenta sondas con un espaciado promedio de 40 kb distribuidas en los 31 autosomas, validado en 15 razas modernas de caballos con un valor promedio de frecuencia del alelo menor de 0,21 (<https://genomics.neogen.com/en/ggp-equine70k>).

2.6.2.2. Controles de calidad de los datos del arreglo de ADN:

Control de la genotipificación: Los datos crudos obtenidos a partir del microarreglo de SNPs se extrajeron por medio del software GenomeStudio (Illumina) con un umbral mínimo de *GenCall* (GC) de 0,15 (sugerido por el fabricante para productos de tecnología *Infinium*). El valor GC asigna un puntaje mediante el cual se establece un ranking para excluir los genotipos fallidos. Para el análisis inicial de los datos genómicos, de esta manera se obtuvieron los archivos “.PED” (contiene los genotipos) y “.MAP” (contiene la localización genómica de los SNPs). Los controles de calidad subsiguientes y procesamiento de datos se realizó con el software PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007).

Control de calidad de los datos: La calidad global por muestra (*call rate* de muestra) se evaluó aplicando el filtro recomendado a los archivos .PED y .MAP. Este filtro se define como la proporción de genotipos asignados exitosamente por muestra sobre el número total de SNPs del conjunto de datos. Se utilizó un valor mínimo de *call rate* por muestra, para todos los análisis, de 90%, con el parámetro *--mind* 0.10 de PLINK. Así se excluyeron las muestras que no cumplieran con el criterio. Para el control de calidad de los SNPs, se estableció como valor de corte un *call rate* de 95% (parámetro *--geno* 0.05) con el que se filtraron los SNPs con error de genotipado por encima del 5% en el total de las muestras. El set de datos “SET DE DATOS 1” (DS1) quedó conformado por 69.278 SNPs (Figura 4).

2.6.2.3. Análisis de la diversidad genómica : Se utilizaron distintos comandos del programa PLINK (Purcell *et al.*, 2007) para estimar los distintos parámetros genéticos en los caballos analizados, con el uso de los marcadores SNP obtenidos mediante la tipificación con el arreglo de ADN GGPEquine70K. Los parámetros estimados para caracterizar la diversidad genómica, tales como la frecuencia del alelo menor (minor allele frequencies -MAF), heterocigosis esperada (He), heterocigosis observada (Ho), equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), y número de marcadores en desequilibrio. Las estimaciones de diferenciación genética por medio del estadístico *F_{ST}* se realizaron sobre la base del método de Weir y Cockerham (1984). Para el cálculo de medidas básicas de diversidad genómica se utilizó el DS1 y con el software PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007) se determinaron: la heterocigosis esperada (He), equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), estadístico *F* de Wright.

Heterocigosis esperada: la Heterocigosis (H), es un indicador de la variación genética de una población, y representa la probabilidad de que un individuo sea heterocigota para un locus determinado. La H es una medida de la variación genética de la población en estudio y adopta valores entre 0 y 1, y está relacionada con el número de alelos presentes y su frecuencia en la población. Cuanto más próxima sea a 1, mayor será la diversidad genética presente y mayor será la información que aporte el marcador acerca de la transmisión de alelos a la siguiente generación. Las H_e y H_o fueron calculadas mediante el comando (--hwe).

Equilibrio de Hardy-Weinberg: la Ley de equilibrio de frecuencias de Hardy-Weinberg postula que las poblaciones diploides con reproducción sexual, se mantendrán en equilibrio génico luego de un ciclo de apareamiento al azar, si se cumplen las siguientes condiciones: que no exista solapamiento entre generaciones (generaciones discretas); que la población sea panmíctica (los apareamientos ocurren al azar); que el tamaño poblacional sea infinito y ausencia de procesos sistemáticos de provoquen variabilidad en las frecuencias (mutación, migración, selección). Este concepto permite realizar inferencias acerca del comportamiento de las frecuencias génicas y genotípicas de un locus, luego de una generación de apareamiento al azar. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue evaluado mediante el comando (--hwe).

Estadístico F de Wright: los estadísticos F jerárquicos de Sewall Wright (1969), también llamados índices de fijación, describen el nivel de heterocigosis en una población, más específicamente cuánto se reduce la heterocigosis en relación a lo esperado según el equilibrio Hardy-Weinberg. La endogamia puede medirse entonces en términos de la reducción en la proporción de genotipos heterocigotas, es decir, en función de H. De esta manera los estadísticos F también constituyen una medida de la endogamia según la ecuación: $F = (H_o - H_e) / H_o$. Los coeficientes individuales de consanguinidad (F) fueron estimados utilizando el comando (--het) de PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007).

Desequilibrio de ligamiento: el desequilibrio de ligamiento se define como la asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci diferente, y se evidencia por una alteración en las frecuencias esperadas según la 2ª Ley de Mendel (transmisión independiente). Físicamente, el LD se debe a dos alelos ubicados muy próximos entre sí haciendo muy poco probable la ocurrencia de recombinación, lo que lleva a que se hereden juntos. La variación del LD fue evaluada mediante el cálculo del valor de r^2 (Hill

and Robertson, 1968) entre todos los pares de SNPs en cada cromosoma, tomando distancias entre 100 y 1.000 Kb, en ventanas de a 100 Kb mediante los comandos `--r2` y `--ld-window-kb` de PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007). Mediante el parámetro `--recode tab` de PLINK se generaron los archivos `.ped` y `.info` de cada cromosoma, los cuales se utilizaron para visualizar los haplotipos mediante la función del gráfico LD del programa Haploview (Barret *et al.*, 2005). El análisis se realizó por cromosoma debido a la gran cantidad de información que implica un elevado costo computacional. Para estos análisis se utilizó el “SET DE DATOS 2” (DS2), conteniendo 60.717 SNPs (Figura N° 4).

2.6.2.4. Análisis de asociación (GWAS)

La asociación de genoma amplio (GWAS) se evaluó mediante el análisis de asociación de marcadores únicos (*single marker association*) y asociación de bloques haplotípicos (*association block*) implementados en el programa Haploview. El análisis se realizó en cada cromosoma de forma individual, y se aplicó el filtro por alelo menor del 5% (`--maf 0.05`) al DS 1 generando nuevos archivos `.PED` e `.INFO` para cada cromosoma, con los parámetros `--recode --hv.chrxx` de PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007) (Figura N° 4).

2.6.2.5 Análisis funcional y enriquecimiento génico

El porcentaje de enriquecimiento génico en los cromosomas equinos se calculó como se describió en Ghosh *et al.*, (2014). El análisis del contenido de genes en las regiones que mostraron valores-p altos ($p < 0,0001$) se realizó con el programa BioMart (Kasprzyk *et al.*, 2011) y utilizando la base de datos Ensembl Genes 106 - Horse (EquCab 3.0). Además, se implementó la minería de datos manual como análisis complementario del enriquecimiento de genes usando el buscador NCBI Genome Data Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>).

La lista de genes recuperada con BioMart se analizó en el sistema de clasificación PANTHER (del inglés *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) (Mi *et al.*, 2016) con el fin de agrupar y clasificar los genes según la función molecular, el proceso biológico y la clase proteica. En los casos en que los genes equinos no presentaran anotación en la base de datos *Gene Ontology* (GO), se convirtió la lista de genes equinos ENSEMBL obtenida fue convertida a su ortólogo humano ENSEMBL usando el software Biomart. El análisis de GO y de vías metabólicas se realizó con el software DAVID v6.7

(del inglés *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (Huang et al., 2009a, 2009b).

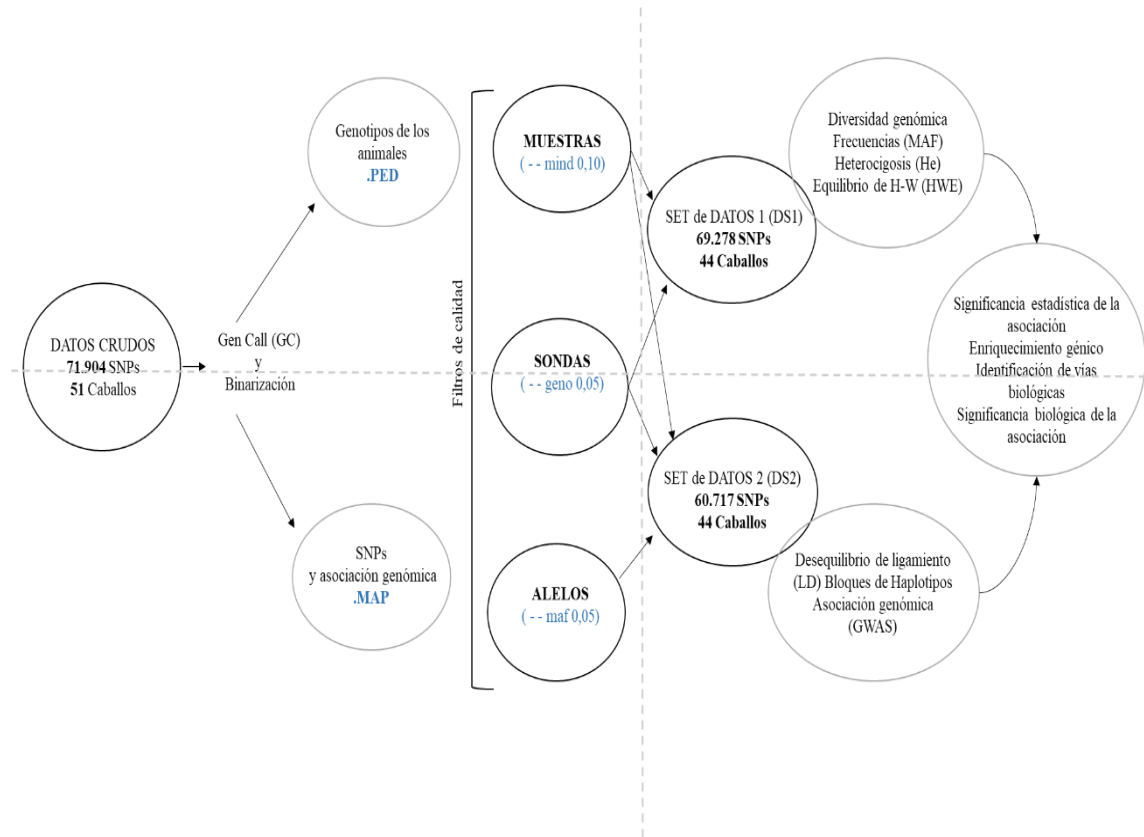


Figura N° 4. Flujo de trabajo para el análisis de los datos genómicos obtenidos con el arreglo de mediana densidad GGPEquine70K en 51 caballos.

III. RESULTADOS

3.1. Establecimientos

Se obtuvieron muestras de 146 animales, las mismas fueron extraídas en diferentes etapas del ensayo, observándose los siguientes resultados; en el año 2014 al realizar el primer muestreo para conocer el estado real del establecimiento E1 frente a la enfermedad se muestrearon 110 equinos, por medio del test de Coggins, de los cuales 84 resultaron ser seropositivos y 26 seronegativos, obteniendo una prevalencia del 76,4% de la enfermedad. En los años subsiguientes se realizó seguimiento principalmente sobre los animales seronegativos, donde se pudo observar cómo fueron disminuyendo. De los 26 seronegativos detectados en 2014 solo se encontraron 12 en el año 2017.

En el E2 se analizaron un total de 11 muestras en el año 2015, las cuales pertenecían a las 10 hembras de la manada y un macho, todos fueron seropositivos al test de Coggins. En el año 2016 se muestreo una primera camada de siete potrillos de 11 meses de vida, los que dieron negativos al test de Coggins. En el año 2017 se muestreo una segunda camada de nueve potrillos con ocho meses de vida, los resultados arrojaron ocho potrillos seronegativos y uno seropositivo, se procedió a tomar una segunda muestra de ese animal al año de vida y repetir el diagnóstico, el cual resultó ser negativo. A partir de los tests serológicos obtenidos y posterior caracterización de la condición serológica (positivos/negativos), se observó la transmisión vertical de madres a hijos.

Para evaluar la transmisión horizontal se tomaron muestras de 19 equinos en el periodo comprendido entre los años 2014 donde los resultados fueron negativos y 2017, las mismas se procesaron por las tres técnicas diagnósticas en ambos casos, test de Coggins, FPA y ELISAc (tabla N°1 ANEXO). Durante el año 2014 la totalidad de las muestras fueron negativas a todas las técnicas. En el año 2017, diez de las muestras dieron negativo al test de Coggins y siete positivos concordando con las otras técnicas, y dos de las muestras (MZ002 y MZ019) arrojaron resultados diferentes entre las técnicas, mostrando resultado negativo a Coggins y FPA pero positivo a ELISAc (Figuras N° 5 y 6).

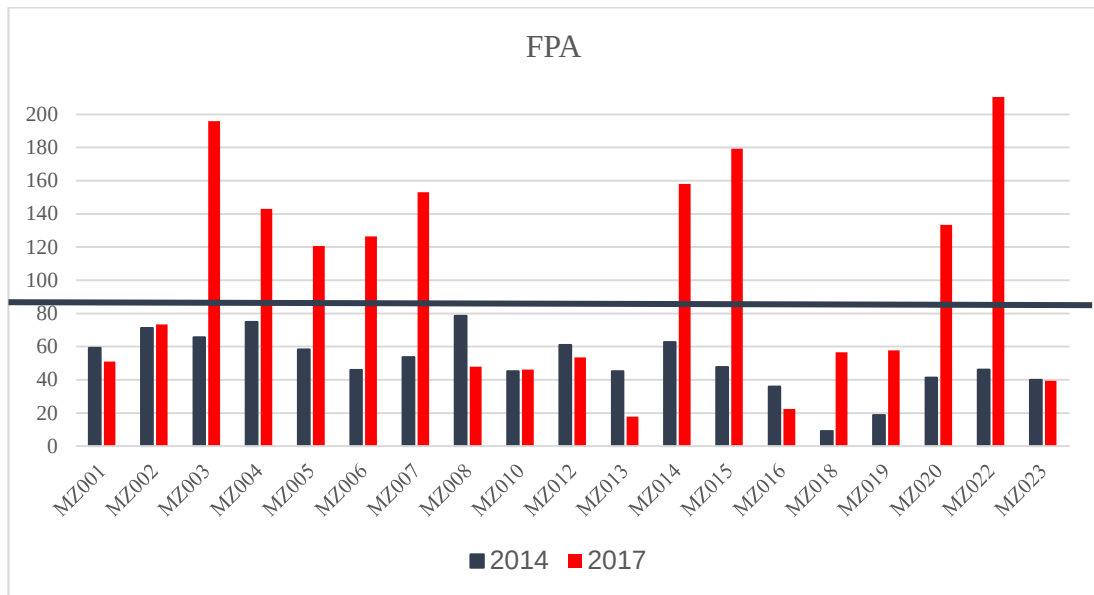


Figura N° 5: Resultados de 19 muestras de equinos, las barras azules son las obtenidas durante el año 2014 y las barras rojas en el año 2017 todas fueron procesadas por la técnica de FPA. La línea azul indica el punto de corte establecido por los análisis ROC.

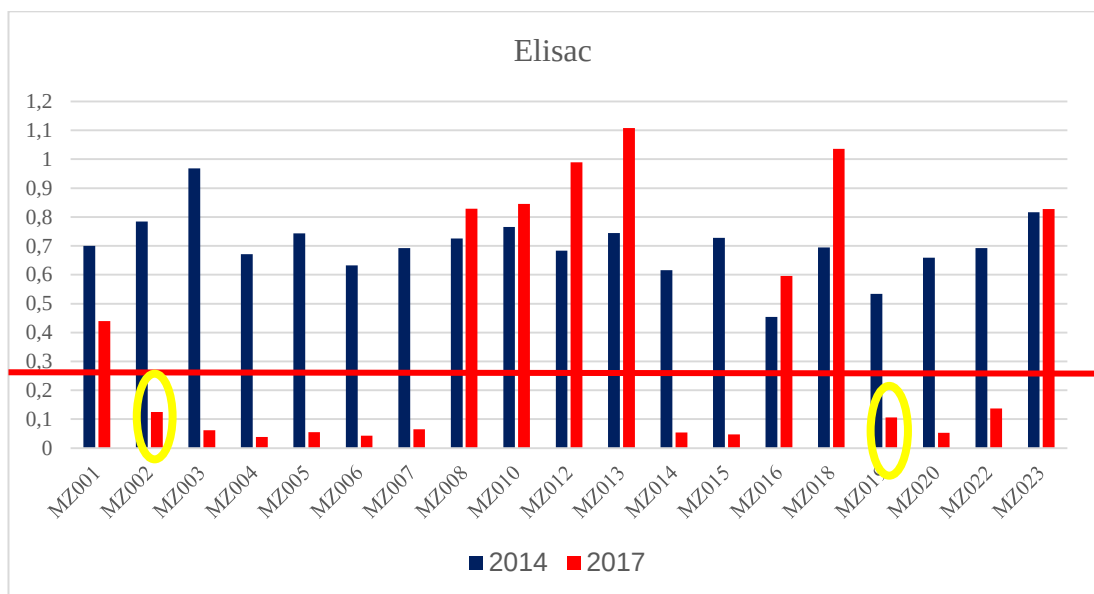


Figura N° 6: Resultados de 19 muestras de equinos analizadas por la técnica de ELISAc de 2014 barras azules y 2017 barras rojas. La línea roja indica el punto de corte para el ELISAc establecido por el análisis ROC. Los círculos amarillos indican las muestras que arrojaron resultados diferentes a los otros dos diagnósticos.

3.2. Serología:

En la tabla N°2 se observan los resultados obtenidos de la serología realizada en ambos establecimientos por medio de las técnicas de ELISAc y FPA (tablas N° 2 y 3 ANEXO). Las muestras analizadas del E1 corresponden al último muestreo (n=44/2017), del E2 se procesó la totalidad de las muestras (n=27/11 padres y 16 productos).

Tabla N°2: Resultados obtenidos por establecimiento con los tres test serológicos realizados sobre 71 muestras.

	E1		E2		TOTAL	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Test de COGGINS	27	17	12	15	39	32
FPA	27	17	13	14	40	31
ELISAc	28	16	11	16	39	32

Los resultados del análisis ROC con una confianza del 95% entre el Test de Coggins y FPA se muestran en la tabla N° 3 y entre el Test de Coggins y ELISAc en la tabla N° 4. El análisis ROC entre el Test de Coggins y la técnica de FPA estableció un punto de corte de 98.6 mP, obteniendo 39 muestras positivas para Coggins y 40 para la técnica de FPA.

Tabla N° 3: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el FPA de los E1, E2 y del total de las muestras (E1yE2), con software MedCalc.

	Cantidad de muestras	FPA Punto de corte (mP)	Test de Coggins		FPA (+)	AUC (95%IC)	Se (%)	Sp (%)	IY
			(+)	(-)					
E1	44	>83	27	17	27	1	100	100	1
E2	27	>98.6	12	15	13	0.994	100	93,3	0,93
Total	71	>98.6	39	32	40	0,997	100	96,87	0,97

AUC: Área debajo de la curva, IC: Intervalo de Confianza, Se: Sensibilidad, Sp: Especificidad, IY: índice de Youden,

El análisis ROC entre el Test de Coggins y ELISAc reveló un punto de corte de 0,272 DO para la totalidad de las muestras de las 39 muestras positivas para Coggins, 39 resultaron positivas para cELISA.

Tabla N° 4: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el ELISAc de los E1, E2 y del total de las muestras (E1yE2), con software MedCalc.

	N° de muestras	ELISAc DO	Test de Coggins		ELISAc +	AUC (95%IC)	Se (%)	Sp (%)	IY
			+	-					
E1	44	<=0,15	27	17	28	0.97	88,9	100	0.88
E2	27	<=0,272	12	15	11	0.92	91,6	93,3	0,85
Total	71	<=0,272	39	32	39	0.95	92,3	87,5	0.79

AUC: Área debajo de la curva, IC: Intervalo de Confianza, Se: Sensibilidad, Sp: Especificidad, IY: índice de Youden,

Las distribuciones de las muestras positivas y negativas junto con el análisis ROC correspondiente comparando el Test de Coggins con el FPA y el Test de Coggins con ELISAc se muestran en las figuras N° 7 y 8 respectivamente. El diagrama de puntos muestra los resultados de mP obtenidos de animales positivos y negativos a la técnica de referencia. Considerando como punto de corte el valor de 98.6 mP o 0.272 de densidad óptica para la técnica de ELISAc, el FPA mostró un nivel de sensibilidad y especificidad mayor que el ELISAc. En la figura N° 9 se muestra un análisis ROC comparando ambas técnicas con el Test de Coggins y en la misma podemos apreciar como la técnica de FPA muestra mejor rendimiento que la técnica de ELISAc

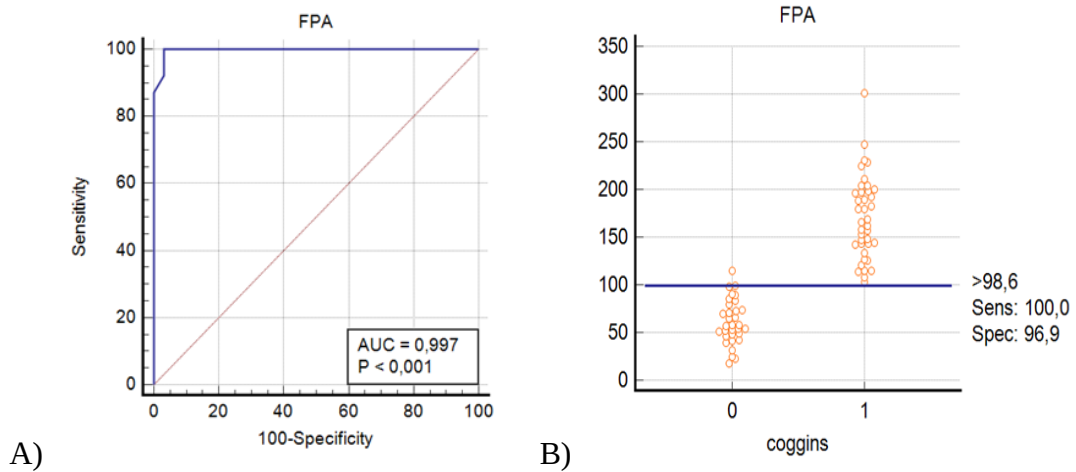


Figura N° 7: Análisis ROC entre la técnica de FPA y el Test de Coggins. A) Especificidad y sensibilidad obtenida para la técnica de FPA. B) Distribución de las muestras positivas (1) y negativas (0) al Test de Coggins en función del valor de mP obtenido. La línea horizontal indica el punto de corte óptimo obtenido en el análisis ROC.

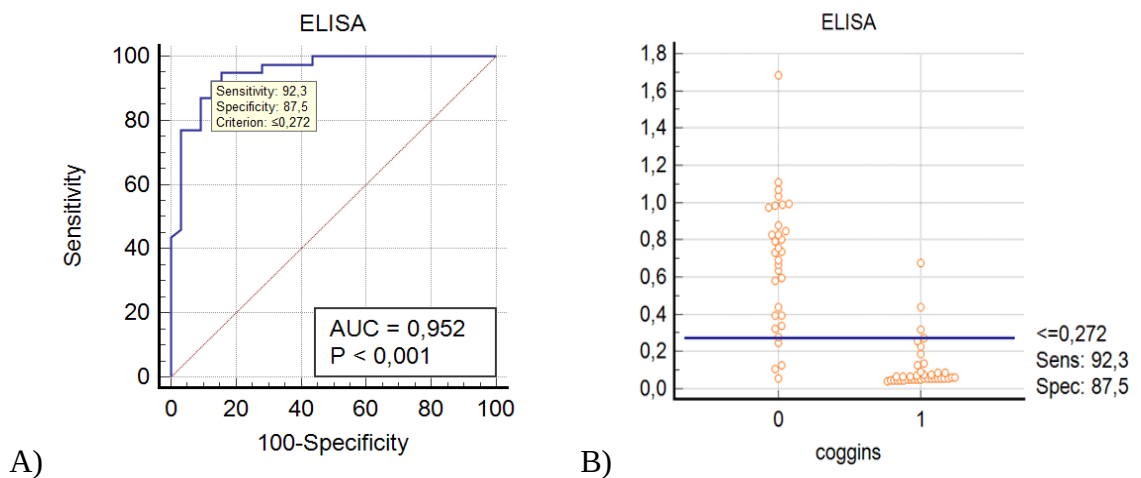


Figura N° 8: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc y el Test de Coggins. A) Especificidad y sensibilidad obtenida para la técnica de ELISAc. B) Distribución de las muestras positivas (1) y negativas (0) al Test de Coggins en función del valor de densidad óptica obtenida (0,27). La línea horizontal indica el punto de corte óptimo obtenido en el análisis ROC.

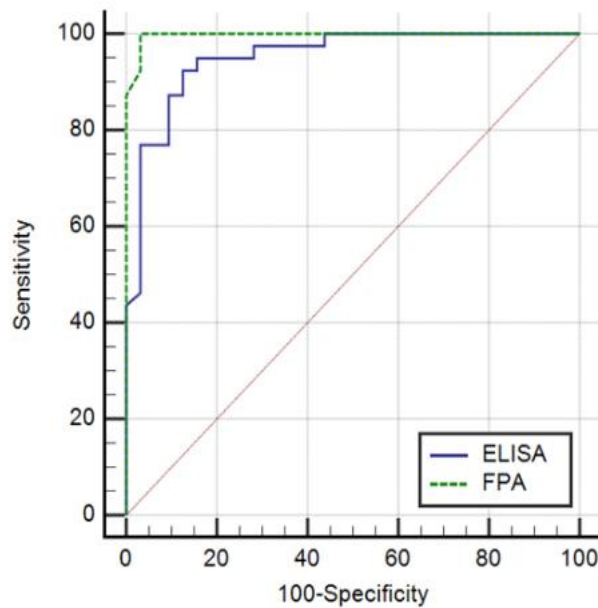


Figura N° 9: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc, FPA y el Test de Coggins. Especificidad y sensibilidad obtenida para ambas técnicas.

Para realizar el análisis de concordancias primero se elaboraron tablas de contingencia que resumen los resultados obtenidos al aplicar en forma simultánea el Test de Coggins y las pruebas a evaluar, FPA y ELISAc. Las mismas se realizaron por establecimiento y sobre el total de muestras del ensayo (tablas, 5 y 6), teniendo en cuenta los puntos de cortes de cada técnica establecidos por el análisis ROC ya mencionado.

Tabla N°5: Tabla de contingencia para la evaluación del FPA frente al Test de Coggins sobre el total de las muestras.

		Test de Coggins		
		Positivo	Negativo	Total
FPA	Positivo	39	1	40
	Negativo	0	31	31
	Total	39	32	71

Tabla N°6: Tabla de contingencia para la evaluación del ELISAc frente al Test de Coggins sobre el total de las muestras.

		Test de Coggins		
		Positivo	Negativo	Total
cELISA	Positivo	35	4	39
	Negativo	4	28	32
	Total	39	32	71

Las concordancias entre las técnicas de FPA y ELISAc comparándolas con el Test de Coggins con un nivel de confianza del 95%, se expresaron como coeficientes Kappa en la tabla N°7. La correlación entre el Test de Coggins y FPA fue excelente. En cambio, entre el Test de Coggins y ELISAc fue adecuado.

Tabla N°7: Concordancias expresadas en valor Kappa entre las técnicas Test de Coggins y FPA y entre Test de Coggins y ELISAc de sueros equinos.

	Test de Coggins - FPA (Kappa)	Test de Coggins - ELISAc (Kappa)
E1	1.00	0.76
E2	0.93	0.77
Total de muestras	0.93	0.77

Los resultados de las 1193 muestras pertenecientes al noroeste del país se analizaron por separado, primero las 114 muestras procesadas por las tres técnicas diagnósticos resultados expuestos en la tabla N° 8 y por otra parte 1079 procesadas por las técnicas de Coggins y FPA resultados expuestos en la tabla N° 9 (tabla N°4 ANEXO).

Tabla N° 8: Resultados de las 114 muestras procesadas por medio de las técnicas de Coggins, ELISAc y FPA.

	Test de Coggins		FPA		ELISAc	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Laboratorio de Red	38	76	35	79	38	76

Tabla N° 9: Resultados de las 1079 muestras procesadas por medio de las técnicas de Coggins y FPA

	Test de Coggins		FPA	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Laboratorio de Red	528	551	481	598

Para las 114 muestras analizadas por las tres técnicas los resultados del análisis ROC con una confianza del 95% entre el Test de Coggins y FPA se muestran en la tabla N°10 y entre el Test de Coggins y ELISAc en la tabla N°11.

El análisis entre el Test de Coggins y la técnica de FPA estableció un punto de corte de 78,5 mP. Empleando este criterio se observó 38 muestras positivas para Coggins y 42 para la técnica de FPA. El AUC reveló que la prueba tuvo un rendimiento global muy bueno con una sensibilidad de 97,4 % y una especificidad del 93,4 %. El índice de Youden obtenido fue de 0.90.

Las distribuciones de las muestras positivas y negativas junto con el análisis ROC correspondiente comparando el Test de Coggins con el FPA se muestran en la figura N° 10. El diagrama de puntos muestra los resultados de mP obtenidos de animales positivos y negativos a la técnica de referencia.

Tabla N° 10: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el FPA en 114 sueros equinos de un laboratorio de Red.

N° de muestra	FPA (mP)	Test de Coggins		FPA +	AUC (95%IC)	Se (%)	Sp (%)	IY
		+	-					
114	>78,5	38	76	35	0,977	97,4	93,4	0,90

AUC: Área debajo de la curva, IC: Intervalo de Confianza, Se: Sensibilidad, Sp: Especificidad, IY: índice de Youden,

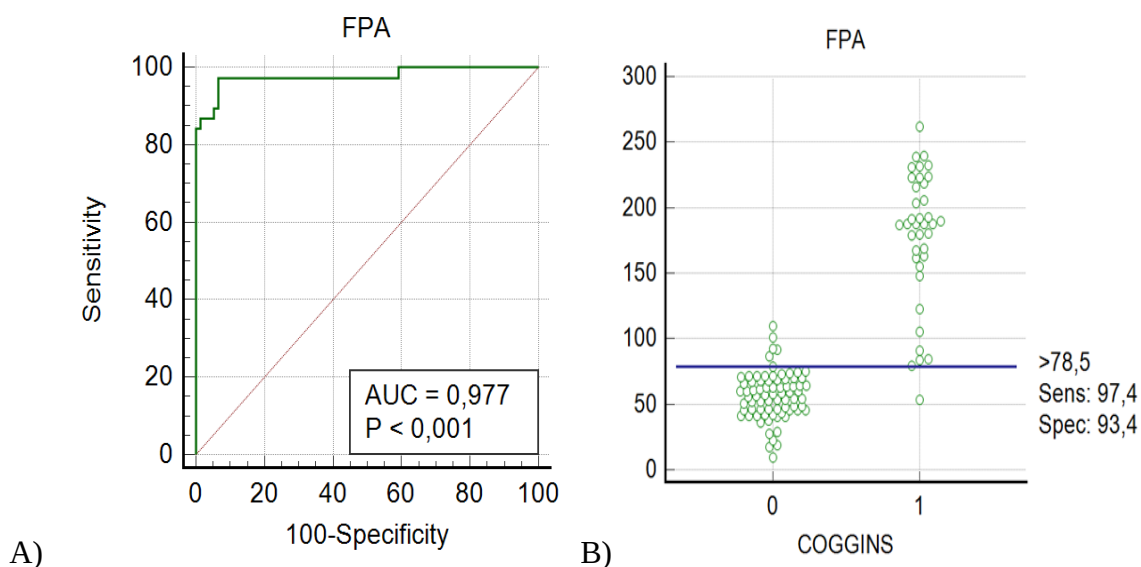


Figura N° 10: Análisis ROC entre la técnica de FPA y el Test de Coggin's. A) Especificidad y sensibilidad obtenida para la técnica de FPA. B) Distribución de las muestras positivas (1) y negativas (0) al Test de Coggin's en función del valor de mP obtenido. La línea horizontal indica el punto de corte óptimo obtenido en el análisis ROC.

El análisis ROC entre el Test de Coggin's y ELISAc reveló un punto de corte de 0,299 DO con una sensibilidad del 94,7 % y una especificidad del 100%, teniendo en cuenta el punto de corte establecido por el análisis de las 38 muestras positivas para Coggin's, 36 resultaron positivas para ELISAc. El AUC obtenido fue de 0.996 y el índice de Youden fue de 0.94.

Las distribuciones de las muestras positivas y negativas junto con el análisis ROC correspondiente comparando el Test de Coggin's con el ELISAc se muestran en la figura N° 11. El diagrama de puntos muestra los resultados de DO obtenidos de animales positivos y negativos a la técnica de referencia.

Tabla N°11: Análisis ROC entre el Test de Coggin's y ELISAc en 114 sueros equinos de un área enzoótica.

N° de muestras	cELISA DO	Test de Coggin's		cELISA +	AUC (95%IC)	Se (%)	Sp (%)	IY
		+	-					
114	<=0,299	38	76	38	0.996	94,7	100	0.94

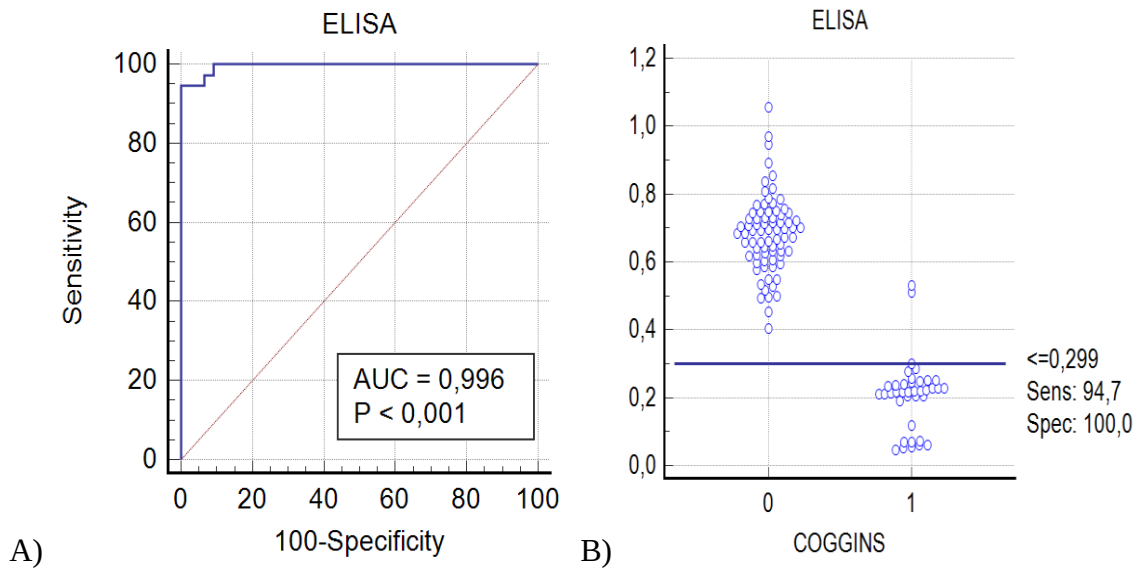


Figura N° 11: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc y el Test de Coggins. A) Especificidad y sensibilidad obtenida para la técnica de ELISAc. B) Distribución de las muestras positivas (1) y negativas (0) al Test de Coggins en función del valor de DO obtenida. La línea horizontal indica el punto de corte óptimo obtenido en el análisis ROC.

En la figura N° 12 se muestra un análisis ROC comparando ambas técnicas con el Test de Coggins y en la misma podemos apreciar como ambas técnicas muestran rendimiento muy similar.

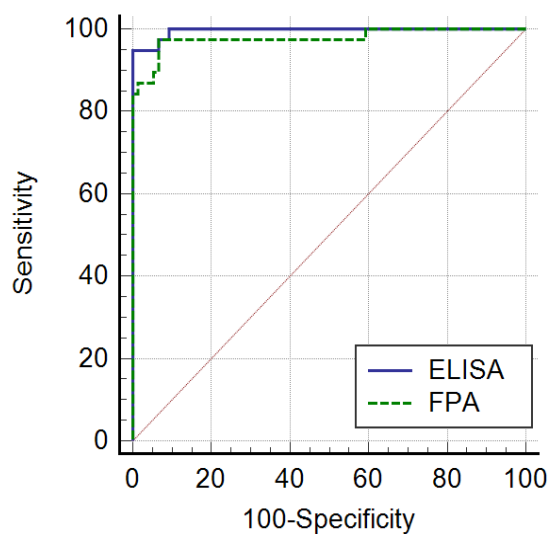


Figura N°12: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc, FPA y el Test de Coggins. Especificidad y sensibilidad obtenida para ambas técnicas.

Para realizar el análisis de concordancias de las 114 muestras de suero procesadas por las tres técnicas se elaboraron tablas de contingencia que resumen los resultados obtenidos al aplicar en forma simultánea la prueba de Oro en este caso el Test de Coggins y las pruebas a evaluar, FPA y ELISAc teniendo en cuenta los puntos de corte del análisis ROC obtenidos para cada técnica. Los mismos se muestran en las tablas N° 12 y 13.

Tabla N°12: Tabla de contingencia para la evaluación de la técnica de FPA frente al Test de Coggins, sobre un total de 114 muestras.

		Test de Coggins		
		Positivo	Negativo	Total
FPA	Positivo	37	5	42
	Negativo	1	71	72
	Total	38	76	114

Tabla N°13: Tabla de contingencia para la evaluación de la técnica de ELISAc frente al Test de Coggins, sobre un total de 114 muestras

		Test de Coggins		
		Positivo	Negativo	Total
ELISAc	Positivo	36	0	36
	Negativo	2	76	78
	Total	38	76	114

Las concordancias entre las técnicas de FPA y ELISAc comparándolas con la de referencia Test de Coggins con un nivel de confianza del 95%, arrojaron valor kappa de 0,88 entre Test de Coggins-FPA y de 0,96 entre Test de Coggins-ELISAc. La correlación entre las mismas fue excelente, mostrando una mayor performance entre las dos últimas. Para las 1079 muestras analizadas por las técnicas de Coggins y FPA los resultados del análisis ROC con una confianza del 95% se muestran en la tabla N°14.

El análisis entre el Test de Coggins y la técnica de FPA estableció un punto de corte de 81,5 mP, empleando este criterio se observó 528 muestras positivas para Coggins y 567 para la técnica de FPA. El AUC reveló que la prueba tuvo un rendimiento global muy bueno con una sensibilidad de 93,7 % y una especificidad del 96,9 %. El índice de Youden obtenido fue de 0.90.

Las distribuciones de las muestras positivas y negativas junto con el análisis ROC, comparando el Test de Coggins con el FPA se muestran en la figura N° 13. El diagrama de puntos muestra los resultados de mP obtenidos de animales positivos y negativos a la técnica de referencia.

Tabla N°14: Análisis ROC entre el Test de Coggins y el FPA en 1079 sueros equinos de un laboratorio de Red.

N° de muestras	FPA (mP)	Test de Coggins		FPA +	AUC (95%IC)	Se (%)	Sp (%)	IY
		+	-					
1079	>81,5	528	551	567	0,977	93,7	96,9	0,90

AUC: Área debajo de la curva, IC: Intervalo de Confianza, Se: Sensibilidad, Sp: Especificidad, IY: índice de Youden,

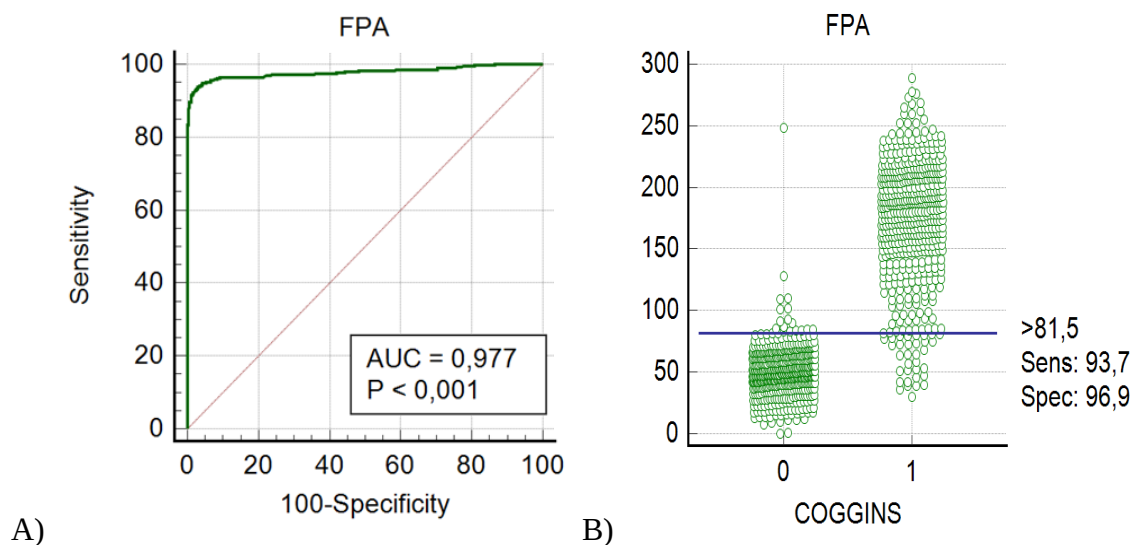


Figura N° 13: Análisis ROC entre la técnica de FPA y el Test de Coggins. A) Especificidad y sensibilidad obtenida para la técnica de FPA. B) Distribución de las muestras positivas (1) y negativas (0) al Test de Coggins en función del valor de mP obtenido. La línea horizontal indica el punto de corte óptimo obtenido en el análisis ROC.

Para el análisis de concordancias de las 1079 muestras de sueros analizadas por las técnicas de Test de Coggins y FPA se realizó una tabla (tabla N°15) de contingencia donde se pueden observar los resultados de ambas técnicas.

Tabla N°15: Tabla de contingencia de 1079 muestras para la evaluación de la técnica de FPA frente al Test de Coggins.

		Test de Coggins		
		Positivo	Negativo	Total
FPA	Positivo	495	17	512
	Negativo	33	534	567
	Total	528	551	1079

La concordancia entre la técnica de FPA comparándola con el Test de Coggins con un nivel de confianza del 95%, arrojaron un valor Kappa de 0,90.

3.3. Estudio genómico

3.3.1 Definición de Fenotipos

El rasgo fenotípico para cada animal de los establecimientos E1 y E2, se definió mediante el análisis conjunto de los resultados obtenidos con los tests diagnósticos utilizados para determinar el estatus sanitario de los caballos: Test de Coggins, ELISAc y FPA. Para la tipificación con el array se incluyeron 40 caballos del E1, 24 seropositivos y 16 seronegativos (Figura N°14 a y b). En el E2, además, se tuvieron en cuenta los lazos familiares, por lo que la muestra quedó representada por cinco tríos (Figura N°15), cada uno formado por el padrillo, una madre y un producto (N=11). En la figura N° 16, se grafican los valores de referencia a partir de los que se fijaron los criterios de selección para incluir o excluir los animales en el análisis de asociación.

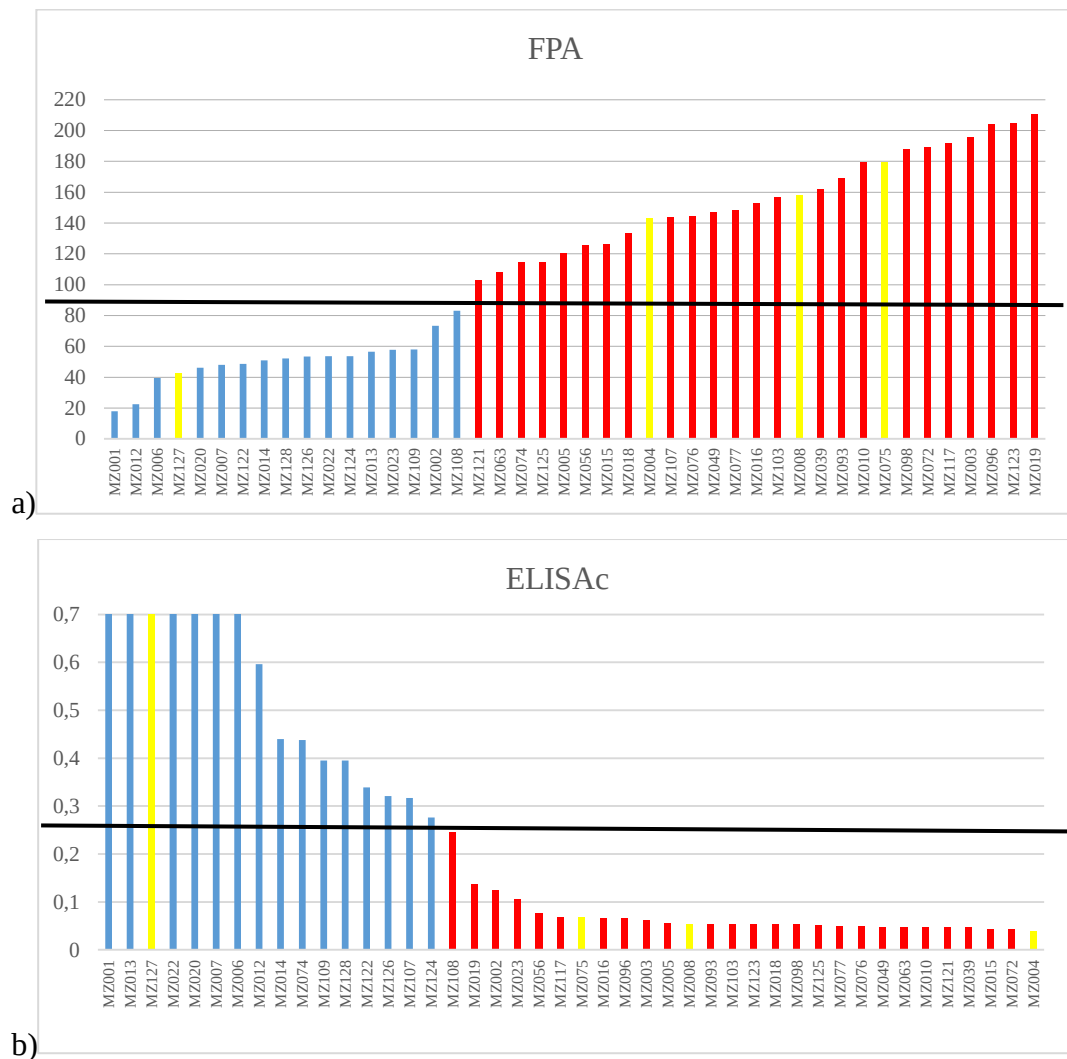


Figura N° 14: Criterios de definición por fenotipos de AIE (seropositivos y seronegativos) para tipificación genómica en los 40 equinos (24 seropositivos y 16 seronegativos) del E1. Los resultados seropositivos están representados con barras de color rojo y los seronegativos se indican con barras de color celeste; las barras amarillas son aquellas que quedaron excluidas del análisis, tanto Coggins como a) FPA y b) ELISAc. El punto de corte se indica con una línea negra horizontal.

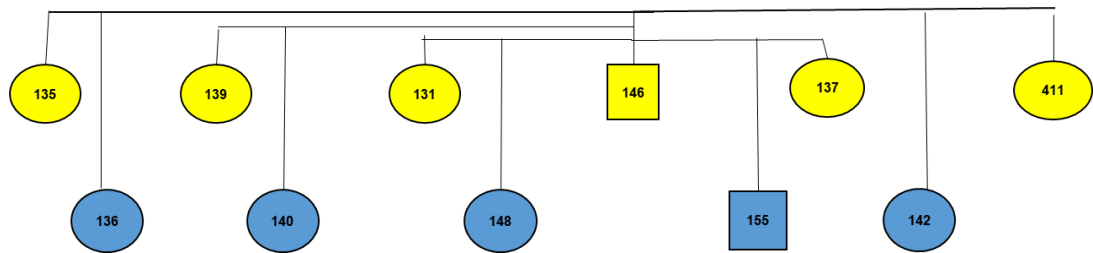


Figura N°15: Representación esquemática de la estructura familiar de los animales seleccionados para la tipificación del E2.

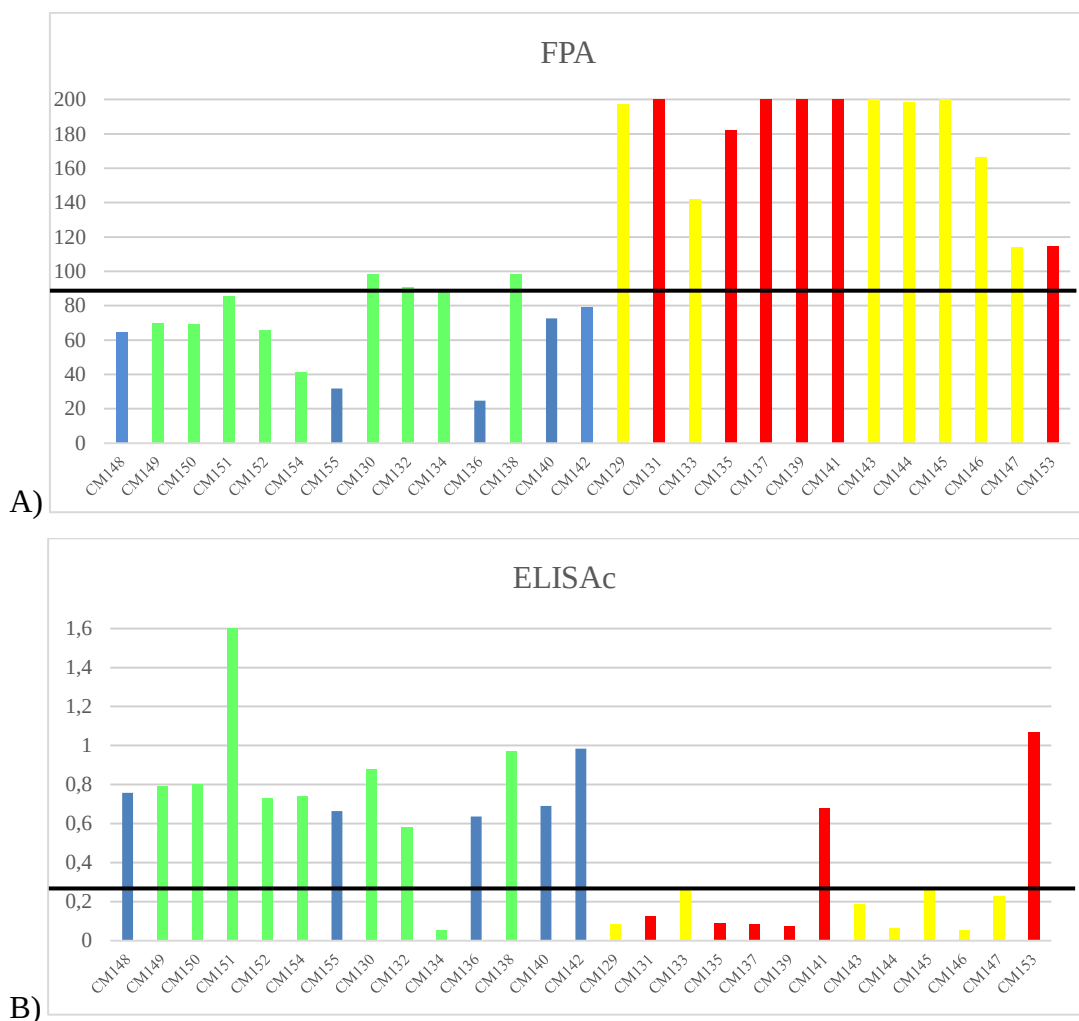


Figura N°16: Criterios de definición por fenotipos de AIE seropositivos (barras rojas) y seronegativos (barras celestes) para tipificación genómica en los 11 equinos (1 padre, 5 madres y sus 5 respectivos productos) del E2 (los individuos representados por barras verdes y amarillas quedaron excluidos de la tipificación). Las líneas negras indican el punto de corte para las técnicas ELISAc y FPA.

3.3.2 Control de calidad de la genotipificación.

Los datos obtenidos por medio de la tipificación genómica de 51 caballos con el microarreglo de mediana densidad GGPEequine70K (71.947 SNPs), se sometieron al proceso de filtrado, realizando los controles de calidad de la genotipificación y de los datos genómicos.

Para el filtrado de individuos se definió como valor de corte para todos los análisis un *call rate* mínimo de 90% (--mind 0.10) es decir, se excluyeron los individuos con menos del 90% de éxito de genotipado. Para el filtrado de SNPs, se excluyeron los SNPs (7.802) con error de genotipado >5% (--geno 0.05). Con estos parámetros, N=44 caballos pasaron el control de calidad; 35 animales corresponden al E1 y 9 al E2. De esta manera, se definió el “DATASET 1” (DS1) conteniendo 57.942 SNPs en 44 caballos. En la Tabla N°16 se indica el número de SNPs observado y la tasa de genotipado global por cromosoma. Los cálculos y filtros aplicados no incluyen al cromosoma X.

Tabla N°16. Número de SNPs resultantes de la tipificación con el arreglo de ADN GGPEequine70K. Se indica el número de SNPs totales por cromosoma, que pasaron los filtros de calidad (QC) y la tasa de genotipado (*total genotyping rate*).

Cr	SNPs por Cr	SNPs (QC)	SNPs removidos	Tasa de genotipado
ECA 1	5217	4538	679	0,996105
ECA 2	3672	3256	416	0,996633
ECA 3	3333	2967	366	0,997429
ECA 4	3153	2804	349	0,996778
ECA 5	2970	2600	370	0,997268
ECA 6	2534	2249	285	0,995623
ECA 7	2796	2480	316	0,996448
ECA 8	2831	2502	329	0,996227
ECA 9	2493	2213	280	0,995961
ECA 10	2508	2227	281	0,996692
ECA 11	1860	1622	238	0,996579
ECA 12	933	817	116	0,995713
ECA 13	1187	1003	184	0,992992
ECA 14	2835	2431	404	0,995302

ECA 15	2753	2433	320	0,996566
ECA 16	2620	2295	325	0,996955
ECA 17	2415	2153	262	0,996499
ECA 18	2346	2095	250	0,996357
ECA 19	1822	1588	234	0,995684
ECA 20	1884	1687	197	0,996381
ECA 21	1782	1562	220	0,995549
ECA 22	1470	1281	189	0,995602
ECA 23	1605	1437	168	0,996502
ECA 24	1488	1300	188	0,99583
ECA 25	1140	1003	137	0,996252
ECA 26	1097	994	103	0,996768
ECA 27	1173	1051	122	0,995873
ECA 28	1333	1139	194	0,997357
ECA 29	907	795	112	0,99792
ECA 30	892	801	91	0,995618
ECA 31	695	619	76	0,996403
Total	65744	57942	7802	0,996254

3.3.3. Diversidad Genómica

La diversidad genómica estimada como heterocigosis esperada, se calculó para el total de animales por cromosoma, y para los grupos de animales seropositivos y seronegativos (Tabla N°5 ANEXO). El conjunto de datos genómicos obtenidos para todos los caballos, reveló valores de diversidad, medida como heterocigosis esperada, de $He = 0,3221$, y varió entre $He = 0,3342$ (cromosoma 26) y $He = 0,3033$ (cromosoma 13). La heterocigosis de mayor valor se observó en el grupo de animales seropositivos ($He = 0,3334$) en el cromosoma 26, y en los seronegativos ($He = 0,3248$) en el cromosoma 31. Los valores menores de heterocigosis genómica se observaron en el cromosoma 13, tanto para el grupo seropositivo ($He = 0,3006$) como en el grupo seronegativo ($He = 0,2944$). En la Figura N°17 se muestran los valores de He estimados por cromosoma, indicando las estimaciones en los grupos seropositivo y seronegativo.

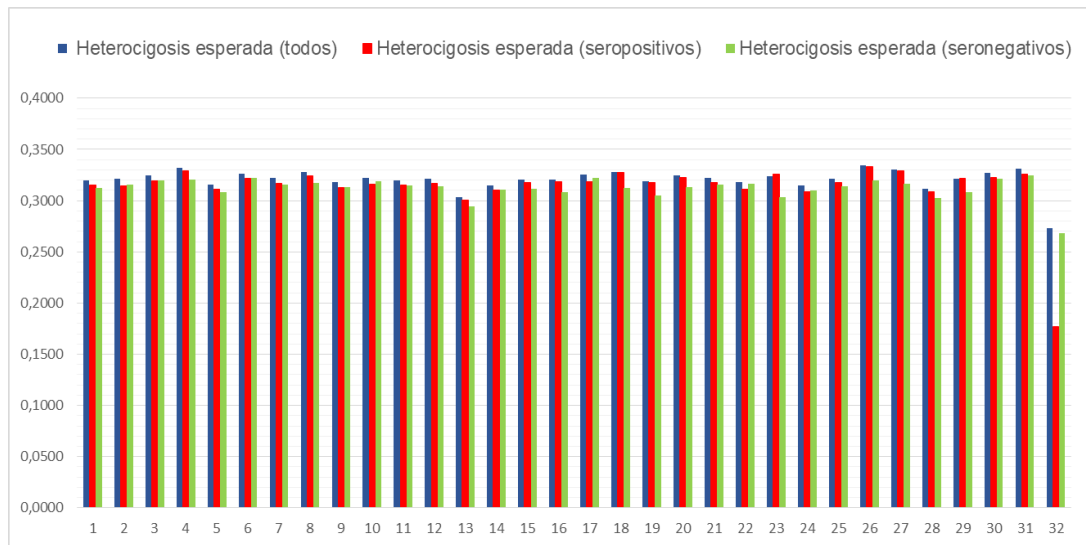


Figura N°17: Valores de Diversidad genómica (H_e) estimada en cada cromosoma. En la figura se indican los valores de los animales seropositivos (barras rojas), seronegativos (barras grises) y del conjunto de animales (barras azules).

3.3.4 Estadísticos F de Wright.

El índice F_{ST} representa una medida de la reducción promedio en la heterocigosis de una subpoblación debido a la deriva génica, y se estimó para evaluar el efecto de la subdivisión de la población. El mayor valor de diferenciación genética se observó en el cromosoma 25 ($F_{ST} = 0,05831$) y la menor diferenciación génica en el cromosoma 18 ($F_{ST} = 0,02192$). La figura N°18 muestra los valores de F_{ST} obtenidos para cada cromosoma equino en la muestra analizada. Los datos discriminados se muestran en la Tabla N°6 (ANEXO).

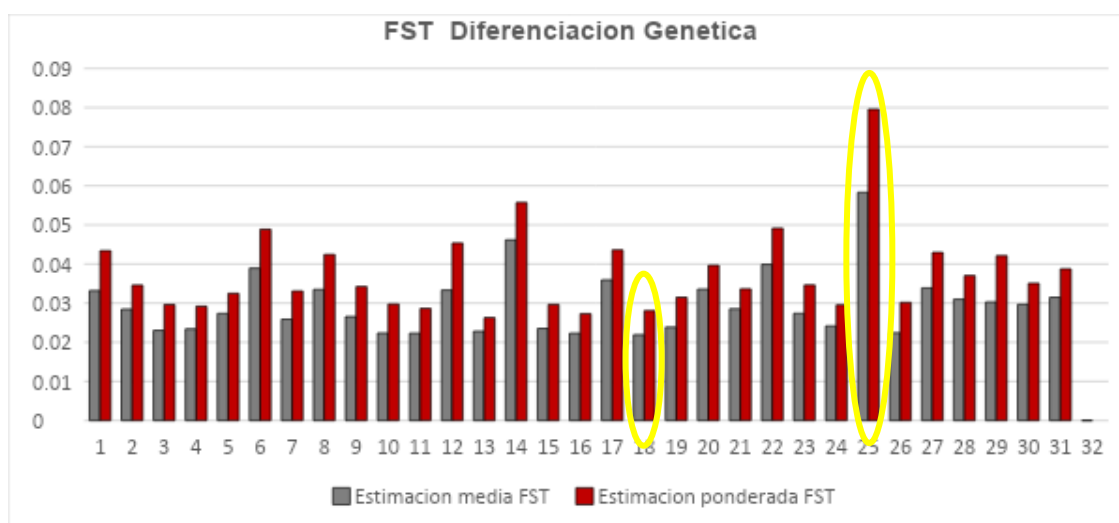


Figura N°18: Estimación media y ponderada de la diferenciación genética entre grupos (índice F_{ST}) en 44 caballos analizados por medio del microarreglo de ADN GGPEquine65K.

3.3.5. Asociación genómica

Se realizó el cálculo de chi-cuadrado y el modelo aditivo de desequilibrio de ligamiento (LD). El filtrado de calidad se realizó por exclusión de SNPs con genotipos involucrando menos del 90% de los caballos (--geno 0.10), y frecuencia del alelo menor, es decir, removiendo SNPs con frecuencias menores al 0,05% (--maf 0.05); de este modo se evaluaron 60.717 SNPs.

La estimación de asociación genómica se realizó en cada cromosoma por separado mediante la aplicación de los tests de asociación por SNP (*single marker association test*) y por bloque haplotípico (*association blocks*). En cada cromosoma se registró el número de SNPs agrupando los valores de p en cuatro categorías: $P1 = <0,0001$, $P2 = 0,0019-0,009$, $P3 = 0,01-0,05$, $P4 = >0,05$. Con esta información se construyó el plot de Manhattan (Figura N°19). En este grafico se muestra la distribución de miles de variaciones genómicas, indicando la posición de los SNPs en función de su significancia estadística (y) en cada cromosoma (x); los SNPs con significancia estadística mayor al umbral $p=0.01$ se encuentran por encima de la línea negra, y aquellas con $p \leq 0,001$ se encuentran por encima de la línea azul. El gráfico se realizó con el $-\log_{10}$ de los valores de p .

Los SNPs con valores de p significativo ($P1$) se detallan en la Tabla N°17, donde se indica además la posición en el cromosoma correspondiente.

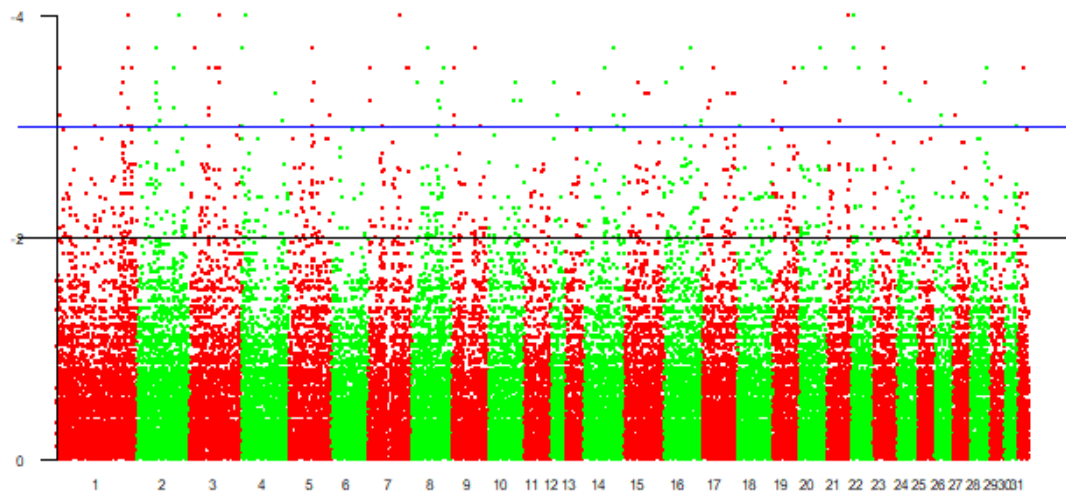


Figura N°19: Plot de Manhattan obtenido a partir de los p -valores estimados para la asociación de SNPs únicos; el gráfico muestra la significancia de la asociación estadística como $-\log_{10}(\text{p-valor})$ en el eje y, contra los cromosomas en el eje x, como una forma de desplegar miles de variaciones genéticas en la figura. La línea horizontal negra representa el umbral de significancia $p=0.01$ ($-\log_{10}= -1,3$), y la línea horizontal azul $p\leq 0,001$ ($-\log_{10}= -3$ - azul).

Tabla N°17: Resultados del estudio GWAS identificando los SNPs, localización cromosómica y valores de p hallados para las asociaciones más altas ($p<0,001$) con la tipificación por medio del arreglo de mediana densidad GGPEquine70K de Illumina en 44 caballos, exhibiendo el fenotipo seropositivo ($N=29$) y el fenotipo seronegativo ($N=15$).

SNP	Cr	posición	Alelo	Frecuencias	χ^2	<i>p</i> -valor
			asociado	(Caso, Control)		
BIEC2_1104	1	4629401	G	0.978, 0.708	11.352	0.0008
BIEC2_1253	1	4768726	C	0.957, 0.625	13.087	0.0003
BIEC2_63621	1	148792457	C	0.935, 0.591	12.109	0.0005
BIEC2_65299	1	152871014	A	0.739, 0.273	13.366	0.0003
BIEC2_65342	1	152954413	T	0.652, 0.208	12.428	0.0004
BIEC2_78894	1	165572472	G	0.364, 0.000	11.413	0.0007
BIEC2-78896	1	165577630	C	0.435, 0.000	14.609	0.0001
Affx-102732383	1	165587064	G	0.783, 0.333	13.635	0.0002
BIEC2_81460	1	170564988	T	0.957, 0.625	13.087	0.0003

Affx-101144374	2	41930126	C	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2-475604	2	43404790	G	0.848, 0.417	13.961	0.0002
BIEC2_500059	2	43530805	A	0.848, 0.417	13.961	0.0002
Affx-102767908	2	44447395	G	0.848, 0.458	11.724	0.0006
BIEC2_475983	2	44490205	T	1.000, 0.750	12.578	0.0004
BIEC2_501858	2	49531876	T	0.435, 0.042	11.606	0.0007
BIEC2_502510	2	52916057	A	0.891, 0.542	10.934	0.0009
BIEC2_493634	2	83778777	T	0.674, 0.250	11.374	0.0007
BIEC2_493638	2	83782466	G	0.682, 0.250	11.623	0.0007
BIEC2_493642	2	83782727	C	0.674, 0.250	11.374	0.0007
BIEC2_493957	2	84314312	T	0.935, 0.583	12.882	0.0003
BIEC2_501064	2	96701792	T	0.913, 0.500	14.768	0.0001
BIEC2-772167	3	10396370	G	0.978, 0.667	13.667	0.0002
BIEC2-778881	3	42743020	A	0.543, 0.125	11.508	0.0007
BIEC2_778883	3	42743173	C	0.543, 0.125	11.508	0.0007
BIEC2_779080	3	44037117	A	0.870, 0.500	11.276	0.0008
BIEC2_779083	3	44063475	C	0.870, 0.455	13.17	0.0003
BIEC2_784726	3	60715039	A	0.913, 0.542	12.919	0.0003
TBIEC2_828589	3	66250170	A	1.000, 0.708	14.907	0.0001
TBIEC2_828591	3	66255119	C	1.000, 0.708	14.907	0.0001
BIEC2_829458	3	68346728	G	0.696, 0.250	12.622	0.0004
BIEC2_789237	3	68397342	C	0.696, 0.250	12.622	0.0004
BIEC2_789318	3	68514164	C	0.739, 0.292	13.014	0.0003
BIEC2_843816	4	2646153	T	0.630, 0.167	13.613	0.0002
CUHSNP00150139	4	7849520	T	1.000, 0.708	14.907	0.0001
BIEC2-870400	4	77399750	G	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2_874368	4	94347473	T	0.841, 0.458	10.948	0.0009
TBIEC2_957338	5	55550704	G	0.717, 0.250	13.964	0.0002
BIEC2_910026	5	55628374	C	0.717, 0.250	13.964	0.0002
BIEC2_910155	5	55836086	A	0.717, 0.292	11.672	0.0006
BIEC2_911894	5	59394245	A	0.955, 0.625	12.438	0.0004
BIEC2_977472	5	93572015	G	0.870, 0.500	11.276	0.0008
BIEC2_975013	7	2620805	G	0.717, 0.292	11.672	0.0006
BIEC2_975070	7	2711208	T	0.522, 0.083	12.984	0.0003
BIEC2_1006208	7	71296896	G	0.804, 0.375	12.904	0.0003
BIEC2_1010700	7	86220028	C	0.891, 0.500	13.133	0.0003
BIEC2_1015958	7	92091213	G	0.909, 0.500	14.444	0.0001
BIEC2_1030792	8	12535837	G	0.457, 0.042	12.595	0.0004

BIEC2_1030826	8	12553051	T	0.429, 0.042	11.152	0.0008
BIEC2-1045945	8	39391520	A	0.674, 0.208	13.686	0.0002
BIEC2_1057547	8	62899998	T	0.848, 0.458	11.724	0.0006
BIEC2_1058703	8	64948614	T	0.818, 0.417	11.439	0.0007
BIEC2_1061577	8	69240459	A	0.652, 0.208	12.428	0.0004
BIEC2_1061582	8	69242635	G	0.652, 0.208	12.428	0.0004
Affx-101926929	8	73678232	C	0.739, 0.292	13.014	0.0003
BIEC2_1071359	9	5901789	G	0.957, 0.625	13.087	0.0003
BIEC2_1130668	9	6238800	C	0.978, 0.708	11.352	0.0008
BIEC2_1094360	9	52025071	A	0.674, 0.208	13.686	0.0002
BIEC2_129116	10	63571079	A	0.457, 0.042	12.595	0.0004
Affx-102176058	10	60197934	C	0.848, 0.458	11.724	0.0006
BIEC2_138461	10	75859530	G	0.848, 0.458	11.724	0.0006
BIEC2_171425	12	6821725	T	1.000, 0.750	12.578	0.0004
BIEC2_189417	12	13826689	G	0.786, 0.375	11.133	0.0008
BIEC2_228521	13	28717537	C	0.932, 0.583	12.196	0.0005
Affx-102973742	14	49764400	G	0.739, 0.292	13.014	0.0003
Affx-102246110	14	69972893	T	0.783, 0.333	13.635	0.0002
BIEC2_263616	14	69974652	C	0.587, 0.167	11.291	0.0008
BIEC2_263619	14	69975023	C	0.587, 0.167	11.291	0.0008
BIEC2_276299	14	91561996	G	0.870, 0.500	11.276	0.0008
BIEC2_314422	15	29979361	T	1.000, 0.750	12.578	0.0004
BIEC2-306906	15	45568200	C	0.932, 0.583	12.196	0.0005
BIEC2-311439	15	53637180	G	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2-328015	16	3377300	A	0.565, 0.125	12.596	0.0004
CUHSNP00050516	16	39731844	A	0.957, 0.625	13.087	0.0003
CUHSNP00050520	16	39734265	C	0.957, 0.625	13.087	0.0003
CUHSNP00050523	16	39737618	G	0.957, 0.625	13.087	0.0003
BIEC2_354526	16	61173586	T	0.783, 0.333	13.635	0.0002
BIEC2_383579	16	84207260	G	0.891, 0.542	10.934	0.0009
BIEC2_369238	17	14832738	A	0.783, 0.375	11.413	0.0007
BIEC2_369438	17	16108291	G	0.848, 0.458	11.724	0.0006
BIEC2_374301	17	25235156	C	0.977, 0.667	13.047	0.0003
Affx-103036295	17	58696552	G	0.717, 0.273	12.031	0.0005
BIEC2_402268	17	69539737	A	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2-383960	17	73795240	G	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2_383963	17	73795671	C	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2_383965	17	73797944	T	0.761, 0.333	12.167	0.0005

BIEC2_384595	17	75614147	A	0.932, 0.583	12.196	0.0005
BIEC2_422173	19	115162	G	0.891, 0.542	10.934	0.0009
BIEC2_433276	19	29236173	G	1.000, 0.750	12.578	0.0004
BIEC2_466293	19	47249954	A	0.522, 0.083	12.984	0.0003
Affx-102780311	20	7671251	A	0.739, 0.292	13.014	0.0003
BIEC2_535597	20	47920846	A	0.978, 0.667	13.667	0.0002
BIEC2_535652	20	47961086	A	0.978, 0.667	13.667	0.0002
BIEC2_543188	20	60803907	C	0.739, 0.292	13.014	0.0003
BIEC2_587917	21	27443294	G	0.891, 0.542	10.934	0.0009
BIEC2_570368	21	49717613	A	0.500, 0.042	14.705	0.0001
BIEC2-575907	22	2974870	G	0.826, 0.375	14.547	0.0001
BIEC2-575908	22	2975490	T	0.826, 0.375	14.547	0.0001
BIEC2_575916	22	2984909	G	0.783, 0.333	13.635	0.0002
BIEC2_583748	22	16652941	G	0.935, 0.583	12.882	0.0003
BIEC2_620898	23	24390937	G	0.783, 0.333	13.635	0.0002
BIEC2_621455	23	26754913	C	0.957, 0.625	13.087	0.0003
BIEC2-621482	23	26841790	G	1.000, 0.750	12.578	0.0004
BIEC2_630656	24	6653408	A	0.761, 0.333	12.167	0.0005
BIEC2-642511	24	29133680	T	0.848, 0.458	11.724	0.0006
BIEC2_661834	25	15616684	A	1.000, 0.750	12.578	0.0004
BIEC2_719562	26	14223212	A	0.630, 0.208	11.249	0.0008
BIEC2_700356	27	2909178	T	0.870, 0.500	11.276	0.0008
BIEC2_739271	28	34551848	G	0.391, 0.000	12.642	0.0004
TBIEC2_779254	28	37504001	A	0.523, 0.083	12.897	0.0003
Affx-103054239	31	10834373	G	0.739, 0.292	13.014	0.0003

3.3.6. Análisis funcional y enriquecimiento génico.

A partir de la identificación de las variantes con *p*-valor significativo, se realizó la búsqueda y enriquecimiento génico mediante las herramientas de Biomart. Usando el SET de DATOS 3 (DS 3) que contiene los 110 SNPs con valores de asociación significativa, la búsqueda en Biomart reveló la identidad de 60 genes (ENSEMBL) como se indica en la Tabla N° 18 se detalla la posición de inicio y fin de cada gen, así como su identificación y/o nombre asignado en la base de datos. Se observaron entre 1 y 8 SNPs por cromosoma, y algunos SNPs pertenecientes a un mismo gen.

Todos los SNPs menos 50 se localizaron en regiones génicas, conteniendo al menos un gen equino reportado en la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org>). Se

extrajeron en total 60 genes, incluyendo 43 genes codificantes y 9 especies de ARNs no codificantes; no se localizaron en pseudogenes (Tabla N°18).

Tabla N°18: Enriquecimiento génico de los SNPs con valores altos de significancia para el análisis de asociación de marcador único (*single marker association analysis*) realizado a partir de los datos de la tipificación con el arreglo de ADN GGPEquine70K en 44 caballos seropositivos (N=29) y seronegativos (N=15).

Sonda	Cr	Posición	Valor-		ID Ensembl	Gen	Inicio	Fin	Cad
			p						
BIEC2_1104	1	4629401	0.0008		ENSECAG00000038483		4612304	4637901	
BIEC2_63621	1	148792457	0.0005		ENSECAG00000012378	NDUFAF1	148780774	148795926	1
BIEC2_65342	1	152954413	0.0004		ENSECAG00000010993	CDIN1	152892997	153100515	-1
BIEC2_78894	1	165572472	0.0007						
BIEC2-78896	1	165577630	0.0001		ENSECAG00000038544		165571592	165589559	-1
Affx-102732383	1	165587064	0.0002						
BIEC2_81460	1	170564988	0.0003		ENSECAG00000023505	HECTD1	170536094	170621449	-1
BIEC2-475604	2	43404790	0.0002		ENSECAG00000020792	CAMTA1	43269884	44118829	-1
BIEC2_500059	2	43530805	0.0002						
Affx-102767908	2	44447395	0.0006		ENSECAG00000023564	ACOT7	44425939	44541299	1
BIEC2_475983	2	44490205	0.0004						
BIEC2_501858	2	49531876	0.0007		ENSECAG00000013343	SLC18A1	49520643	49552517	-1
BIEC2_493634	2	83778777	0.0007						
BIEC2_493638	2	83782466	0.0007		ENSECAG00000033875	IQCM	83677853	84078420	1
BIEC2_493642	2	83782727	0.0007						
BIEC2_779080	3	44037117	0.0008		ENSECAG00000019085	UNC5C	44032812	44383765	1
BIEC2_779083	3	44063475	0.0003						
BIEC2_784726	3	60715039	0.0003		ENSECAG00000043499		60612624	60743289	-1
BIEC2_829458	3	68346728	0.0004		ENSECAG00000018303	YTHDC1	68340274	68375426	-1
BIEC2_843816	4	2646153	0.0002		ENSECAG00000037936		204577	267186	-1
BIEC2-870400	4	77399750	0.0005		ENSECAG00000001545	TSPAN12	77365894	77456942	-1
BIEC2_910026	5	55628374	0.0002		ENSECAG00000011158	CLCC1	55624572	55643245	1
BIEC2_910155	5	55836086	0.0006		ENSECAG00000021537	FNDC7	55823359	55853261	-1
BIEC2_977472	5	93572015	0.0008		ENSECAG00000024107	ROR1	93386498	93740852	-1
BIEC2_975013	7	2620805	0.0006		ENSECAG00000033728	PIP5K1C	2598300	2646817	-1
BIEC2_975070	7	2711208	0.0003		ENSECAG00000007090	ZFR2	2690315	2746083	-1
BIEC2_1006208	7	71296896	0.0003		ENSECAG00000007758	XRRA1	71286710	71340149	1
BIEC2_1030792	8	12535837	0.0004		ENSECAG00000011440	MYO18B	12441454	12655523	-1
BIEC2_1030826	8	12553051	0.0008						
BIEC2_1058703	8	64948614	0.0007		ENSECAG00000010657	PIK3C3	64914448	65066218	1
BIEC2_1061577	8	69240459	0.0004		ENSECAG00000002816	PIAS2	69210832	69312581	-1

BIEC2_1061582	8	69242635	0.0004					
BIEC2_1094360	9	52025071	0.0002	ENSECAG00000020172	ZFPM2	51969587	52536775	1
Affx-102176058	10	60197934	0.0006	ENSECAG00000013532		60194509	60262970	1
BIEC2_228521	13	28717537	0.0005	ENSECAG00000007446	VPS35L	28636150	28794281	-1
Affx-102973742	14	49764400	0.0003	ENSECAG000000021916	CEP120	49705600	49775973	1
BIEC2_314422	15	29979361	0.0004	ENSECAG000000011391	TET3	29955326	30052248	-1
BIEC2-328015	16	3377300	0.0004	ENSECAG000000023717	IQSEC1	3344517	3514608	-1
CUHNSNP00050516	16	39731844	0.0003					
CUHNSNP00050520	16	39734265	0.0003	ENSECAG000000027868	PRKAR2A	39698459	39814613	1
CUHNSNP00050523	16	39737618	0.0003					
BIEC2_354526	16	61173586	0.0002	ENSECAG000000029267		60847058	61189550	-1
BIEC2_383579	16	84207260	0.0009	ENSECAG000000023263	RNF13	84068137	84240945	1
BIEC2_369238	17	14832738	0.0007	ENSECAG000000007300	DCLK1	14591764	14908464	-1
BIEC2_374301	17	25235156	0.0003	ENSECAG000000021923	GTF2F2	25182330	25329806	-1
BIEC2_402268	17	69539737	0.0005	ENSECAG000000034795		69527227	69564120	-1
BIEC2_384595	17	75614147	0.0005	ENSECAG000000036059	NALF1	75010372	75621220	-1
BIEC2_422173	19	115162	0.0009	ENSECAG000000006802		97800	483251	1
BIEC2_433276	19	29236173	0.0004	ENSECAG000000016072		29154898	29353584	1
BIEC2_466293	19	47249954	0.0003	ENSECAG000000020163		47208139	47303907	1
Affx-102780311	20	7671251	0.0003	ENSECAG000000018169		7633874	7874318	1
BIEC2_587917	21	27443294	0.0009	ENSECAG000000000308	RICTOR	27398219	27506881	1
BIEC2_570368	21	49717613	0.0001	ENSECAG000000010901	CTNND2	49170984	50051293	1
BIEC2_583748	22	16652941	0.0003	ENSECAG000000035989		16629354	16685853	-1
BIEC2_620898	23	24390937	0.0002	ENSECAG000000011075	RFX3	24342256	24554954	-1
BIEC2_630656	24	6653408	0.0005	ENSECAG000000009258	DAAM1	6643780	6807869	1
					PALM2AK			
BIEC2_661834	25	15616684	0.0004	ENSECAG000000010552	AP2	15275695	15786806	1
BIEC2_719562	26	14223212	0.0008	ENSECAG000000017241	SAMSN1	14218064	14348831	-1
TBIEC2_779254	28	37504001	0.0003	ENSECAG000000010223	CACNA1I	37483065	37602164	1
Affx-103054239	31	10834373	0.0003	ENSECAG000000000518	ARID1B	10733338	11144488	-1

En el conjunto de los 43 genes codificantes el análisis con el software PANTHER (*GO-Slim Molecular function*) mostró que los mayores clusters de genes enriquecidos correspondían a: **A)** clase proteica: enzimas modificadoras (9,3%), reguladores transcripcionales gen-especifico (7,0%), proteínas del metabolismo del ARN (7,0%), transportadores (7,0%); **B)** función molecular: unión molecular (23,3%), actividad catalítica (18,6%), actividad de transportador (11,6%) y regulación de la actividad de transportador (9,3%); **C)** procesos biológicos: celulares (55,8%), regulación biológica (34,9%) y procesos metabólicos (34,9%), localización (18,6%) y señalización (9,3%). Los datos detallados se muestran en las figuras N° 20 A, B y C.

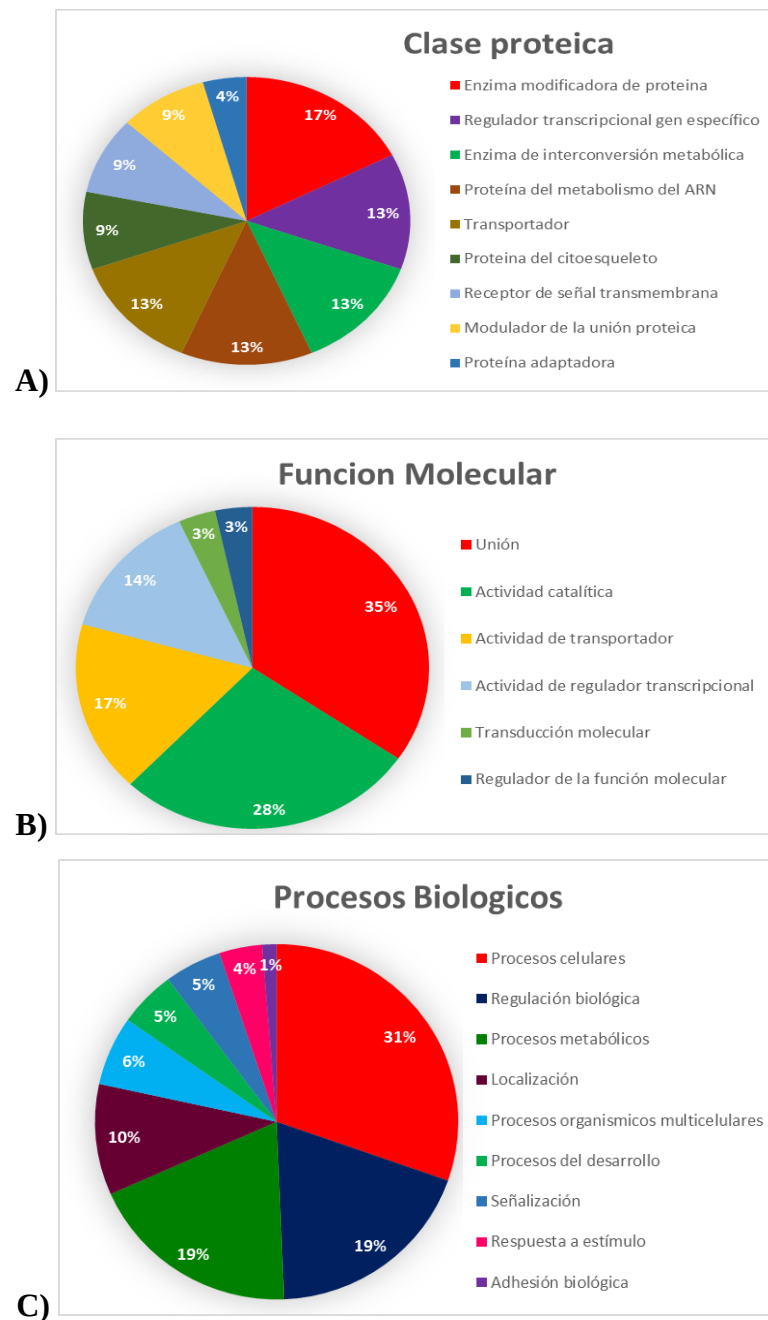


Figura N°20: Clasificación por ontología génica de los genes identificados en las regiones con asociación significativa en los 44 caballos, utilizando el software PANTHER. A) Clase proteica, B) Función molecular, C) Procesos biológicos.

Finalmente, el análisis de agrupamiento por ontología génica para investigar las funciones biológicas y moleculares asociadas con los genes identificados, que indica la probabilidad de que los genes en una red se encuentren juntos de manera aleatoria. La anotación funcional de todos los términos se muestra en la Tabla N°19, y en el

agrupamiento funcional, los tres clusters (Tabla N°20) indicaron que las funciones pueden agruparse en sub-categorías principales, de actividad de unión a ADN y ATP, y actividad kinasa y transferasa (Figura N°21).

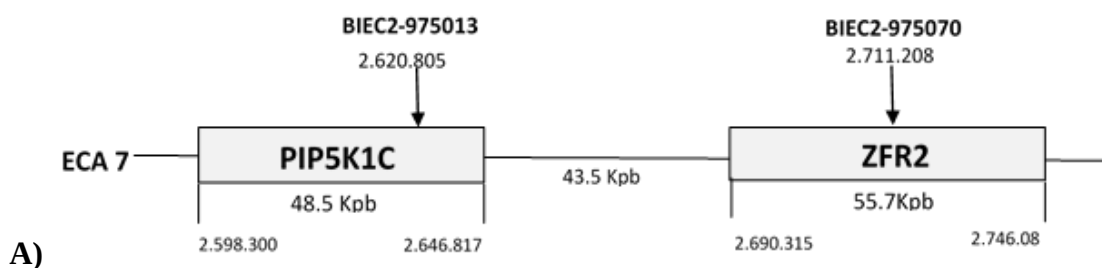
Tabla N°19: Anotación funcional de 43 genes, mostrando la cantidad de genes en cada categoría, el porcentaje de funciones asignadas sobre el total de funciones conocidas, y el *p*-valor de la anotación funcional.

Categoría	Termino	Cantidad	%	p-valor
Secuencia	Residuos polares	30	69,8	1,1 ^{E-7}
Secuencia	Región	40	93	1,4 ^{E-6}
Secuencia	Residuos ácidos y básicos	22	51,2	4,2 ^{E-4}
INTERPRO	Sitios de unión EF	4	9,3	6,8 ^{E-4}
INTERPRO	Plegamiento tipo armadillo	6	14	7,0 ^{E-4}
Función molecular	Unión de ADN	6	14	1,1 ^{E-2}
Secuencia	Residuos Pro	11	25,6	1,1 ^{E-2}
Función molecular	Unión de ATP	8	18,6	1,5 ^{E-2}
Proceso biológico	Movilidad celular dependiente de cilio	2	4,7	2,9 ^{E-2}
Vía KEGG	Vía de señalización <i>wtm</i>	3	7	3,8 ^{E-2}
Secuencia	Residuos ácidos	6	14	4,1 ^{E-2}
Proceso biológico	Desarrollo embrionario	3	7	6,1 ^{E-2}
Función molecular	Actividad protein-kinasa	3	7	6,1 ^{E-2}
Función molecular	Kinasa	4	9,3	6,3 ^{E-2}
INTERPRO	Plegamiento tipo armadillo	63	7	7,4 ^{E-2}
Función molecular	Ubiquitina ligada a prot K63	2	4,7	7,9 ^{E-2}
INTERPRO	Dominio tipo protein-kinasa	4	9,3	9,0 ^{E-2}
Función molecular	Transferasa	6	14	9,3 ^{E-2}

Tabla N°20: Anotación funcional por agrupamiento de 43 genes mostrando tres clusters funcionales (*functional annotation clustering*).

Cluster 1	Score de enriquecimiento 1.08	Cantidad	p-valor	Bonferroni
Función molecular	Unión de ATP	8	1,5 ^{E-2}	7,0 ^{E-1}
Función molecular	Kinasa	4	6,3 ^{E-2}	5,7 ^{E-1}
INTERPRO	Dominio tipo protein-kinasa	4	9,0 ^{E-2}	1,0 ^{E-1}
Función molecular	Transferasa	6	9,3 ^{E-2}	7,2 ^{E-1}
Ligando	Unión de nucleótidos	4	1,9 ^{E-1}	8,1 ^{E-1}
Ligando	Unión de ATP	4	2,2 ^{E-1}	8,7 ^{E-1}
Cluster 2	Score de enriquecimiento 0.71	Cantidad	p-valor	Bonferroni
INTERPRO	Dominio tipo protein-kinasa	4	9,0 ^{E-2}	1,0 ^{E-0}
Secuencia	Unión de ATP	3	2,3 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}
INTERPRO	Dom. catalítico de protein-kinasa	3	2,6 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}
secuencia	Dominio de protein-kinasa	3	2,7 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}
Cluster 3	Score de enriquecimiento 0.04	Cantidad	p-valor	Bonferroni
Componente celular	Membrana	9	7,2 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}
Dominios	Transmembrana	7	9,4 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}
Secuencias	Transmembrana helicoidal	7	9,9 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}
Términos GO	Componente integral de membrana	6	9,9 ^{E-1}	1,0 ^{E-0}

A modo de ejemplo se localizó la ubicación de los genes relacionados con actividad kinasa identificados por anotación funcional, se encuentran en los cromosomas 7, 8, 16 y 17. En el caso de los genes PIP5K1C y ZFR2 (2 SNPs en el cromosoma 7) a una distancia de 43,5 Kpb; los genes PIK3C3 y PIAS2 (3 SNPs), se localizan en el cromosoma 8, a una distancia de 4 Mpb (Figura N°21 A y B).



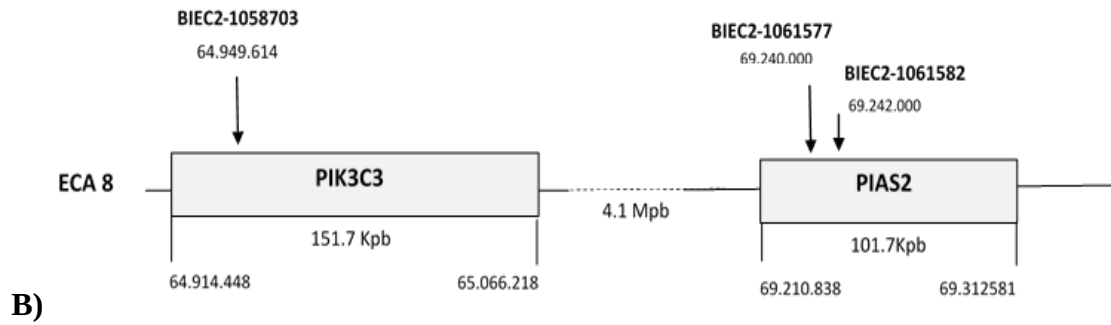


Figura N°21: Genes relacionados con actividad kinasa, identificados por anotación funcional. Los genes con actividad kinasa mostrados como ejemplo se encuentran en A) cromosoma 7: PIP5K1C y ZFR2 (2 SNPs) y B) cromosoma 8: PIK3C3 y PIAS2 (3 SNPs), respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

4.1 Establecimientos

En el año 2014, al evaluar la situación en la cual se encontraba el E1 se determinó una prevalencia del 76,4 %, este elevado porcentaje de positivos indico la importancia de la circulación del virus de AIE en la población equina estudiada. Mientras que, Jacobo *et al.* en el año 2001, informaron los resultados de tres Laboratorios de Red de la ciudad de Corrientes con una seropositividad del 17,30 % sobre 846 caballos de trabajo de la región noroeste de Corrientes, correspondiendo el 33,70% para San Luis del Palmar. En el año 2003 sobre un total de 14.811 muestras obtuvieron una seropositividad del 16,3% para la provincia, y para la región noroeste se estableció un 15,9% (Jacobo *et al.* 2003).

Según datos publicados por SENASA (Durante *et al.* 2008) en el año 2008 analizando los resultados de los laboratorios oficiales de todo el país, sobre 210.924 muestras, 0,95% de los animales resultaron positivos, para la provincia de Corrientes la positividad alcanzó un 4,3%. En el año 2017 mediante el sistema SIGLAB el SENASA obtuvo 0,65 % de animales positivos sobre un total de 140.204 muestras de laboratorios de red del País. Cabe destacar que las muestras remitidas a estos laboratorios generalmente son de animales provenientes de establecimientos controlados, animales destinados a actividades ecuestres y movimientos, por lo cual estos datos solamente nos aproximan a la situación epidemiológica del país frente a la AIE.

En los últimos años en nuestro país se reportaron casos de AIE en zonas donde la enfermedad estaba ausente o la presentación de casos era esporádica. Como lo cita Zambruno *et al.* (2016) en el hipódromo de San Isidro Buenos Aires se produjo un brote con 6 animales enfermos, otro en Baradero provincia de Buenos Aires con un total de 53 casos documentado por Vissani *et al.* (2016). Etcheverry *et al.* reportaron en 2016 un brote de AIE en la ciudad de Riobamba al sur de la provincia de Córdoba con 14 animales enfermos. En los reportes se presentaron animales con síntomas lo que llevó al control serológico de los enfermos y de los animales en contacto. En todos los casos los animales enfermos fueron sacrificados. SENASA establece en la Resolución 617/2005, la obligatoriedad de la realización de un test serológico antes del movimiento de equinos, debiendo ser negativo para el traslado con una validez de 60 días. Asimismo, se recomienda a los propietarios que implementen el test al ingreso de equinos a los predios, como también, un test diagnóstico a la totalidad de los equinos del predio una vez por

año, a los efectos de la detección de reactores positivos. Del mismo modo obliga a que los animales con diagnóstico positivo sean eutanasiados o enviados a faena, con el posterior saneamiento del establecimiento (Res 617/2015 SENASA).

Las diferencias en la prevalencia de la AIE dependen de diversos factores: como la región geográfica y sus ecosistemas, la densidad de población de equinos y su dinámica regional, también del nivel socio cultural de sus propietarios, consecuentemente la asistencia sanitaria y profesional de los equinos y por ende del conocimiento de la enfermedad, primordialmente en referencia a las formas de transmisión. Por ello la importancia del cumplimiento responsable de las medidas de prevención y control, impuestas por las autoridades y la responsabilidad del propietario son determinantes (De la Sota, 2005).

Con el avance del ensayo se observaron como 12 animales seronegativos se mantuvieron en esa condición y los 14 restantes se positivizaron, sin haber presentado síntomas de la enfermedad durante el periodo en estudio. Esto nos demostraría que donde conviven animales sanos con enfermos y/o portadores asintomáticos, están dadas las condiciones para que se genere la transmisión natural de la enfermedad. Cook *et al.* (2013), menciona que la transmisión de AIE en situaciones similares a estas puede producirse en forma de brote. En este estudio se observó cómo en zonas endémicas de la enfermedad la transmisión natural se producía en forma lenta y no en brote, los establecimientos tenían alta prevalencia, los animales pocas manifestaciones sintomáticas y seguían prestando utilidad bajo un esquema adecuado de trabajo.

Es de vital importancia hacer referencia a que la misma disminuye cuando las prácticas realizadas por el veterinario o personal del establecimiento son controladas, principalmente a la hora de no reutilizar agujas y jeringas entre los animales, destacando que el virus permanece viable durante 96 horas aproximadamente en agujas hipodérmicas. Además es importante recalcar que la infectividad viral en las partes bucales de un insecto disminuye un 99% después de 1 hora y es indetectable a las 4 horas posteriores a la alimentación, al igual que, el volumen de sangre que transportan los mismos es menor que el que podemos transferir en una aguja (Foil *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1981; Cook *et al.* 2013).

Los cambios climáticos en la zona de estudio, que provocan que la humedad y la temperatura se mantengan constantes durante el año, provocan una alta densidad de

vectores como *Tabanus* sp, principales transmisores mecánicos de la enfermedad (Cook *et al.* 2013).

La situación que se refleja en este estudio demuestra cómo influye la presencia de la enfermedad dentro de los predios de cría bovina donde el equino es una herramienta de trabajo indispensable. En estos establecimientos, como ocurre en muchos otros de la zona, los animales muestreados se encontraban en plena jornada de actividad, donde ninguno de ellos manifestaba síntomas de la enfermedad y presentaban una buena condición corporal.

Por otra parte, es importante destacar que en la población de equinos del E1 convivían 2 ponies, un macho y una hembra, ambos permanecieron sin sintomatología durante todo el ensayo, pero el macho a partir del año 2015 mostro serología positiva a diferencia de la hembra que arrojó resultados negativos en todo el periodo estudiado. En estudios experimentales infectando ponies y caballos con cepas virulentas para los equinos, tanto caballos como ponies experimentaron enfermedad grave e incluso mortal, mientras que los burros infectados de manera similar se mantuvieron clínicamente normales con títulos virales mucho más bajos que en equinos inclusive. No se sabe aún, en la actualidad, si los burros son resistentes a la enfermedad por VAIE o si una vez que este virus se ha adaptado a una especie de équidos no puede replicarse de manera óptima en otra (Cook *et al.* 2013).

En el E2, en el año 2015 la manada de yeguas y el padrillo evidenciaron serología positiva. En el año 2016 la serología fue negativa en los 7 potrillos de 11 meses de edad, en cuanto a la camada del 2017 se muestreo cuando los 9 potrillos tenían 8 meses de edad y en este caso 8 fueron negativos y 1 potrillo positivo a la serología. Estos resultados, sumados a los antecedentes de varias camadas de hijos seronegativos, revelan cómo animales con la forma inaparente de la enfermedad pueden tener hijos seronegativos, a pesar de que hay autores que afirman (Colaham, 2000; Morales Briceño *et al.* 2015; Radostits *et al.*, 2002), que en ocasiones el virus puede pasar la barrera placentaria, producirse una infección intrauterina, infectar al feto y provocar el aborto o el nacimiento de potros infectados que frecuentemente mueren en los meses siguientes. Craigo y Montelaro, 2008, citan que la transmisión *in útero* de la yegua al potrillo es rara o muy poco frecuente, en cambio Cook (2013) señalo que tales exposiciones tienen el potencial para la transmisión y con mayor riesgo si aumentan los niveles de viremia. La vía

digestiva también es considerada como una posible vía de transmisión del virus, a través de la leche, en potrillos lactantes (CFSPH, 2009). Sin embargo, hemos visto potrillos que amamantaron de sus madres positivas hasta los 8 meses de vida, mostraron resultados negativos en su serología. Asimismo, hay que destacar que el potrillo con resultado positivo a los 8 meses de vida arrojó resultado negativo en el control serológico realizado al año de vida, esto se debería a que los ACs maternos pueden interferir con el diagnóstico por medio de la técnica de IDGA (test de Coggins) hasta los 9 meses de edad del potrillo (Sellon y Long 2007).

4.2 Serología

El desempeño de la técnica de FPA expuso valores de concordancia excelentes (Kappa 0,88-0,93) por establecimiento y en la totalidad de las muestras. El análisis ROC manifestó valores de sensibilidad de 93,7 a 100% y de especificidad de 93,4 a 96,9 % para la técnica de FPA en este ensayo. Estimando un punto de corte entre 81,5 mP para las muestras del laboratorio privado y 98.6 mP en las muestras a campo, podemos inferir que las variaciones podrían verse afectadas por las diferentes situaciones epidemiológicas predominantes de los establecimientos. Estando en conocimiento de que los equinos del ensayo eran animales seropositivos y seronegativos a AIE, y se encontraban conviviendo en el mismo lugar. Además las muestras provenientes del laboratorio privado en su mayoría derivaban de establecimientos controlados en los cuales es poco probable que los equinos tengan contacto con animales enfermos. Al mismo tiempo, debemos tener en cuenta la cantidad de muestras analizadas como otro factor importante a la hora de estandarizar un posible punto de corte para esta técnica.

Tencza *et al.* en 2000, realizaron ensayos con muestras de equinos para diagnóstico de AIE por medio de la técnica de FPA y los resultados demostraron que la reactividad de FPA se correlacionó con los resultados informados para IDGA en 106/106 muestras de suero negativas (100% de especificidad) y en 135/151 muestras de suero positivas (89.4% de sensibilidad) con un punto de corte de 81 mp. Por otra parte, Juliarena *et al.* en 2006 reportaron que la sensibilidad de la técnica de FPA para AIE fue del 91.8% al compararla con IDGA. Realizando una modificación en la configuración espacial del péptido sintético, estos autores obtuvieron una correlación del 100%. La simplicidad práctica y rapidez de la técnica propone como una excelente prueba para validar en un futuro inmediato para el diagnóstico de AIE.

La técnica de ELISAc expuso concordancias adecuadas (Kappa 0,77) a excelentes (Kappa 0,96) frente a Coggins. Asimismo, los valores de sensibilidad variaron 92,3 a 94,7 %, especificidad 87,5 a 100% con un punto de corte de entre 0,272 a 0,299 DO. Paré y Simard en 2004, obtuvieron con el mismo kit de ELISAc empleado en este estudio en comparación con Coggins, valores de sensibilidad del 100%, especificidad del 93.3%, y un valor Kappa de 0.93.

Sandriago *et al.* (2021) alcanzaron concordancias excelentes entre la técnica de ELISAc versus IDGA con un coeficiente Kappa de 0,89. El análisis ROC reveló una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95,45%, de las 28 muestras positivas para IDGA, 26 resultaron positivas para ELISAc. El área bajo la curva (AUC) obtenido fue de 0,997 demostrando ser una técnica eficaz remarcando la importancia de contar con un diagnóstico efectivo y rápido para mejorar las situaciones contra la lucha de esta enfermedad, y poder incorporarla en la rutina diaria, principalmente como técnica *screening*. Posteriormente Espasandin *et al.* 2021 en un ensayo realizado con el mismo test de ELISAc obtuvieron valores de kappa 0,82, sensibilidad de 92 % y especificidad de 90%.

Cabe agregar que 19 de las muestras de animales tomadas en 2014 y en 2017 (figuras 5 y 6) fueron analizadas por las tres técnicas, solo las muestras 1 y 2 arrojaron resultados disímiles al resto mostrando resultados positivos frente al ELISAc y negativos a las otras dos técnicas; se podría inferir que estos animales se encontraban incubando la enfermedad, situación que no se logró confirmar debido a que los muestreos en el establecimiento no pudieron continuarse. Bolfa *et al.* en 2008 resaltaron la utilidad de la prueba de ELISA cuando las tasas de ACs son bajas y no son detectadas por la IDGA, apuntando hacia la detección temprana del inicio de la enfermedad. Estos autores proponen realizar diagnóstico por ELISA y confirmación por Test de Coggins debido a que la primera podría detectar falsos positivos. Márquez Alvarado *et al.* en 2015 obtuvieron valores Kappa de 0,53 con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97%. Estos autores resaltaron la sensibilidad del ELISAc aun cuando los animales posean una baja tasa de ACs. Issel *et al.* (2013), señalaron la necesidad del uso de pruebas serológicas que se apoyen entre sí, proponiendo repetir el ELISA en aquellos casos que resulten positivos, y si la seropositividad continúa, realizar IDGA. En caso de ser positivo

en esta última reportar como positivo, de lo contrario sugieren realizar inmunoblot para emitir el diagnóstico definitivo.

4.3 Asociación genómica

La identificación de la naturaleza de la susceptibilidad del huésped ante un patógeno, permite obtener un panorama más amplio y completo para elaborar una defensa o tratamiento específico para ese patógeno. Esto se debe en gran parte a que la mayoría de las enfermedades infecciosas exhiben una especificidad de huésped claramente delineada, tanto en su capacidad de infectar como en el resultado de la infección, y la especificidad de hospedador es considerada como el resultado de la co-evolución entre el patógeno y el hospedador. De este modo, el estudio de asociación de genoma amplio (GWAS) permitiría identificar diferencias significativas entre individuos infectados e individuos no infectados debido a la condición sanitaria, que en este caso es la infección por el virus de AIE.

El objetivo de los estudios GWAS es identificar asociación de genotipos con fenotipos evaluando las diferencias en las frecuencias alélicas de variantes genéticas entre individuos que son ancestralmente similares pero que difieren fenotípicamente (Uffelmann *et al.*, 2021). Las variantes comúnmente más estudiadas son los SNPs, y el estudio reporta bloques de SNPs correlacionados que muestran asociación estadísticamente significativa con el carácter de interés, conocidos como loci de riesgo genómico.

Como primer paso se definió el carácter fenotípico. Este rasgo fenotípico definido para cada animal de ambos establecimientos estudiados, consideró el diagnóstico de diferentes técnicas (Test de Coggins, ELISAc y FPA) para detectar la presencia de la infección por AIE. De este modo se definió el estado de infectado (seropositivo) y no infectado (seronegativo) y se seleccionaron para tipificar con el arreglo de ADN de mediana densidad, aquellos animales incluidos inequívocamente en uno de los dos estados (E1: Figuras 14a-14b/ E2: Figuras 15 y 16a-16b). Posteriormente, el filtrado de datos de tipificación excluyó animales, debido a la calidad de los genotipos, por lo que se analizaron aquellos con más del 90% de éxito de genotipado. Además, en el proceso de filtrado de calidad de datos se excluyeron SNPs con error de genotipado >5%. Con estos parámetros, el número total de animales con resultados de genotipificación de calidad fue de 44 caballos, con 57.942 SNPs (Tabla 16).

Previamente al análisis de asociación, se realizó el análisis global de los datos genómicos para verificar la diversidad a nivel de todo el genoma en el conjunto de animales analizados. La importancia de este paso radica en que se ha demostrado que hay regiones del genoma que poseen niveles mayores o menores de variación genética comparada al promedio del genoma del caballo, ej.; analizando 534 caballos de 44 razas diferentes mediante secuenciación de genoma amplio (WGS) (Durward-Akhurst *et al.*, 2021). Este hecho, enfatiza la necesidad de realizar una búsqueda de asociación teniendo en cuenta el bagaje genético del grupo de caballos analizados.

La diversidad genómica en el conjunto de datos genómicos obtenidos para todos los caballos, reveló valores promedio de heterocigosis esperada, de $H_e = 0,3221$, y varió entre 0,3342 y 0,3033 (cromosomas 26 y 13, respectivamente) (figura 17). Los caballos seropositivos presentaron mayor valor de heterocigosis en promedio que los seronegativos, pero en diferentes cromosomas, en tanto que el cromosoma 13 presentó los menores valores de H_e en ambos grupos y en el total. Estos valores de H_e se encuentran dentro del rango esperado de heterocigosis genómica en otras razas de caballos analizados con arreglos de mediana y alta densidad (Petersen *et al.*, 2013; Corbi Botto *et al.*, 2019), sin embargo, los valores obtenidos superan lo reportado por Petersen *et al.*, (2013) en el análisis de 38 razas equinas, quienes observaron valores de H_e entre 0,236 (Clydesdale) y 0,337 (Paint).

Como medida de la reducción promedio en la heterocigosis de una subpoblación debido a la deriva génica, y para medir el efecto de la diferenciación genética de la subdivisión de la población (Figura 18), el índice F_{ST} mostró el mayor valor en el cromosoma 25 ($F_{ST} = 0,05831$), indicando que el 5% de la diferenciación se debe a diferencias genéticas entre los dos grupos, y el menor valor de diferenciación en el cromosoma 18 ($F_{ST} = 0,02192$), es decir, un 2% de diferencias genéticas.

Para determinar si existe asociación entre el carácter fenotípico y la composición genómica de los dos grupos de animales, la estimación se realizó en cada cromosoma por separado mediante la aplicación del test de asociación por SNP (*single marker association test*), y se agruparon los valores de p en cuatro categorías: $P_1 = <0,0001$, $P_2 = 0,0019-0,009$, $P_3 = 0,01-0,05$, $P_4 = >0,05$; los resultados se expresaron de manera gráfica por medio del plot de Manhattan (Figura 19). En este gráfico se muestra la distribución de cada una de las variaciones genómicas en cada posición cromosómica en función de su

significancia estadística, quedando por encima del umbral delimitado por la línea negra los SNPs con significancia estadística mayor a $p=0.01$, y aquellos con $p\leq 0.001$ por encima de la línea azul.

De este modo, se identificaron 110 SNPs con valores de asociación significativa, con distribución variable entre cromosomas (Tabla 17). No se hallaron SNPs con p-valores significativos en los cromosomas 6, 11, 18, 29 y 30.

La determinación del contenido de genes de las posiciones de los SNPs se realizó mediante el análisis funcional y enriquecimiento génico. La búsqueda con el set de datos conteniendo los 110 SNPs reveló la identidad de 60 genes (Tabla 18). Todos los SNPs menos 50 se localizaron en regiones génicas, conteniendo al menos un gen equino reportado en la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org>). Los 60 genes extraídos incluyeron 43 genes codificantes y 9 especies de ARNs no codificantes (Tabla 18). Se observaron en algunos casos, hasta 3 SNPs con alto valor de significancia pertenecientes a un mismo gen.

Si bien el genoma equino de referencia (Wade *et al.*, 2009) ha dado las bases para la investigación en poblaciones de caballos (Rebolledo-Mendez *et al.*, 2015; Raudsepp *et al.*, 2019), y a pesar del progreso continuado en la comprensión de la naturaleza de las enfermedades genéticas en caballos, las variantes que causan patologías se identificaron en menos del 20% de las enfermedades reconocidas con causas genéticas (*Online Mendelian Inheritance in Animals*, OMIA). Como ocurre en humanos, muchas de las regiones de interés que son significativas en los estudios GWAS, encontradas para rasgos de caballos, se encuentran en regiones no codificantes del genoma (Durward-Akhurst *et al.*, 2021). Este hecho se ve reflejado en la reducción a casi la mitad de la cantidad de SNPs con asociación significativa debido a la presencia de 50 SNPs localizados en regiones no génicas, y las 9 especies de ARNs no codificantes. La función desconocida de esas regiones ha sido un impedimento para confirmar las variantes causales, lo que es necesario para desarrollar tests efectivos o tratamientos, por lo que es crítico establecer una explicación de lo que es una variación normal para vincular el genotipo con el fenotipo (Yngvadottir *et al.*, 2009; Genomes Project *et al.*, 2010; Durward-Akhurst *et al.*, 2021).

En el conjunto de los 43 genes codificantes el análisis de enriquecimiento génico agrupando por clase proteica, función molecular y procesos biológicos, reveló que las

principales categorías corresponden a proteínas y enzimas con actividades modificadoras, reguladores de la transcripción gen-específico, metabolismo del ARN y transportadores (30,3%), en tanto que el 62,8% corresponde a genes cuyos productos cumplen funciones moleculares de unión, actividad catalítica, actividad de transportador y regulación de la actividad de transportador (Figura 20a, b y c). Estas funciones y los productos de los genes involucrados, podrían tener un significado en los mecanismos de entrada de la partícula viral a la célula, así como la evasión de sistema inmune para hacer efectiva la infección.

Finalmente, se realizó el análisis de agrupamiento por ontología génica para investigar las funciones biológicas y moleculares asociadas con los genes identificados, que indica la probabilidad de que los genes en una red se encuentren juntos de manera aleatoria. La anotación y el agrupamiento funcional (Tabla 20), permitieron identificar tres clusters cuyas funciones pueden agruparse en sub-categorías principales, de unión a ADN, regulación transcripcional, y de actividad kinasa y transferasa (Figura 21). Como ejemplo, cuatro de los genes relacionados con actividad kinasa identificados por anotación funcional, localizados en el cromosoma 7 (PIP5K1C y ZFR2 - 2 SNPs) y en el cromosoma 8 (PIK3C3 y PIAS2 - 3 SNPs) se encuentran a distancias tales (Figura 21) que la significancia estadística de la asociación no se debería al ligamiento genético, pudiendo tener un significado en la función específica de cada producto génico en la vía en la que participa.

La literatura menciona más de 5.700 estudios GWAS realizados para analizar alrededor de 3.300 rasgos, dando como resultado el conocimiento de numerosas variables asociadas y replicables para muchos caracteres heredables, e identificando asociaciones genéticas confiables para varios fenotipos (Uffelmann *et al.*, 2021). Entonces, el siguiente desafío es interpretar estas asociaciones en un contexto biológico y genómico. Considerando que muchos estudios GWAS han mostrado que la mayoría de los rasgos están influenciados por cientos o miles de variantes causales que confieren individualmente poco riesgo, y que están comúnmente asociadas con muchos otros rasgos y correlacionadas con variantes causales y no causales que están físicamente cercanas como resultado del desequilibrio de ligamiento, las inferencias biológicas causales se tornan más complicadas (Skol *et al.*, 2006; Bombá *et al.*, 2017; Uffelmann *et al.*, 2021).

Otros factores a considerar, es que las asociaciones pueden diferir a lo largo de las líneas ancestrales, haciendo más difícil la comparación entre grupos de individuos.

Teniendo en cuenta que el presente trabajo constituye el primer estudio a gran escala para investigar los factores genéticos que contribuyen a la potencial resistencia de la infección por el VAIE, y a partir de los resultados obtenidos bajo las condiciones de estudio y de acuerdo a la hipótesis planteada inicialmente, no se puede afirmar que existan equinos con determinadas características genéticas que le confieran esta condición particular. Los SNPs con asociación estadística significativa identificados en los distintos cromosomas, pueden indicar que el riesgo para esta enfermedad no se explica por un único locus principal; en forma adicional, debemos considerar que la presencia de un único SNP asociado podría indicar que los SNPs en esta región no serían capaces de señalar apropiadamente una región asociada en este grupo de animales. Otros factores a considerar corresponden a: el número de animales empleados; todos los casos provienen de infecciones naturales, aunque no está discriminado si la infección se debe a una cepa viral determinada; el trasfondo genético de los animales, como presencia de cruza o contribuciones genéticas de determinadas razas; el sexo y edades podrían haber impactado en los resultados obtenidos si fuera más probable que el efecto genético de la infección se manifestase dependiendo de edad o sexo. A este respecto, debido al número relativamente reducido de muestras, y dado que el número de hembras (22) y el de machos (29), la distribución con respecto al sexo no se consideró para investigar la asociación. Además, el fenotipo usado en este estudio, seronegativo o seropositivo, es probablemente el resultado de factores adicionales, tanto genéticos como ambientales, incluyendo interacciones más complejas que se pueden ver influenciadas por la edad, el sexo y la raza.

Los resultados de asociación obtenidos en el análisis GWAS son de naturaleza estadística. Las características particulares de este estudio, podrían indicar que la asociación corresponde a un grupo de productos génicos involucrados en la entrada y procesamiento de la partícula viral, a través de mecanismos de regulación de la expresión de determinados productos génicos.

V. CONCLUSIONES

Al evaluar la transmisión horizontal de la enfermedad, se pudo apreciar que, si bien existen condiciones como las ambientales y la presencia de vectores para que se produzca la misma, la implementación de medidas de manejo y control sobre los animales podría favorecer la disminución de aparición de casos.

Con respecto a la transmisión vertical se observó cómo los potrillos, permanecían seronegativos frente a la AIE, esto podría atribuirse a que al recibir un buen calostro y ser amamantados por sus madres positivas, les brindaría una importante protección inmunológica que evitaría su contagio. Además de las medidas de manejo sanitario aplicadas como la separación de los potrillos al destete, y las condiciones de los padres en estado inaparente. Destacando que se encuentran en las mismas condiciones endémicas con la presencia de los principales transmisores de la enfermedad.

En cuanto al desempeño de las pruebas diagnósticas, el FPA fue superior al del ELISAc en las muestras de campo y viceversa en las de laboratorio (animales controlados). Cabe destacar que al aumentar el número de muestras analizadas por la FPA se evidencia valores de Se 93,7% y Sp 96,9%, lo que por su simplicidad práctica, su rapidez y su objetividad a la hora de interpretar los resultados, se propone como una excelente prueba para validar en un futuro inmediato para el diagnóstico de la AIE.

El estudio de asociación genómica no detectó evidencia de que la presencia de determinados alelos, en los loci génicos analizados en el presente trabajo, sean determinantes de la infección por el VAIE. La evidencia obtenida muestra que la interacción entre el virus y el hospedador podría depender del producto de varios loci génicos, interacciones focalizadas a las funciones de entrada a la célula a través de la membrana, unión de ATP y otras moléculas específicas, regulación de la transcripción de determinados genes y modificaciones debidas a la acción de proteínas kinasas y transferasas.

Dado que no se han reportado estudios de genoma amplio para la infección por AIE en otras poblaciones o razas de caballos, este trabajo brinda una primer y valiosa evidencia de cuáles serían los genes cuyas variantes tendrían un rol en funciones moleculares definidas y específicas, y así investigar las posibles variantes regulatorias, considerando la potencial interacción del conjunto de genes que participan en vías comunes.

VI. PROPUESTAS

Ampliar las investigaciones sobre la transmisión vertical de la enfermedad, realizando un seguimiento de los animales más de cerca y por un periodo de tiempo más extenso.

Analizar una mayor cantidad de muestras por la técnica de FPA para así establecer un punto de corte más certero.

Ampliar la investigación enfocándose en el análisis del conjunto de resultados obtenidos, o análisis de productos génicos particulares involucrados en una o más vías y procesos celulares encontrados como asociados a la condición sanitaria de los caballos analizados, así como también contemplar tipos o razas para identificar las relaciones hospedador patógeno específicas que determinen el desarrollo de la enfermedad.

Replicar y validar la asociación estadística hallada y determinar si alguno de los loci que alcanzaron significancia estadística sugestiva en este estudio contribuye al riesgo de la enfermedad.

VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bomba L., Walter K., Soranzo N. (2017). The Impact of Rare and Low-Frequency Genetic Variants in Common Disease. *Genome Biology* 18(1), 1-17
2. Campbell, R. S. F., & Robinson, W. F. (1998). The comparative pathology of the lentiviruses. *Journal of comparative pathology*, 119(4), 333-395.
3. Capomaccio, S., Willand, Z. A., Cook, S. J., Issel, C. J., Santos, E. M., Reis, J. K. P., & Cook, R. F. (2012). Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. *Veterinary microbiology*, 157(3-4), 320-332.
4. The center for food security and public health 2009 Anemia Infecciosa equina. P1-5 https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/anemia_infecciosa_equina.pdf
5. Ciciarella, H.N.N., & Bosisio, C. R. (2005) Enfermedades infecciosas de los equinos. CEV editorial, Bs. Aires, 2º edición. 58-69.
6. Clabough, D. L., Gebhard, D., Flaherty, M. T., Whetter, L. E., Perry, S. T., Coggins, L., & Fuller, F. J. (1991). Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. *Journal of virology*, 65(11), 6242-6251.
7. Clementi, M., & Di Gianantonio, E. (2006). Genetic susceptibility to infectious diseases. *Reproductive Toxicology*, 21(4), 345-349.
8. Clements, J. E., & Zink, M. C. (1996). Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical microbiology reviews*, 9(1), 100-117.
9. Coggins, L., & Norcross, N. L. (1970). Immuno-diffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Veterinarian*, 60, 330-335.
10. Coggins, L.; Norcross, N.L. & Nusbaum, S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am J Vet Res*, 33:11-18.
11. Cook, S.J.; Cook, R.F.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2001). Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Microbiol*, 79: 93-109.
12. Cook, R.F.; Cook, S.J.; Li, F.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2002). Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for Equine Infectious Anemia Virus (EIAV). *J Virol Methods*, 105:171-179.
13. Cook, R.F.; Cook, S.J.; Berger, S.L.; Leroux, C.; Ghabrial, N.N.; Gantz, M.; Bolin, P.S. Mousel, M.R.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2003). Enhancement of Equine

Infectious Anemia Virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virology*, 313: 588- 603.

14. Cook, R. F., Leroux, C., & Issel, C. J. (2013). Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Veterinary microbiology*, 167(1-2), 181-204.

15. Costa, L.R.R.; Miranda Santos, I.K.F.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1997). Tumor necrosis factor- α production and disease severity after immunization with enriched major core protein (p26) and/ or infection with Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 57: 33-47.

16. Craig, J. K., & Montelaro, R. C. (2008). Encyclopedia of virology. *Equine infectious anemia virus*. 3th ed. Pittsburgh: University of Pittsburgh School of Medicine, 2, 167-74.

17. Craig, J. K., & Montelaro, R. C. (2010). EIAV envelope diversity: shaping viral persistence and encumbering vaccine efficacy. *Current HIV research*, 8(1), 81-86.

18. Craig, J. K., & Montelaro, R. C. (2011). Equine infectious anemia virus infection and immunity: lessons for AIDS vaccine development. *Future virology*, 6(2), 139-142.

19. Craig, J. K., & Montelaro, R. C. (2013). Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious, anemia virus infection and immunity. *Viruses*, 5(12), 2963-2976.

20. De la Sota, M. D. (2005). Manual de procedimientos para la anemia infecciosa equina. Buenos Aires, Argentina: Dirección de lucha sanitaria. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/file906-manual_anemia_infecciosa1.pdf

21. Díaz, S., Ripoli, M. V., Peral García, P., & Giovambattista, G. (2005). Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. *Analecta Veterinaria*, 25.

22. Díaz S., Sadabat S.A., López R., Corbi Botto C.M., Giovambattista G., Boffi F., Castagne J.O., Peral García P. (2012) Caracterización de la posible existencia / susceptibilidad genética a la infección por AIE en caballos chaqueños. *Revista de la asociación argentina de veterinaria equina*. Año 10-Nº 38, 46-54.

23. Dong, JB, Zhu, W., Cook, FR, Goto, Y., Horii, Y. y Haga, T. (2012) Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses *Archivos de virología*, 157 (11), 2105-2111

24. Durante E., Chiricosta A., Ramos M. (2008) Situación de la Anemia Infecciosa equina en la República Argentina durante el año 2008. SENASA http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENESA/ANIMAL/EQUINOS/PROD_PRIMARIA/SANID%20ANIM/EES/ANEMIA_INFECC/file2946-equinos.pdf
25. Durward-Akhurst, S. A., Schaefer R. J., Grantham B., Carey W. K., Mickelson J. R., and M. E. McCue (2021). Genetic Variation and the Distribution of Variant Types in the Horse. *Front Genet*; 12: 758366. doi: 10.3389/fgene.2021.758366
26. Etcheverry, S., & Castañeira, C. (2016). Equine Infectious Anemia diagnosis in a 3 months old foal. *Journal of Equine Veterinary Science*, (39), S42-S43.
27. Espasandin, A.G., Forletti, A., Cipolini, M. F., Díaz, S., Storani, C. A., (2018) Resultados preliminares de una nueva técnica diagnóstica de laboratorio para Anemia Infecciosa Equina. Presentado en XXIV Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE. Corrientes, Argentina.
28. Espasandin, A. G., Cipolini, M. F., Forletti, A., Díaz, S., Soto, J., Martínez, D. E.,... & Soto, P. (2021). Comparison of serological techniques for the diagnosis of equine infectious Anemia in an endemic area of Argentina. *Journal of Virological Methods*, 291, 114101.
29. Etchegaray, P. B. (2001). Antecedentes en Chile de enfermedades virales de los animales domésticos: enfermedades erradicadas y bajo control. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 16(1-2).
30. Foil, L. (1983). A mark-recapture method for measuring effects of spatial separation of horses on tabanid (Diptera) movement between hosts. *Journal of medical entomology*, 20(3), 301-305.
31. Foil, L., Adams Jr, W. V., Issel, C. J., & Pierce, R. (1984). Tabanid (Diptera) populations associated with an equine infectious anemia outbreak in an inapparently infected herd of horses. *Journal of medical entomology*, 21(1), 28-30.
32. Foil, L. D., Adams, W. V., McManus, J. M., & Issel, C. J. (1987). Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of medical entomology*, 24(6), 613-616.
33. Foil, L. D., & Issel, C. J. (1991). Transmission of retroviruses by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 355-381.

34. Go, Y. Y., Zhang, J., Timoney, P. J., Cook, R. F., Horohov, D. W., & Balasuriya, U. B. (2010). Complex interactions between the major and minor envelope proteins of equine arteritis virus determine its tropism for equine CD3⁺ T lymphocytes and CD14⁺ monocytes. *Journal of virology*, 84(10), 4898-4911.
35. Go, Y. Y., Bailey, E., Cook, D. G., Coleman, S. J., MacLeod, J. N., Chen, K. C., Timoney, P.T., & Balasuriya, U. B. (2011). Genome-wide association study among four horse breeds identifies a common haplotype associated with in vitro CD3⁺ T cell susceptibility/resistance to equine arteritis virus infection. *Journal of virology*, 85(24), 13174-13184.
36. Hammond, S. A., Cook, S. J., Lichtenstein, D. L., Issel, C. J., & Montelaro, R. C. (1997). Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *Journal of virology*, 71(5), 3840-3852.
37. Harrold, S. M., Cook, S. J., Cook, R. F., Rushlow, K. E., Issel, C. J., & Montelaro, R. C. (2000). Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *Journal of virology*, 74(7), 3112-3121.
38. Henson, J. B., & Mcguire, T. C. (1971). Immunopathology of equine infectious anemia. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(3), 306-314.
39. Hill, A. V. (1998). Host genetics of infectious diseases: old and new approaches converge. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 695.
40. Hill, A. V. (1999). The immunogenetics of resistance to malaria. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(4), 272-277.
41. Issel, C. J., & Foil, L. D. (1984). Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184(3), 293.
42. Issel, C. J., Horohov, D. W., Lea, D. F., Adams, W. V., Hagius, S. D., McManus, J. M., Allison A.C., Montelaro, R. C. (1992). Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus. *Journal of virology*, 66(6), 3398-3408.

43. Issel, C. J., & Cook, R. F. (1993). A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(1), 137-141.
44. Issel, C. J., Scicluna, M. T., Cook, S. J., Cook, R. F., Caprioli, A., Ricci, I., ... & Autorino, G. L. (2013). Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary record*, 172(8), 210-210.
45. Jin, S., Zhang, B., Weisz, O. A., & Montelaro, R. C. (2005). Receptor-mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. *Journal of virology*, 79(23), 14489-14497.
46. Juliarena M., Soto P., Luchessi E., Esteban E. (2006). Modificación espacial de un péptido-sintético para el diagnóstico por FPA de la infección por el virus de la anemia infecciosa equina. Congreso de Biolatina. Buenos Aires. Argentina.
47. Kalemkerian, P.B. (2014). *Determinación de la susceptibilidad / resistencia genética a la infección por el Virus de la Arteritis Equina (AVE) mediante el estudio de genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) equino* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata). Leroux y col .2004
48. Ligné, M. (1843). Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydroémie, cachexie acquise du cheval. *Rec. Med. Vet. Ec. Alfort*, 1843, 30-44.
49. Matsushita, T., Hesterberg, L. K., Porter, J. P., Smith, B. J., & Newman, L. E. (1989). Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1(1), 50-52.
50. McConnico, R. S., Issel, C. J., Cook, S. J., Cook, R. F., Floyd, C., & Bisson, H. (2000). Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 20(6), 387-392.
51. Montelaro, R. C., Parekh, B. H. A. R. A. T., Orrego, A., & Issel, C. J. (1984). Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 259(16), 10539-10544.
52. Montelaro, R. C., Ball, J. M., & Rushlow, K. E. (1993). Equine retroviruses. *The retroviridae*, 257-360.

53. Morales Briceño, A., Méndez Sánchez, A., & Morales Briceño, M. (2015). Anemia infecciosa equina: Una revisión. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 46(1-2), 107-124
54. Nagarajan, M. M., & Simard, C. (2001). Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, 94(1-2), 97-109.
55. Newton-Cheh, C., & Hirschhorn, J. N. (2005). Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 573(1-2), 54-69.
56. Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Kelly, W., Yeo, J., Kenny, K., Heneghan T., McNamara S., Maher P., O'Connor J., Walsh B., Carroll J., Rojas X., Rojas F., Perez B., Wulff O., Buffoni L., Salustio E., Gregoret R., Samartino L., Dajer A. & LunaMartinez E. (2001). Ensayo de polarización de fluorescencia para el diagnóstico de brucelosis bovina: adaptación al uso en campo. *Microbiología veterinaria*, 80 (2), 163-170.
57. OIE Terrestrial Manual 2016. Brucellosis. Chapter 2.1.4
58. OIE Terrestrial Manual 2004. Anemia Infecciosa Equina. Chapter 2.5.6
59. Oaks, JL, McGuire, TC, Ulibarri, C. y Crawford, TB (1998). El virus de la anemia infecciosa equina se encuentra en los macrófagos de los tejidos durante la infección subclínica. *Journal of virology* , 72 (9), 7263-7269.
60. Paré, J., & Simard, C. (2004). Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Canadian journal of veterinary research*, 68(4), 254.
61. Perryman, L. E., McGuire, T. C., Banks, K. L., & Henson, J. B. (1971). Decreased C3 levels in a chronic virus infection: equine infectious anemia. *The Journal of Immunology*, 106(4), 1074-1078.
62. Petersen J. L., Mickelson J. R., Cothran E. G., Andersson L. S., Axelsson J., Bailey E., et al. (2013). Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-wide SNP Data. *PloS one* 8, e54997. 10.1371/journal.pone.0054997
63. Provitera, P., Bouamr, F., Murray, D., Carter, C., & Scarlata, S. (2000). Binding of equine infectious anemia virus matrix protein to membrane bilayers involves multiple interactions. *Journal of molecular biology*, 296(3), 887-898.

64. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, MA, Bender, D. y Sham, PC (2007). PLINK: un conjunto de herramientas para la asociación de genoma completo y análisis de vinculación basados en la población. *La revista estadounidense de genética humana*, 81 (3), 559-575.
65. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchchiff W.K., 2002. *Medicina veterinaria: Tratado de las enfermedades Del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. McGraw Hill Interamericana S.A.U. Aravaca (Madrid) 9ª edición. Vol II. ISBN 84-486-0320-6. Pp1222-1227.
66. Ramírez JJ., Hincapié O. (1976) Diagnóstico de la Anemia Infecciosa Equina en Colombia por la prueba de inmunodifusión de Coggins. *Revista ICA*.11: 173-179.
67. Raudsepp T, Finno CJ, Bellone RR, Petersen JL. Ten years of the horse reference genome: insights into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era. *Anim Genet*. 2019 Dec; 50(6):569-597. doi: 10.1111/age.12857.
68. Rebolledo-Mendez J., Hestand M. S., Coleman S. J., Zeng Z., Orlando L., MacLeod J. N., et al. (2015). Comparison of the Equine Reference Sequence with its Sanger Source Data and New Illumina Reads. *PLoS One* 10, e0126852. 10.1371/journal.pone.0126852
69. Resolución-617-2005-SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-617-2005-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>
70. Riancho, J. A. (2012). Enfermedades complejas y análisis genéticos por el método GWAS. Ventajas y limitaciones. *Reumatología Clínica*, 8(2), 56-57.7.
71. Ruiz-Saenz, J., Cruz, Á., Reyes, E., López-Herrera, A., & Góngora, A. (2008). Asociación serológica de la rinoneumonitis viral equina y la anemia infecciosa equina. *Revista MVZ Córdoba*, 13(1), 1128-1137.
72. Salas, A. y Carracedo, A. (2007). Estudios de asociación en enfermedades complejas: problemas estadísticos relacionados con el análisis de polimorfismos genéticos. *Revista clínica española*, 207 (11), 563-565.
73. Sánchez-Villalobos, A., Rodríguez-Vargas, M., Becerra-Ramírez, L., & Cordero, R. (2010). Utilidad de las técnicas fluorescencia polarizada y del inmunoensayo enzimático de competencia para diagnóstico de brucelosis en caballos purasangre de carreras. *Interciencia*, 35(2), 131-135.

74. Sellon, DC, Perry, ST, Coggins, LEROY y Fuller, FJ (1992). El virus de la anemia infecciosa equina de tipo salvaje se replica in vivo predominantemente en macrófagos tisulares, no en monocitos de sangre periférica. *Journal of virology* , 66 (10), 5906-5913.
75. Sellon, D. C., Fuller, F. J., & McGuire, T. C. (1994). The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus research*, 32(2), 111-138.
76. Sellon, D. C., & Long, M. T. (2007). *Equine Infectious Diseases*. Second edition. Saunders Elsevier. Section 2, 232-238.
77. SENASA (2017) Informe correspondiente al período Julio – Diciembre de 2017 sobre los resultados de Anemia Infecciosa Equina y Brucelosis Bovina. SIGLAB. <https://fedecuarg.com.ar/anemia-infecciosa-equina-informe-correspondiente-al-2-trimestre-2018-2/>
78. Sentsui, H. y Kono, Y. (1987). Hemólisis mediada por complemento de eritrocitos de caballo tratados con el virus de la anemia infecciosa equina. *Archivos de virología*, 95 (1-2), 53-66.
79. Shane, B. S., Issel, C. J., & Montelaro, R. C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *Journal of clinical microbiology*, 19(3), 351-355.
80. Skol, A. D., Scott, L. J., Abecasis, G. R. & Boehnke, M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38, 209–213 (2006).
81. Soutullo A.R., (2008) Estudio de la capacidad antigénica e inmunogénica de péptidos sintéticos correspondientes a epítopes conservados de las proteínas estructurales del Virus de la Anemia Infecciosa Equina. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Provincia de Santa Fe.
82. Sponseller, B. A., & Sprayberry, K. (2003). *Robinson 5 Current Therapy in Equine Medicine*. WB Saunders Company. Section, 2, 45-46.
83. Stanchi N.O; Martino P.E.; Gentilini E.; Reinoso E.H.; Echeverría M.G.; Leardini N.A.; Copes J.A. 2010 Microbiología Veterinaria. Retrovirus. Parte III Capítulo 75 452-455.
84. Stein, CD, Lotze, JC y Mott, LO (1942). Transmisión de anemia infecciosa equina por la mosca del establo, *Stomoxys calcitrans*, la mosca del caballo, *Tabanus sulcifrons*

(Macquart), y por inyección de pequeñas cantidades de virus. *American Journal of Veterinary Research*, 3 (7).

85. Tencza, S. B., Islam, K. R., Kalia, V., Nasir, M. S., Jolley, M. E., & Montelaro, R. C. (2000). Development of a fluorescence polarization-based diagnostic assay for equine infectious anemia virus. *Journal of clinical microbiology*, 38(5), 1854-1859.

86. Thursz, M. (2000). Genetic susceptibility in infectious diseases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 17(1), 255-266.

87. Tornquist, S. J., Oaks, J. L., & Crawford, T. B. (1997). Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anaemia. *Journal of general virology*, 78(10), 2541-2548.

88. Tornquist, S. J., & Crawford, T. B. (1997). Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 90(6), 2357-2363.

89. Thrusfield M., Ortega C., de Blas I., Noordhuizen J.P., Frankena K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec.* 2001, 148(18):567-72.

90. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okada Y, Martin AR, Martin HC, Lappalainen T and Posthuma D. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers* vol 1, Article number: 59 (2021)

91. Vissani, A., Reynal O'Connor, J., Olguin Perglione, C., Traverso, S., Gutierrez, G., Alvarez, I., & Barrandeguy, M. E. (2016). Diagnosis and control of Equine Infectious Anemia in a horse farm located in Buenos Aires province, Argentina.

92. Wade C. M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Imsland F., et al. (2009). Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science* 326, 865–867. 10.1126/science.1178158

93. Weber, G. (1952). Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. Theory and experimental method. *Biochemical Journal*, 51(2), 145-155.

94. Weber, G. (1956). Photoelectric method for the measurement of the polarization of the fluorescence of solutions. *JOSA*, 46(11), 962-970.

95. Weiland, F., Matheka, H. D., Coggins, L., & Härtner, D. (1977). Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). *Archives of virology*, 55(4), 335-340.

96. Williams, DL, Issel, CJ, Steelman, CD, Adams Jr, WV y Benton, CV (1981). Estudios con virus de anemia infecciosa equina: intentos de transmisión por mosquitos y supervivencia del virus en piezas bucales y agujas hipodérmicas de vectores y en cultivo de tejidos de mosquitos. *Revista estadounidense de investigación veterinaria*, 42 (9), 1469-1473.
97. Yngvadottir B., Xue Y., Searle S., Hunt S., Delgado M., Morrison J., et al. (2009). A Genome-wide Survey of the Prevalence and Evolutionary Forces Acting on Human Nonsense SNPs. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 224–234. 10.1016/j.ajhg.2009.01.008
98. Zambruno, T., Elgue, F., Lauricica, P., & Costa, A. L. (2016). Equine Infectious Anemia cases in polo ponies housed in San Isidro's training center, Buenos Aires, Argentina. *Journal of Equine Veterinary Science*, 39, 0737-0806.
99. Zhang, B., Jin, S., Jin, J., Li, F., & Montelaro, R. C. (2005). A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(28), 9918-9923.

ANEXO

Tabla N°1: Resultados serología E1 FPA/ELISAc años 2014 y 2017.

E1	FPA		ELISAc	
	2014	2017	2014	2017
MZ001	59,2	51	0,7	0,44
MZ002	71,2	73,3	0,78	0,125
MZ003	65,7	195,9	0,97	0,062
MZ004	74,9	143,1	0,67	0,038
MZ005	58,4	120,7	0,74	0,055
MZ006	46	126,5	0,63	0,043
MZ007	53,7	153,1	0,69	0,065
MZ008	78,5	48	0,73	0,829
MZ010	45,3	46,2	0,77	0,845
MZ012	61,1	53,6	0,68	0,99
MZ013	45,3	17,9	0,75	1,108
MZ014	62,8	158	0,62	0,054
MZ015	47,7	179,3	0,73	0,047
MZ016	35,9	22,4	0,45	0,596
MZ018	9,2	56,5	0,7	1,036
MZ019	18,7	57,7	0,53	0,106
MZ020	41,4	133,4	0,66	0,053
MZ022	46,1	210,7	0,69	0,137
MZ023	40,1	39,4	0,82	0,828

Tabla N°2: Resultados serología E1 por las técnicas de Coggins, FPA y ELISAc

tubo/sobre#	Coggins 2017	FPA	ELISAc
MZ001	Negativo	17,9	1,108
MZ012	Negativo	22,4	0,596
MZ006	Negativo	39,4	0,828
MZ127	Negativo	42,3	0,991
MZ020	Negativo	46,2	0,845
MZ007	Negativo	48	0,829
MZ122	Negativo	48,7	0,339
MZ014	Negativo	51	0,44
MZ128	Negativo	52,2	0,395
MZ126	Negativo	53,3	0,321
MZ022	Negativo	53,6	0,99
MZ124	Negativo	53,7	0,276
MZ013	Negativo	56,5	1,036

MZ023	Negativo	57,7	0,106
MZ109	Negativo	57,9	0,395
MZ002	Negativo	73,3	0,125
MZ108	Negativo	83	0,246
MZ121	Positivo	103	0,047
MZ063	Positivo	107,9	0,048
MZ074	Positivo	114,5	0,438
MZ125	Positivo	114,5	0,051
MZ005	Positivo	120,7	0,055
MZ056	Positivo	125,2	0,077
MZ015	Positivo	126,5	0,043
MZ018	Positivo	133,4	0,053
MZ004	Positivo	143,1	0,038
MZ107	Positivo	143,5	0,317
MZ076	Positivo	144,4	0,049
MZ049	Positivo	147	0,048
MZ077	Positivo	148,5	0,05
MZ016	Positivo	153,1	0,065
MZ103	Positivo	156,5	0,054
MZ008	Positivo	158	0,054
MZ039	Positivo	161,9	0,046
MZ093	Positivo	168,8	0,054
MZ010	Positivo	179,3	0,047
MZ075	Positivo	179,4	0,068
MZ098	Positivo	187,8	0,053
MZ072	Positivo	189,1	0,043
MZ117	Positivo	191,8	0,069
MZ003	Positivo	195,9	0,062
MZ096	Positivo	204,2	0,065
MZ123	Positivo	204,4	0,054
MZ019	Positivo	210,7	0,137

Tabla N°3: Resultados serología E2 por las técnicas Coggins, FPA y ELISAc

E2	Coggins	FPA	ELISAc
MZ129/15	positivo	197,5	0,085
MZ130/16	Negativo	98,6	0,878
MZ131/15	positivo	228,4	0,127
MZ132/16	Negativo	90,5	0,579
MZ133/15	positivo	141,9	0,259

MZ134/16	Negativo	89,1	0,055
MZ135/15	positivo	182,1	0,09
MZ136/16	Negativo	24,8	0,637
MZ137/15	positivo	200,2	0,087
MZ138/16	Negativo	98,4	0,971
MZ139/15	positivo	224,2	0,076
MZ140/16	Negativo	72,7	0,69
MZ141/15	positivo	300,7	0,678
MZ142/16	Negativo	79,1	0,984
MZ143/15	positivo	247,1	0,189
MZ144/15	positivo	198,5	0,062
MZ145/15	positivo	230,1	0,272
MZ146/15	positivo	166,1	0,056
MZ147/17	Posit/neg.	113,8	0,228
MZ148/17	Negativo	64,5	0,758
MZ149/17	Negativo	70,1	0,79
MZ150/17	Negativo	69,3	0,803
MZ151/17	Negativo	85,5	1,683
MZ152/17	Negativo	65,8	0,732
MZ153/17	Negativo	114,5	1,07
MZ154/17	Negativo	41,4	0,738
MZ155/17	Negativo	31,8	0,664

Tabla N°4: Resultados de 114 muestras de Laboratorio de RED por las técnicas de Coggins, FPA y ELISAc.

Orden	Coggins	FPA	ELISAc		Orden	Coggins	FPA	ELISAc
1	Positivo	178,7	0,047		37	Negativo	109,6	0,403
2	Positivo	205,7	0,051		38	Negativo	100,7	0,454
3	Positivo	230,8	0,055		39	Negativo	51,7	0,492
4	Positivo	189,5	0,06		40	Negativo	45,1	0,495
5	Positivo	187,7	0,061		41	Negativo	74,1	0,5
6	Positivo	147,8	0,07		42	Positivo	84,1	0,51
7	Positivo	186,5	0,07		43	Negativo	64,3	0,515
8	Positivo	105,5	0,071		44	Negativo	60,2	0,527
9	Positivo	192,3	0,117		45	Positivo	53,2	0,531
10	Positivo	79,6	0,189		46	Negativo	18,7	0,534
11	Positivo	223,3	0,205		47	Negativo	50,6	0,547
12	Positivo	154,7	0,206		48	Negativo	73,1	0,549
13	Positivo	222,8	0,206		49	Negativo	48,4	0,577
14	Positivo	179,9	0,211		50	Negativo	51,7	0,585

15	Positivo	187,3	0,212		51	Negativo	69,5	0,586
16	Positivo	167,1	0,213		52	Negativo	63,9	0,593
17	Positivo	180,1	0,215		53	Negativo	48,5	0,598
18	Positivo	238,5	0,217		54	Negativo	67,1	0,603
19	Positivo	239,5	0,217		55	Negativo	71,1	0,607
20	Positivo	222,5	0,219		56	Negativo	62,8	0,616
21	Positivo	191,4	0,22		57	Negativo	73,3	0,618
22	Positivo	162,8	0,221		58	Negativo	69,6	0,62
23	Positivo	231,5	0,228		59	Negativo	63,5	0,627
24	Positivo	191,5	0,229		60	Negativo	86,7	0,631
25	Positivo	261,9	0,229		61	Negativo	62,9	0,631
26	Positivo	187,4	0,234		62	Negativo	46	0,632
27	Positivo	187,3	0,236		63	Negativo	22,4	0,639
28	Positivo	203,6	0,238		64	Negativo	56,8	0,643
29	Positivo	91	0,246		65	Negativo	60,3	0,647
30	Positivo	215,7	0,249		66	Negativo	27,4	0,653
31	Positivo	231,9	0,251		67	Negativo	68	0,658
32	Positivo	218,2	0,252		68	Negativo	41,8	0,659
33	Positivo	84	0,256		69	Negativo	41,4	0,659
34	Positivo	169,1	0,276		70	Negativo	52,7	0,662
35	Positivo	161,3	0,287		71	Negativo	40,8	0,666
36	Positivo	122,3	0,299		72	Negativo	74,9	0,671

Orden	Coggins	FPA	ELISAc		Orden	Coggins	FPA	ELISAc
73	Negativo	45,7	0,673		94	Negativo	69,8	0,73
74	Negativo	61,1	0,684		95	Negativo	54,2	0,739
75	Negativo	67,8	0,685		96	Negativo	58,4	0,743
76	Negativo	53,7	0,692		97	Negativo	45,3	0,745
77	Negativo	46,1	0,692		98	Negativo	43,2	0,747
78	Negativo	46,4	0,694		99	Negativo	53,4	0,748
79	Negativo	9,2	0,695		100	Negativo	35,9	0,751
80	Negativo	68,5	0,699		101	Negativo	71,6	0,756
81	Negativo	59,2	0,7		102	Negativo	45,3	0,766
82	Negativo	91,3	0,702		103	Negativo	59,6	0,769
83	Negativo	17,2	0,703		104	Negativo	37,5	0,774
84	Negativo	45,8	0,707		105	Negativo	71,2	0,784
85	Negativo	41,8	0,709		106	Negativo	60	0,787
86	Negativo	56,4	0,712		107	Negativo	53,9	0,808
87	Negativo	71	0,714		108	Negativo	40,1	0,816
88	Negativo	63,1	0,714		109	Negativo	28,5	0,837
89	Negativo	71,5	0,716		110	Negativo	41,2	0,854
90	Negativo	92,6	0,72		111	Negativo	63,6	0,891

91	Negativo	78,5	0,726		112	Negativo	40,3	0,947
92	Negativo	47,7	0,728		113	Negativo	65,7	0,968
93	Negativo	57,7	0,73		114	Negativo	55,3	1,057

Tabla N°5: Valores de Diversidad genómica (He) estimada en cada cromosoma.

Cromosoma	Heterocigosis esperada (todos)	Heterocigosis esperada (seropositivos)	Heterocigosis esperada (seronegativos)
ECA 1	0,3199	0,3150	0,3125
ECA 2	0,3211	0,3146	0,3160
ECA 3	0,3250	0,3190	0,3194
ECA 4	0,3320	0,3294	0,3207
ECA 5	0,3156	0,3115	0,3079
ECA 6	0,3263	0,3217	0,3222
ECA 7	0,3223	0,3172	0,3159
ECA 8	0,3282	0,3243	0,3173
ECA 9	0,3177	0,3128	0,3132
ECA 10	0,3222	0,3157	0,3188
ECA 11	0,3200	0,3155	0,3149
ECA 12	0,3212	0,3171	0,3138
ECA 13	0,3033	0,3006	0,2944
ECA 14	0,3152	0,3100	0,3108
ECA 15	0,3209	0,3173	0,3112
ECA 16	0,3209	0,3184	0,3085
ECA 17	0,3255	0,3184	0,3223
ECA 18	0,3277	0,3274	0,3123
ECA 19	0,3190	0,3177	0,3046
ECA 20	0,3243	0,3225	0,3136
ECA 21	0,3223	0,3175	0,3158
ECA 22	0,3184	0,3114	0,3168
ECA 23	0,3235	0,3259	0,3034
ECA 24	0,3146	0,3090	0,3096
ECA 25	0,3214	0,3178	0,3136
ECA 26	0,3342	0,3334	0,3199
ECA 27	0,3302	0,3290	0,3164
ECA 28	0,3116	0,3084	0,3024
ECA 29	0,3217	0,3217	0,3084
ECA 30	0,3268	0,3223	0,3214
ECA 31	0,3310	0,3260	0,3248
ECA X	0,2731	0,1767	0,2685
VALORES PROMEDIO (no incluye X)	0,32206078	0,31832994	0,3136473

Tabla N° 6: valores de F_{ST} obtenidos para cada cromosoma equino en la muestra analizada.

Cromosoma	Fst medio	Fst ponderado
ECA 1	0,0332049	0,0434113
ECA 2	0,0284644	0,0346021
ECA 3	0,0230269	0,0296446
ECA 4	0,0234069	0,0292081
ECA 5	0,027365	0,0324982
ECA 6	0,0389383	0,0488813
ECA 7	0,0258773	0,0330956
ECA 8	0,033496	0,0424392
ECA 9	0,0265689	0,0342388
ECA 10	0,0223639	0,029765
ECA 11	0,022312	0,0286436
ECA 12	0,0333388	0,0453709
ECA 13	0,0228223	0,0262873
ECA 14	0,0461787	0,0557272
ECA 15	0,023506	0,0296707
ECA 16	0,0223112	0,0273007
ECA 17	0,0359512	0,043593
ECA 18	0,0219259	0,0280789
ECA 19	0,0238557	0,0314981
ECA 20	0,0335794	0,039672
ECA 21	0,0285422	0,0336457
ECA 22	0,0399002	0,0491357
ECA 23	0,0273792	0,0346422
ECA 24	0,0241472	0,0295372
ECA 25	0,0583138	0,0795727
ECA 26	0,0224187	0,0301789
ECA 27	0,0338778	0,042972
ECA 28	0,0309906	0,0370526

ECA 29	0,0302944	0,0421361
ECA 30	0,0296857	0,0350665
ECA 31	0,0314801	0,0387611