

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 188**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011** **E 11761888 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2553099**

54 Título: **Marcador de resistencia a lactona macrocíclica para Dirofilaria immitis**

30 Prioridad:

01.04.2010 US 319982 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.09.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS TIERGESUNDHEIT AG (50.0%)
Werk Rosental, Schwarzwaldallee 215
4058 Basel, CH y
THE ROYAL INSTITUTION FOR THE
ADVANCEMENT OF LEARNING/MCGILL
UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PRICHARD, ROGER;
BOURGUINAT, CATHERINE;
GEARY, TIMOTHY y
SCHENKER, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 545 188 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcador de resistencia a lactona macrocíclica para *Dirofilaria immitis*

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de y prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 61/319.982 presentada el 01 de abril de 2010.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la detección de *Dirofilaria spp.* resistente a lactona macrocíclica.

Antecedentes

La dirofilariasis es una enfermedad parasitaria de animales, y en ocasiones de seres humanos, que puede ser el resultado de una infección por una especie de *Dirofilaria*, tal como *D. immitis*, *D. repens*, *D. tenuis*, *D. ursi*, *D. subdermata*, *D. lutrae*, *D. striata* y *D. spectans*.

Dirofilaria immitis (gusano del corazón) es un parásito nematodo que normalmente infecta a perros, zorros, lobos, coyotes y gatos. Los gusanos del corazón pueden producir daños vasculares y pueden ser mortales, especialmente en animales altamente activos.

El ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* es bien conocido (revisado en McCall et al., Adv Parasitol. 66:193-285 2008). En resumen, un mosquito se puede infectar cuando succiona sangre de un huésped infectado (por ejemplo, un perro). En el mosquito, las microfilarias se desarrollan al estadio de larva infecciosa. Cuando el mosquito infectado se alimenta puede transmitir las larvas a un nuevo huésped (por ejemplo, otro perro). En el huésped nuevo, las larvas continúan madurando durante de ocho a diez semanas, tras lo cual pasan al lado derecho de los pulmones y a la arteria pulmonar, donde se hacen adultos. Los gusanos adultos se aparean y las hembras producen huevos que se desarrollan dentro del útero en un largo embrión fino (microfilaria) que son liberados a la circulación sanguínea. Un mosquito que captura las microfilarias circulantes cuando extrae sangre del huésped infectado inicia el ciclo de nuevo.

Dirofilaria immitis se puede encontrar donde esté el vector, el mosquito. En general, *Dirofilaria immitis* se puede encontrar en todo el mundo, pero es muy frecuente en zonas de climas cálidos y templados.

Las lactonas macrocíclicas a menudo se prescriben como terapéutica o profilácticos en el control de *Dirofilaria immitis* en aplicaciones veterinarias. No obstante, la resistencia a las lactonas macrocíclicas es habitual en diversos parásitos nematodos y parece desarrollarse en *D. immitis*. Se han descrito numerosas pruebas para la detección de resistencia antihelmínticos en nematodos de ganado y caballos, incluida la prueba de reducción del recuento de huevos en heces, la prueba de la eclosión de huevos, la prueba del desarrollo de larvas en microagar y pruebas moleculares basadas en la resistencia a bencimidazol (revisado en Coles et al., Veterinary Parasitology 136: 167-185 (2006). Prichard et al. (patente europea EP 0979278) describen una secuencia de P-glicoproteína en *Haemonchus contortus* que puede ser útil para el diagnóstico de la resistencia a lactonas macrocíclicas en parásitos nematodos. No obstante, sigue existiendo la necesidad de procedimientos para detectar *Dirofilaria immitis* (gusanos del corazón) que son resistentes a lactonas macrocíclicas.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta de un nematodo *Dirofilaria immitis* a una lactona macrocíclica, comprendiendo dicho procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1, en la que el genotipo CG en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1 indica que es probable que el nematodo sea resistente a dicha lactona macrocíclica.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado que posee una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEC ID N°: 1 sobre la totalidad de su longitud y que comprende el nucleótido guanina (G) en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para determinar la capacidad de respuesta de un nematodo *Dirofilaria immitis* a una lactona macrocíclica, comprendiendo el kit una sonda capaz de determinar el genotipo del nematodo *Dirofilaria immitis* en las posiciones en un gen de P-glicoproteína del nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un tratamiento para tratar a un animal infectado con un nematodo *Dirofilaria immitis*, comprendiendo dicho procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1, y seleccionar el tratamiento basado en el genotipo de dicho nematodo. Opcionalmente, el

tratamiento seleccionado puede ser una terapia basada en arsénico, dietilcarbamazina, antibióticos o una combinación de uno o más de los mismos, si el nematodo tiene el genotipo GG en las posiciones en el gen de la P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un profiláctico para prevenir que un animal se infecte con un nematodo *Dirofilaria immitis*, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1, y seleccionar el profiláctico basado en el genotipo de dicho nematodo. Opcionalmente, el profiláctico seleccionado es dietilcarbamazina, si el nematodo tiene el genotipo GG en las posiciones en el gen de la P-glicoproteína del nematodo correspondiente a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado que comprende la secuencia representada en la SEC ID N°: 1.

Los procedimientos de la invención pueden comprender adicionalmente etapas de obtención de una muestra que comprende el nematodo de un sujeto tal como un animal, aislar el nematodo de la muestra, aislar los ácidos nucleicos del nematodo y, opcionalmente, purificar los ácidos nucleicos antes de la etapa de determinar el genotipo del nematodo. Además, el genotipo del nematodo puede determinarse usando técnicas conocidas tales como secuenciación de ADN, hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo, polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP), análisis por micromatriz o enfoques basados en PCR, RT-PCR o qRT-PCR.

Otros aspectos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención junto con las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de codificación parcial de la P-glicoproteína (SEC ID N° 1). Los SNP se indican en negrita.

Figura 2: Frecuencia del genotipo de SNP en la posición 11 del gen de la P-glicoproteína (* = p- valor significativo).

Figura 3: Frecuencia del genotipo de SNP combinado en las posiciones 11 y 618 del gen de la P-glicoproteína (* = p- valor significativo).

Figura 4: Frecuencia del genotipo de SNP combinado en las posiciones 11 y 618 de P-glicoproteína del grupo C.

Figura 5: Regresión lineal del genotipo de la P-glicoproteína GG-GG frente a IVM-LD₉₅ %.

Figura 6: Coeficiente F o desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, para diez SNP en tres genes: β -tubulina (tub), proteína del choque térmico 60 (hsp), P-glicoproteína (pgp). F= +1, 100 % homocigoto; F= -1, 100 % heterocigoto. El número al lado del gen corresponde a la posición del SNP en el segmento analizado.

Descripción detallada

Las lactonas macrocíclicas, incluidas, entre otras, avermectinas y milbemicinas, son productos, o derivados químicos de los mismos, de microorganismos del suelo que pertenecen al género *Streptomyces*. Estas moléculas se usan ampliamente para tratar cientos de especies de endo y ectoparásitos en una amplia gama de huéspedes. Las avermectinas de uso comercial incluyen, entre otras, ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina y selamectina. Las milbemicinas incluyen, sin limitaciones, milbemicina oxima y moxidectina. Las lactonas macrocíclicas poseen un potente y amplio espectro antiparasitario a niveles de dosis bajas. Son activos contra muchos nematodos inmaduros (incluidas larvas hipobióticas) y artrópodos. Una única dosis terapéutica puede permanecer a concentraciones suficientes para ser eficaces contra infecciones establecidas por nematodos durante periodos prolongados después del tratamiento.

Se han desarrollado lactonas macrocíclicas (LM) preventivas contra el gusano del corazón para el tratamiento de perros y gatos que todavía no están infectados con el fin de prevenir el establecimiento de infecciones por adultos apuntando a los estadios L3/L4 en desarrollo. Las lactonas macrocíclicas también tienen efectos sobre el estadio de microfilaria (L1) (Bowman et al., 1992; Courtney et al., 1998; McCall et al., 1998). Los endectocidas de lactona macrocíclica tales como ivermectina (IVM), milbemicina oxima (MBO), moxidectina (MOX) y selamectina (SLM) se usan durante la estación de transmisión para quimioprofilaxis del gusano del corazón en perros y gatos. No obstante, en los últimos años algunos expertos han sugerido que las lactonas macrocíclicas podrían usarse mensualmente para suprimir la reproducción de gusanos adultos y eliminar los estadios de microfilaria (mf), de modo que se reduce la transmisión y produce la eliminación de gusanos adultos. No sería necesario tratar solo a los animales sin una infección establecida por adultos con el fin de prevenir la infección y eliminar gradualmente una infección existente, "historial de la seguridad neta sobre los preventivos de lactona macrocíclica del gusano del corazón" (McCall, 2005).

Aunque los estadios L3/L4 de *D. immitis* son ultrasensibles a las lactonas macrocíclicas, parece que las lactonas macrocíclicas producen una agresión acumulada que afecta a la capacidad de los adultos para reproducirse y, en última instancia, pueden ser mortales tanto para adultos como para microfilaria. No obstante, no se sabe cómo actúan las lactonas macrocíclicas sobre los diferentes estadios de este parásito. La visión clásica es que las lactonas macrocíclicas actúan abriendo los canales de cloro dependientes de glutamato o GABA, lo que produce parálisis de la faringe y/o los músculos del cuerpo, lo que da lugar a inanición o una incapacidad de los nematodos para moverse, algo que es letal para los parásitos en el tracto gastrointestinal. Estos efectos se basan en observaciones en *Caenorhabditis elegans* y parásitos nematodos tricostrongílicos, son relativamente agudos y conducen a una parálisis bastante rápida y a la muerte. En los nematodos de filaria, tales como *D. immitis*, estos efectos rápidos no se producen, al menos no en adultos y microfilarias, y se necesitan varios tratamientos para producir letalidad. La IVM no paraliza las filarias adultas ni las microfilarias *in vitro* (Bennett, Williams y Dave, 1988) y se cree que en los nematodos de filaria, la faringe es vestigial y dicha captación de nutrientes se produce a través de la cutícula (Stote, Bonow y Attah, 1996).

Existen muchos indicios de resistencia a lactonas macrocíclicas en parásitos nematodos de rumiantes (para revisiones véase Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004; Geary, 2005) y recientemente se ha producido informes de resistencia a IVM en parásitos nematodos de caballos (Boersema, Eysker y Nas, 2002; Hearn y Peregrine, 2003), incluyendo especies de *Cyathostomum* (Trawford, Burden y Hodgkinson, 2005; Molento, *pers. comm.*) y en el nematodo filarial de seres humanos *Onchocerca volvulus* (Osei-Atweneboana et al., 2007). Por desgracia, ahora existen algunos indicios (Hampshire, 2005) que se ha producido una pérdida de eficacia de los preventivos de lactonas macrocíclicas del gusano del corazón, contra *D. immitis*, en algunos lugares en los últimos años.

Cuando se han comparado los parásitos tricostrongílicos resistentes a lactonas macrocíclicas, tales como *Haemonchus contortus* y *Cooperia oncophora*, con los aislados susceptibles a lactonas macrocíclicas, se han indicado cambios genéticos en las subunidades de los canales de cloro dependientes de glutamato (GluCl) (Blackhall et al., 1998a; Njue et al., 2004), una subunidad de los canales de cloro dependientes de GABA (GABA-Cl) (Feng et al., 2002; Blackhall et al., 2003), los transportadores ABC de la P-glicoproteína (Pgp) (Blackhall et al., 1998b; Xu et al., 1998; Le Jambre et al., 1999; Sangster et al., 1999) y en la β -tubulina (Eng et al., 2006; Mottier y Prichard, 2008). En el nematodo libre *C. elegans*, la delección de tres subunidades de los GluCl tuvo como resultado una pérdida de alto nivel de la susceptibilidad a IVM (Dent et al., 2000), lo que indica que estos GluCl están implicados en la acción de la IVM sobre este nematodo. No obstante, esto no se puede interpretar que implica que los mecanismos de resistencia a lactonas macrocíclicas en nematodos parásitos necesariamente implican cambios en los GluCl.

Como se ha indicado anteriormente, la resistencia a IVM (Osei-Atweneboana et al., 2007) y actualmente se han notificado respuestas subóptimas a la IVM (Ali et al., 2002; Awadzi et al., 2004a, 2004b) en el parásito filaria humano *O. volvulus*. Cabe destacar que *O. volvulus* está filogenéticamente mucho más próximo a *D. immitis* que los parásitos tricostrongílicos o *C. elegans*. Se han realizado extensas investigaciones en los cambios genéticos que pueden estar asociados con una resistencia a la IVM en desarrollo en *O. volvulus*. Eng y Prichard (2005) investigaron un gran número de genes candidatos y no candidatos para determinar su asociación con la resistencia a IVM en *O. volvulus*. No se encontraron indicios de la selección en los genes de GluCl o de GABA-Cl, pero se observó una selección significativa en el gen de la β -tubulina y la P-glicoproteína. Otras investigaciones han confirmado la selección en el gen de β -tubulina (Eng et al., 2006; Bourguinat et al., 2007), de P-glicoproteína y en otros genes de transportadores ABC en *O. volvulus* (Ardelli y Prichard, 2004; Ardelli y Prichard, 2007; Ardelli et al., 2005; 2006a; 2006b; Bourguinat et al., 2008). Se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para la selección de IVM para *O. volvulus* en β -tubulina (Eng et al., 2006) y un transportador ABC de mitad de tamaño, OvPLP (Bourguinat et al., 2008) y pueden ser marcadores útiles para la monitorización de la resistencia a lactonas macrocíclicas en este nematodo filaria.

La pérdida de eficacia de los preventivos de lactonas macrocíclicas del gusano del corazón podría tener una base genética e indicar una resistencia farmacológica en desarrollo en *Dirofilaria immitis*. La IVM es un sustrato de la P-glicoproteína (Lespine et al. 2009) y se ha demostrado que la P-glicoproteína está implicada en la resistencia a los antihelmínticos de avermectina (Xu et al. 1998).

La presente invención se refiere a procedimientos y kits para determinar la capacidad de respuesta de un nematodo *Dirofilaria immitis* a una lactona macrocíclica y a una molécula de ácido nucleico aislada de dicho nematodo.

Molécula de ácido nucleico

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado que posee una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEC ID N°: 1 sobre la totalidad de su longitud y que comprende el nucleótido guanina (G) en una posición correspondiente a la posición 11 de la SEC ID N° 1 y el nucleótido guanina (G) en una posición correspondiente a la posición 618 de la SEC ID N° 1.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia representada en la SEC ID N°: 1.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" "secuencia de nucleótido" o "molécula de ácido nucleico" puede hacer referencia a un polímero de ADN y/o ARN que puede ser de una o de dos cadenas y que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticos, no naturales o alterados capaces de incorporarse en los polímeros de ADN o ARN. "Ácidos nucleicos", "secuencias de ácido nucleico" o "moléculas de ácido nucleico" pueden abarcar genes, ADNc, ADN (por ejemplo, ADN genómico) y ARN codificados por un gen ". Los ácidos nucleicos o secuencias de ácido nucleico pueden comprender al menos 3, al menos 10, al menos 100, al menos 1.000, al menos 5.000, o al menos 10.000 nucleótidos o pares de bases.

"Ácidos nucleicos", "secuencias de ácido nucleico" o "moléculas de ácido nucleico" se pueden modificar mediante cualquier medio químico y/o biológico conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, la reacción con cualquier sustancia química conocida tales como agentes alquilantes, azúcares de tostado etc.; conjugación con un grupo de unión (por ejemplo PEG); metilación, oxidación, radiación ionizante o la acción de carcinógenos químicos. Dichas modificaciones de ácido nucleico se pueden producir durante la síntesis o procesamiento o tras el tratamiento con reactivos químicos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "consiste esencialmente en" o "que consiste esencialmente en" significa que la secuencia de ácido nucleico puede incluir una o más bases nucleotídicas, incluido dentro de la secuencia o en uno o ambos extremos de la secuencia, pero que las bases nucleotídicas adicionales no afectan materialmente a la función de la secuencia de ácidos nucleico.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia correspondiente a la de la SEC ID N° 1 sobre su longitud. En realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico puede ser al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 81 %, al menos aproximadamente 82 %, al menos aproximadamente 83 %, al menos aproximadamente 84 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % idéntica a la SEC ID N° 1, pero que se aisló de un nematodo que tiene el genotipo GG en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" puede hacer referencia a una molécula de ácido nucleico que no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia de polinucleótidos mayor; y/o puede carecer sustancialmente de cualquier otra molécula de ácido nucleico u otro contaminante que se encuentra en su ambiente natural. Como se usa en el presente documento, una "molécula de ácido nucleico aislada" puede abarcar también moléculas de ácido nucleico producidas de forma recombinante o sintética.

El término "identidad" o "idéntico/a" se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas polipeptídicas o polinucleotídicas. La identidad se puede determinar comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de identidad entre las secuencias de aminoácido o de ácido nucleico es una función del número de aminoácidos o ácidos nucleicos idénticos o equivalentes en las posiciones compartidas por las secuencias, por ejemplo sobre una región especificada. La alineación óptima de secuencias para comparaciones de identidad se puede realizar usando diversos algoritmos, como se conocen en la técnica, incluyendo el programa Clustal W™, disponible en <http://clustalw.genome.ad.jp>, el algoritmo de homología local de Smithy Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482, el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, y las implementaciones computerizadas de estos algoritmos (tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE.UU.). La identidad de secuencia se puede determinar usando el algoritmo BLAST (por ejemplo, BLASTn y BLASTp), descrito por Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 (usando los parámetros predeterminados publicados) El software para realizar el análisis BLAST está disponible a través del National Center for Biotechnology Information (sitio web en www.ncbi.nlm.nih.gov/). En un aspecto, se pueden alinear dos secuencias usando la herramienta "Blast 2 Sequences" en el sitio web del NCBI en los parámetros predeterminados (Tatusova y Madden. FEMS Microbiol Lett, 174: 247-250 (1999). En otra realización, el experto en la técnica puede alinear fácil y adecuadamente cualquier secuencia dada y deducir la identidad/homología de secuencia mediante simple inspección visual.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede derivarse de un nematodo *Dirofilaria immitis* con el genotipo GG en la P-glicoproteína en las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1. Como se usa en el presente documento, "derivado de" puede hacer referencia a una molécula de ácido nucleico que se aisló de una fuente natural, por ejemplo un nematodo *Dirofilaria immitis*. También puede hacer referencia a una molécula de ácido nucleico hecha por el hombre, por ejemplo de forma recombinante o sintetizada en base a una molécula de ácido nucleico aislada de un nematodo *Dirofilaria immitis*.

Como se usa en el presente documento, "genotipo" hace referencia a la constitución genética de una célula, un organismo o un individuo (es decir, la composición de alelos específica del individuo) normalmente con respecto a un carácter específico en consideración. En el contexto de la invención, por ejemplo un genotipo GG puede significar

que en una posición específica de un gen que tiene dos alelos, el nucleótido en la misma ubicación en cada alelo es G (guanina). Los alelos son secuencias de ADN alternativas en el mismo locus físico, que puede o no dar como resultado diferentes rasgos fenotípicos. En cualquier organismo diploide concreto, con dos copias de cada cromosoma, el genotipo de cada gen comprende el par de alelos presentes en dicho locus, que son los mismos en los homocigotos y diferentes en los heterocigotos.

El análisis genético proporcionado en el presente documento vinculó la resistencia a lactonas macrocíclicas con una variante polimórfica de la P-glicoproteína. Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio polimórfico" hace referencia a una región en un ácido nucleico en el cual se observan dos o más secuencias nucleotídicas alternativas en una serie significativa de muestras de ácido nucleico de una población de individuos. En el presente documento se hace referencia a un sitio polimórfico que tiene un nucleótido de longitud como un "polimorfismo de un solo nucleótido" o un "SNP".

La secuencia representada en la SEC ID N° 1 codifica una porción de P-glicoproteína de *Dirofilaria immitis*. La P-glicoproteína se clonó primero en células de ovario de hámster chino y se caracterizó en base a su capacidad para conferir un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos a células tumorales que habían desarrollado resistencia a fármacos quimioterapéuticos [Juliano et al. Biochim. Biophys. Acta 455(1): 152-62, 1976].

La P-glicoproteína está ampliamente distribuida y se puede expresar en, por ejemplo, el epitelio intestinal, los hepatocitos, las células tubulares proximales renales, la glándula suprarrenal y las células endoteliales capilares que comprenden la barrera hematoencefálica y hematotesticular.

La P-glicoproteína es un miembro de la superfamilia de los transportadores del casete de unión a ATP (ABC). Específicamente, la P-glicoproteína es un miembro de la subfamilia de MDR/TAP que está implicada en la resistencia a múltiples fármacos. La P-glicoproteína es una bomba de eflujo de fármacos dependiente de ATP con una amplia especificidad por el sustrato. Puede ser responsable de la disminución de la acumulación de fármaco en células resistentes a múltiples fármacos y a menudo participa en el desarrollo de la resistencia a fármacos.

Un experto apreciará que una molécula de ácido nucleico derivada de un nematodo *Dirofilaria immitis* con el genotipo GG en las posiciones en la P-glicoproteína correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1 puede codificar una P-glicoproteína que difiere de la de un nematodo sensible a las lactonas macrocíclicas. Por ejemplo, dicha P-glicoproteína puede tener al menos una modificación de aminoácido. Una modificación de aminoácido no limitante puede incluir una sustitución de aminoácido. En una forma de realización, la sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustitución conservadora" hace referencia a la sustitución de un aminoácido por otro en una ubicación dada en el péptido, en la que la sustitución puede realizarse sin una pérdida sustancial de la función relevante. Al realizar dichos cambios, se pueden efectuar sustituciones de residuos de aminoácidos similares en base a la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral, por ejemplo su tamaño, carga, hidrofobicidad y similares, y se puede analizar el efecto de dichas sustituciones sobre la función del péptido mediante análisis de rutina.

Ejemplos específicos no limitantes de una sustitución conservadora incluyen los siguientes:

Residuo original	Sustituciones conservadoras
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val

Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

En otra forma de realización, la al menos una modificación de aminoácido puede ser una modificación por sustitución que afecta a la función de la P-glicoproteína. Por ejemplo, *Dirofilaria immitis* que expresa la P-glicoproteína modificada puede ser, por ejemplo, resistente o sensible a una lactona macrocíclica.

- 5 En otras formas de realización, la P-glicoproteína alterada puede ser un marcador del nematodo *Dirofilaria immitis* resistente a lactonas macrocíclicas; o puede contribuir a la resistencia a lactonas macrocíclicas en un nematodo *Dirofilaria immitis*.

Procedimientos de determinación de la capacidad de respuesta de *D. immitis* a una lactona macrocíclica

- 10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta de un nematodo *Dirofilaria immitis* a una lactona macrocíclica, comprendiendo dicho procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1.

- 15 En el contexto de la invención, es probable que un nematodo sea resistente a dicha lactona macrocíclica si el nematodo tiene el genotipo GG en las posiciones en la P-glicoproteína correspondiente a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1.

- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "capacidad de respuesta" puede significar que el nematodo responde tras la exposición a una lactona macrocíclica. En formas de realización de la invención, un nematodo puede responder siendo sensible o resistente a una lactona macrocíclica. La sensibilidad a una lactona macrocíclica significa que la lactona macrocíclica afecta de forma adversa al nematodo expuesto *Dirofilaria immitis*. Por ejemplo, una lactona macrocíclica puede ser letal o subletal para el nematodo *Dirofilaria immitis* o acortar su ciclo de vida. La resistencia es la reducción de la efectividad de un fármaco a la hora de curar una enfermedad o mejorar los síntomas de un paciente. Un nematodo *Dirofilaria immitis* puede ser resistente a una lactona macrocíclica si el fármaco que se quiere neutralizar es ineficaz. Un nematodo *Dirofilaria immitis* también puede ser resistente a una lactona macrocíclica si el fármaco, a una dosis específica que se quiere neutralizar, tiene un efecto reducido.

- 25 En formas de realización de la invención, la capacidad de respuesta de un nematodo a una lactona macrocíclica puede determinarse *in vivo* o *in vitro*.

- 30 En una forma de realización, se puede decir que un nematodo *Dirofilaria immitis* es resistente a una lactona macrocíclica si menos de aproximadamente el 93 %, menos de aproximadamente el 91 %, menos de aproximadamente el 89 %, menos de aproximadamente el 87 %, menos de aproximadamente el 85 %, menos de aproximadamente el 83 %, menos de aproximadamente el 81 %, menos de aproximadamente el 79 %, menos de aproximadamente el 77 %, menos de aproximadamente el 75 %, menos de aproximadamente el 73 %, menos de aproximadamente el 71 %, menos de aproximadamente el 69 %, menos de aproximadamente el 67 %, menos de aproximadamente el 65 %, menos de aproximadamente el 63 %, menos de aproximadamente el 61 %, menos de aproximadamente el 59 %, menos de aproximadamente el 57 %, menos de aproximadamente el 55 %, menos de aproximadamente el 53 %, menos de aproximadamente el 51 %, menos de aproximadamente el 49 %, menos de aproximadamente el 47 %, menos de aproximadamente el 45 %, menos de aproximadamente el 43 %, menos de aproximadamente el 41 %, menos de aproximadamente el 39 %, menos de aproximadamente el 37 %, menos de aproximadamente el 35 %, menos de aproximadamente el 33 %, menos de aproximadamente el 31 %, menos de aproximadamente el 29 %, menos de aproximadamente el 27 %, menos de aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 23 %, menos de aproximadamente el 21 %, menos de aproximadamente el 19 %, menos de aproximadamente el 17 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 13 %, menos de aproximadamente el 11 %, menos de aproximadamente el 9 %, menos de aproximadamente el 7 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 1 % o si el 0 % de los nematodos murió tras la siguiente exposición a una dosis o concentración DL95 (una dosis o concentración letal de un fármaco que debería haber matado al 95 % de los nematodos *Dirofilaria immitis*) de una lactona macrocíclica.
- 45

En otra forma de realización, se puede decir que un nematodo *Dirofilaria immitis* es sensible a una lactona macrocíclica si, como máximo aproximadamente el 5 %, como máximo aproximadamente el 4 %, como máximo aproximadamente el 3 %, como máximo aproximadamente el 2 %, como máximo aproximadamente el 1 % o si el 0 % de los nematodos había sobrevivido después de la exposición a una dosis o concentración DL95 (una dosis o concentración letal de un fármaco que debería haber matado al 95 % de los nematodos *Dirofilaria immitis*) de una lactona macrocíclica.

Contacto de la muestra de ácido nucleico con una sonda

Una muestra biológica que comprende un nematodo *Dirofilaria immitis* se puede obtener de un sujeto. El sujeto puede ser, sin limitaciones, un perro, zorro, lobo, coyote o gato. En el contexto de la invención, una muestra biológica puede ser cualquier muestra (por ejemplo, fluido corporal, excremento, órgano, tejido etc.) de un sujeto. La muestra biológica puede proceder de un sujeto que se sabe que tiene, o se sospecha que tiene una infección por el nematodo *Dirofilaria immitis*. El nematodo *Dirofilaria immitis* se puede aislar de la muestra biológica con procedimientos y técnicas de separación estándar.

Una muestra de ácido nucleico se puede aislar u obtener de un nematodo *Dirofilaria immitis* antes de usar. Los procedimientos de aislar los ácidos nucleicos de organismos y tejidos se conocen. Dichos procedimientos pueden incluir, entre otros, extracción tradicional de ADN, con digestión con la proteinasa K seguido de extracción en fenol-cloroformo, extracción con hidróxido sódico y rotura física, seguido de purificación, por ejemplo mediante centrifugación con cloruro de cesio o cromatografía de alto rendimiento (HPLC); o el uso de kits comerciales, por ejemplo QIAamp™ o DNeasy™. Un experto apreciará que se pueden usar diferentes enfoques para aislar una muestra de ácido nucleico de un nematodo *Dirofilaria immitis* adulto en comparación con una microfilaria. En una forma de realización de la invención, la muestra de ácido nucleico comprende ADN genómico.

Una muestra de ácido nucleico puede ponerse en contacto con una sonda para determinar el genotipo de un nematodo en una o más posiciones en la P-glicoproteína. Se pueden usar un medio de incubación y condiciones de incubación adecuados para incubar la sonda y la muestra. En una forma de realización, la sonda y la muestra de ácido nucleico se pueden incubar en cualquier medio que permita que la sonda y la muestra de ácido nucleico interactúen, por ejemplo por contacto. Por ejemplo, el medio de incubación puede ser un tampón, tal como PBS. Un experto apreciará que la composición del medio de incubación puede depender de la sonda usada y/o de los constituyentes de la muestra de ácido nucleico.

Sonda

Los procedimientos y kits de la invención pueden comprender una sonda para detectar el genotipo del nematodo en una posición en la P-glicoproteína. Se puede usar una sonda de la invención para determinar de forma simultánea o en serie el genotipo del nematodo en las posiciones en la P-glicoproteína correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1.

Una sonda de la invención puede ser una o más moléculas que se pueden unir a, o asociar con, la muestra de ácido nucleico para determinar el genotipo del nematodo en una o más posiciones específicas en la P-glicoproteína. A este respecto, la sonda puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido, un cebador, un aptámero o un anticuerpo.

Un oligonucleótido de la invención puede determinar el genotipo de un nematodo en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1, de un modo específico de alelo. Un oligonucleótido puede comprender cualquier tamaño, forma y composición que sea adecuado para usar en el contexto de la invención. Preferentemente, un oligonucleótido de la invención puede comprender ADN, ARN, nucleótidos sintéticos, nucleótidos no naturales, nucleótidos alterados o combinaciones de uno o más de los mismos. En una forma de realización, un oligonucleótido de la invención puede comprender ácidos nucleicos cerrados y/o ácidos nucleicos peptídicos.

Un oligonucleótido puede tener cualquier longitud que sea adecuada para su uso en los procedimientos de la invención. En general, un oligonucleótido que es capaz de detectar el genotipo de un nematodo en una posición no interfiere con la detección en la otra. No obstante, un oligonucleótido de la invención puede ser capaz de detectar de forma simultánea el genotipo de un nematodo en dos posiciones (por ejemplo, en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1). En formas de realización de la invención, un oligonucleótido puede comprender una secuencia de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250, o más nucleótidos.

En formas de realización de la invención, un oligonucleótido puede abarcar, sin limitaciones, un cebador o más de un cebador, por ejemplo un par de cebadores, tal como un cebador directo y un cebador inverso.

Un cebador puede ser un oligonucleótido que se puede usar para iniciar la replicación del ADN. Normalmente, un cebador es un oligonucleótido corto que puede tener aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45,

aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100 o más nucleótidos.

- 5 Un cebador se puede usar como parte de un enfoque para detectar el genotipo de un nematodo en una localización específica de un gen. Por ejemplo, un cebador puede ser útil en la amplificación del ADN, tal como mediante CR, RT-PCR y qRT-PCR, para el posterior análisis, tal como transferencia de tipo Southern, secuenciación o SSCP.

10 Como se usa en el presente documento, un "aptámero" puede ser un ácido nucleico o una molécula peptídica que se une a una diana molecular específica. Por ejemplo, en solución, una cadena de nucleótidos puede formar interacciones intramoleculares que pliegan el aptámero en una forma tridimensional compleja. La forma del aptámero le permite unirse estrechamente a la superficie de su molécula diana. Dada la diversidad de formas moleculares que existen para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, se pueden obtener aptámeros para una amplia gama de dianas moleculares, incluyendo, entre otras, moléculas de ácido nucleico, enzimas, proteínas de membrana, proteínas virales, citocinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

15 Un aptámero de la invención puede ser una molécula de ácido nucleico. Dicho aptámero puede comprender ADN, ARN, nucleótidos sintéticos, nucleótidos no naturales, nucleótidos alterados o combinaciones de uno o más de los mismos. El aptámero de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un aptámero de ácido nucleico puede comprender una secuencia de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 500, o más nucleótidos. Un aptámero de ácido nucleico preferido puede ser una molécula de ácido nucleico monocatenaria y comprender una secuencia de menos de aproximadamente 100 nucleótidos.

20 Un aptámero de la invención puede ser una molécula peptídica. Un aptámero peptídico puede comprender una secuencia de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250, o más restos de aminoácidos. Un aptámero peptídico preferido puede comprender una secuencia de entre aproximadamente 15 a aproximadamente 75 restos de aminoácidos.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "péptidos", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se pueden usar de forma intercambiable y pueden abarcar cualquier cadena de aminoácidos de origen natural o no natural (D- o L-aminoácidos), con independencia de la longitud (por ejemplo, al menos 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100 o más aminoácidos) o modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación) o la presencia de, por ejemplo, uno o más grupos acilo no amino (por ejemplo, azúcar, lípido etc.) unido de forma covalente al péptido e incluye, por ejemplo, proteínas naturales, polipéptidos sintéticos o recombinantes, moléculas híbridas, peptoides, peptidomiméticos etc. Los péptidos también pueden ser monoméricos o multiméricos. Los fragmentos peptídicos pueden comprender un periodo contiguo de al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 1000, al menos 1500, o al menos 2500 aminoácidos consecutivos y pueden conservar la actividad deseada del péptido de longitud completa.

30 Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" puede incluir anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de dominio único y fragmentos de anticuerpos. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El término "anticuerpo" también puede incluir anticuerpos quiméricos o humanizados.

35 Se puede preparar una sonda de la invención de acuerdo con técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, una sonda se puede producir de forma sintética, recombinante o se puede aislar de una fuente natural. En una forma de realización, la fuente puede ser una fuente biológica, por ejemplo de un microorganismo (por ejemplo, una bacteria o un virus), un animal (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, una cabra o un ser humano) o una planta.

40 En el contexto de la invención, "una sonda" puede significar una sonda o más que una sonda. En una forma de realización, se puede usar una sola sonda para detectar el genotipo de un nematodo en las posiciones en la P-glicoproteína correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1. Un experto en la técnica apreciaría que una o más sondas pueden ser útiles en el contexto de la invención y pueden depender del enfoque de genotipificación usado. Por ejemplo, un cebador a menudo se usa en pares, es decir un cebador directo y un cebador inverso, en las reacciones de amplificación. Los productos amplificados pueden analizarse después para identificar el nucleótido en una ubicación específica.

Uno o más tipos de sondas se pueden usar de forma simultánea en los procedimientos de la invención. En una forma de realización se pueden usar dos sondas de diferentes tipos para detectar de forma simultánea en una secuencia desde una posición en el nematodo correspondiente a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1. Por ejemplo, una sonda puede ser un oligonucleótido para detectar un nucleótido en una posición correspondiente a la posición 11 de la SEC ID N°: 1; y otra sonda puede ser un anticuerpo para detectar el nucleótido en una posición correspondiente a la posición 618 de la SEC ID N°: 1. En otra forma de realización, las dos sondas pueden comprender el mismo tipo de molécula.

El diseño y la producción de sondas son conocidos en la técnica. En general, una sonda se puede producir de forma recombinante, sintéticamente o aislarse de una fuente natural, por ejemplo de una célula, un animal o una planta. No obstante, un experto en la técnica apreciará que la producción de sondas puede depender del tipo de sonda en cuestión.

Un experto en la técnica apreciará que una sonda de la invención puede tener que ser capaz de diferenciar entre el genotipo GG/GG (es decir, un nematodo que tiene un genotipo GG en las posiciones en la P-glicoproteína correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1) de los otros posibles genotipos, por ejemplo AA/AA, AG/AAAG/AGAA/AG, etc. Una sonda preferida puede ser una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un cebador) con o sin un fluoróforo o colorante. Una sonda puede ser lineal o tener la forma de una horquilla, con un fluoróforo, con o sin un inactivador u otro fluoróforo (por ejemplo, para análisis FRET). También podría ser un anticuerpo que reconoce específicamente la secuencia de ADN (o proteína). Otra sonda podría basarse en una molécula de ARN. Lo que sería preferido puede depender de las consideraciones técnicas, la estabilidad, los costes, la facilidad de uso etc.

Determinación del genotipo

Un experto en la técnica entenderá que se pueden usar enfoques de rutina para determinar el genotipo de un nematodo en una o más posiciones en la P-glicoproteína. Enfoques adecuados para su uso en el contexto de la invención pueden incluir, entre otros, PCR, RT-PCR, qRT-PCR, SSCP, hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo y el uso de anticuerpos para determinar el genotipo de un nematodo en las posiciones en la P-glicoproteína correspondiente a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1. Otros enfoques pueden incluir hibridación de ácido nucleico con micromatrices o esferas de ADN, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (t-RFLP), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y amplificación con sonda dependiente de unión multiplex (MLPA).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (documentos US 4,683,195; 4,683,202; y 4,965,188) es un procedimiento que se usa para aumentar la concentración de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra. El procedimiento implica normalmente el uso de cebadores directos e inversos que son complementarios a la secuencia diana para amplificar la secuencia diana; y un ciclo de tres temperaturas para estimular la desnaturalización, hibridación y extensión.

La RT-PCR cuantitativa se usa para cuantificar ARNm en términos tanto relativos como absolutos. La PCR en tiempo real se basa en el principio de la PCR pero permite la detección y cuantificación fiables de las secuencias de ácido nucleico. Las reacciones de PCR se pueden dividir en tres segmentos: una fase exponencial, una fase lineal y una fase de meseta. En teoría, durante la fase exponencial, existe una relación cuantitativa entre la cantidad de la secuencia diana de partida y la cantidad de producto de PCR en cualquier ciclo dado. En la fase exponencial, un instrumento de PCR en tiempo real calcula dos valores. La línea umbral es el nivel de detección en el cual una reacción alcanza una intensidad fluorescente por encima del fondo. El ciclo de PCR en el cual la muestra alcanza este nivel se denomina Umbral del Ciclo, U_c . El valor del U_c se usa en análisis de cuantificación o de detección de presencia/ausencia. Comparando los valores de U_c de las muestras de concentración conocida con una serie de patrones, la cantidad de ADN molde en una reacción desconocida se puede determinar con precisión.

La PCR en tiempo real se apoya en la actividad nucleasa de la polimerasa y el uso de una molécula indicadora que se une al producto de amplificación. Las moléculas indicadoras habituales incluyen, entre otras, (1) el uso de colorantes fluorescentes que se intercalan con el ADN bicatenario y (2) sondas de oligonucleótidos de ADN modificadas que emiten fluorescencia cuando se hibridan con un ADN complementario. Por ejemplo, la molécula indicadora puede comprender un oligonucleótido marcado que se une a una diana que se va a amplificar (molde). El oligonucleótido marcado puede comprender una molécula fluorescente en un extremo y una molécula inactivadora en el otro, que inactiva la fluorescencia de la molécula fluorescente. A medida que la polimerasa recorre el molde, alcanzará y escindirá la molécula fluorescente a partir del oligonucleótido marcado. La fluorescencia de la molécula fluorescente escindida se puede detectar. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de molde/producto de la PCR producido.

Las moléculas de ácido nucleico amplificadas pueden usarse junto con enfoques para determinar el genotipo de un nematodo con respecto a la P-glicoproteína. Dichos enfoques pueden incluir, sin limitaciones, secuenciación de ADN, hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo, análisis de transferencia de tipo Southern y SSCP.

La técnica del polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP) es un medio simple y eficiente para detectar cualquier pequeña alteración en el producto amplificado por PCR. Se basa en la suposición de que un cambio sutil de ácido nucleico afecta a la migración del fragmento de ADN monocatenario y, por tanto, tiene como resultado desplazamientos de movilidad visibles a través de un gel de poliacrilamida no desnaturizante (Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., y Sekiya, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2766-2770 (1989)).

Hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo. Un oligonucleótido específicos de alelo (OEA) es una pieza corta de ADN sintético complementario a la secuencia de un ADN diana variable. Puede actuar como sonda para detectar la presencia de la diana en un ensayo de transferencia de tipo Southern o en un ensayo de transferencia puntual. Un OEA es, normalmente, un oligonucleótido de 15-21 bases nucleotídicas de longitud. Está diseñado para ser específico de solo una versión, o alelo, del ADN que se está analizando. La longitud del OEA, cuya hebra se elige y las condiciones mediante las cuales se une a (y se lava de) el ADN diana desempeñan todos un papel en su especificidad. Estas sondas normalmente se pueden diseñar para detectar una diferencia de tan solo 1 base en la secuencia genética diana, una capacidad básica en el ensayo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Para su detección después de que se ha unido a su diana, el OAE se puede marcar con un marcador radiactivo, enzimático o fluorescente. Por ejemplo, la tecnología del ensayo de metilación Illumina del OAE para detectar una diferencia de un par de bases (citosina frente a timina) para medir la metilación en un sitio CpG específico. La PCR puede aparearse con un análisis de AOE [Saiki et al. Nature 324(6093): 163-166, 1986].

La secuenciación directa de ADN y las técnicas basadas en el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) se conocen ampliamente. El RFLP es una técnica para analizar las longitudes variables de los fragmentos de ADN que son el resultado de la digestión de una muestra de ADN con una endonucleasa de restricción, seguido de análisis de transferencia de tipo Southern. El patrón resultante se puede usar en la detección de polimorfismos. La secuenciación de ADN hace referencia en general a procedimientos para determinar el orden de las bases nucleotídicas, adenina, guanina, citosina y timina, en una molécula de ADN.

Otros procedimientos adecuados de genotipificación pueden incluir, sin limitaciones, análisis en micromatriz, amplificación SmartAmp2, pirosecuenciación, espectrometría de masas, balizas moleculares y ELISA (por ejemplo, ELISA en tira reactiva). Una micromatriz de ADN es una tecnología multiplex usada en biología molecular y en medicina. Consiste en una serie organizada de miles de puntos microscópicos de oligonucleótidos de ADN, conteniendo cada uno picomoles (10-12 moles) de una secuencia de ADN específica (sondas). Las micromatrices de ADN se pueden usar para medir los cambios en los niveles de expresión para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), para genotipificar o volver a secuenciar genomas mutantes (véase la sección de usos y tipos) de una muestra dada.

La posición 11 de la SEC ID N° 1 está dentro de un exón de la P-glicoproteína y la posición 618 de la SEC ID N° 1 corresponde a una región no codificante. Una *D. immitis* resistente a una lactona macrocíclica tiene el genotipo GG en una posición en la P-glicoproteína correspondiente a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1. Por tanto, una P-glicoproteína expresada en un nematodo *D. immitis* resistente a lactonas macrocíclicas puede tener una secuencia de aminoácidos alterada que puede ser útil para detectar de forma indirecta el genotipo GG de un nematodo en las posiciones en la P-glicoproteína correspondiente a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1. En una forma de realización de la invención, un anticuerpo que es capaz de detectar una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende guanina en una posición correspondiente a la posición 11 de la SEC ID N°: 1 puede ser útil en la detección del genotipo GG de un nematodo con respecto a la P-glicoproteína.

Una vez que se ha identificado un nematodo *Dirofilaria immitis* con el genotipo GG en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1, puede ser útil para confirmar el resultado. En una forma de realización se puede usar un ensayo funcional para confirmar que el nematodo es resistente a lactonas macrocíclicas. Por ejemplo, el nematodo *Dirofilaria immitis* se puede exponer a una dosis de una lactona macrocíclica, por ejemplo una dosis DL95 de una lactona macrocíclica, es decir una dosis del compuesto que es letal para el 95 % de *Dirofilaria immitis*.

Kits y envases comerciales

En formas de realización de la invención las sondas de la invención se pueden proporcionar al usuario como un kit. Un kit de la invención puede contener una o más sondas de la invención. Por ejemplo, un kit puede contener una sonda capaz de detectar del genotipo de un nematodo en las posiciones en la P-glicoproteína del nematodo en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1.

El kit puede comprender además uno o más reactivos, tampones, materiales de embalaje, instrucciones de uso del kit y recipientes para contener los componentes del kit.

Usos de los procedimientos y kits

Los procedimientos de la invención y los kits para llevar a cabo los procedimientos pueden tener aplicaciones de investigación, médicas e industriales. La invención encuentra una amplia aplicación en el tratamiento de los gusanos del corazón en animales infectados y en la detección de nematodos *Dirofilaria immitis* en una zona. Las aplicaciones

representativas no limitantes de la invención pueden incluir la detección, cuantificación y/o diagnóstico de la existencia de individuos o poblaciones de *Dirofilaria immitis* que no son susceptibles a las dosis normales de lactona macrocíclica para profilaxis o terapia. En una forma de realización, la capacidad de detectar y cuantificar moléculas de ácido nucleico de la invención es valiosa en cuanto a que instruirá a un veterinario practicante sobre la prescripción, y/o alteración, de un régimen quimioterapéutico para un animal infectado por nematodos *Dirofilaria immitis* portadores del genotipo GG en la P-glicoproteína en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1. La identificación de dichos nematodos *Dirofilaria immitis* resistentes a lactonas macrocíclicas pueden instruir a un veterinario para prescribir y/o cambiar de una terapia con lactona macrocíclica sola, una terapia que puede incluir agentes alternativos, tales como un adulticida (por ejemplo, fármacos basados en arsénico), dietilcarbamazina, antibióticos tales como tetraciclina y combinaciones de uno o más de los mismos con el fin de conseguir una cura y/o minimizar la propagación de la cepa resistente. Como alternativa, un veterinario puede prescribir una dosis atípica (por ejemplo, una dosis superior a lo normal) o ajustar la dosis actual de una lactona macrocíclica y/o el régimen de tratamiento usando una lactona macrocíclica en el tratamiento de un animal infectado con un nematodo resistente a lactonas macrocíclicas. Las tasas de dosis recomendadas típicas para lactonas macrocíclicas preventivas incluyen, por ejemplo 6 µg/kg para ivermectina; 500 mg/kg para milbemicina oxima; 3 µg/kg (mensualmente) para moxidectina; y 6 mg/kg para selamectina. Un veterinario también puede combinar uno o más de los enfoques terapéuticos y tratamientos indicados anteriormente en cualquier combinación adecuada para tratar a un animal infectado por un nematodo *Dirofilaria spp.*, por ejemplo un nematodo *Dirofilaria immitis* resistente a lactonas macrocíclicas. Por ejemplo, un veterinario puede tratar a dicho animal con un adulticida, tal como un fármaco basado en arsénico y, después, seguimiento con un microfilaricida, tal como una lactona macrocíclica o dietilcarbamazina.

En un caso, se puede usar un fármaco basado en arsénico para tratar a un animal infectado con un nematodo *Dirofilaria immitis* resistente a lactona macrocíclica. Un fármaco basado en arsénico puede incluir, entre otros, melarsomina diclorhidrato. La melarsomina diclorhidrato se puede usar, por ejemplo, a una dosis de 2,5 mg/kg, dos veces separadas por 24 horas. Esto se puede repetir en 4 meses en función de la respuesta al primer tratamiento y el estado, la edad y el uso del animal. No obstante, un experto en la técnica entendería que la dosis puede variar en función de la gravedad de la infección. Por ejemplo, un animal infectado, tal como un perro con enfermedad grave (de clase 3) puede recibir una dosis y dejar que se recupere durante unos pocos meses antes e recibir el conjunto completo de 2 dosis.

En otro caso, se puede usar dietilcarbamazina para tratar a un animal infectado con un nematodo *Dirofilaria immitis* resistente a lactona macrocíclica. La dietilcarbamazina puede usarse, por ejemplo, a una dosis de 25 a 50 mg por medio kilo de un animal. La duración de la administración puede depender de la afección que se esté tratando, la respuesta a la medicación y el desarrollo de cualquier efecto adverso.

En otro caso, se puede usar un antibiótico para tratar a un animal infectado con un nematodo *Dirofilaria immitis* resistente a lactona macrocíclica. Dicho antibiótico puede incluir, entre otros, tetraciclina. Una tetraciclina, tal como doxiciclina, que está dirigida a los endosimbiontes Wolbachia en *Dirofilaria immitis* se puede usar a, por ejemplo, una dosis de 10 mg/kg/día durante 40 días.

En un caso adicional, se puede usar otro agente antihelmíntico. Este otro agente antihelmíntico puede incluir, entre otros, acaciasidas. Un acaciasida se puede usar, por ejemplo, a una dosis de 10 mg/kg durante 7 días.

En otra formas de realización, la detección de poblaciones de nematodos de *Dirofilaria immitis* con el genotipo mencionado anteriormente en la P-glicoproteína puede instruir a un veterinario para prescribir el uso de agentes alternativos, tal como dietilcarbamazina, como profiláctico para proteger a animales susceptibles, por ejemplo perros.

En un caso, se puede usar dietilcarbamazina para prevenir la infección de un animal infectado con un nematodo *Dirofilaria immitis* resistente a lactona macrocíclica. A este respecto, se puede usar dietilcarbamazina, por ejemplo, a una dosis de 3 mg por medio kilo de un animal una vez al día.

En otra formas de realización, un kit de la invención puede ser útil como producto comercial en la detección de nematodos o *Dirofilaria immitis* resistentes a lactona macrocíclica. Dicho producto puede ser adecuado para usar, sin limitaciones, un veterinario, un médico, un propietario de una mascota, un granjero, un cuidador de zoológico, un epidemiólogo u otro consumidor en necesidad del mismo.

La invención se ilustra de forma adicional mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo: 1.

Materiales y procedimientos

Muestras

Se analizaron cuatro grupos de muestras: El grupo A corresponde a treinta y nueve gusanos individuales puros que nunca habían estado expuestos a lactonas macrocíclicas. El Grupo B corresponde a treinta y cinco gusanos individuales expuestos, o sus ancestros habían estado probablemente expuestos, a lactonas macrocíclicas en Florida, Louisiana y Texas. Para estos ejemplos, el historial de tratamiento de los perros no es preciso, aunque en estas regiones las lactonas macrocíclicas se usan habitualmente. El Grupo C corresponde a ciento diecisiete microfilarias individuales que mostraron en *un ensayo* in vitro una sensibilidad baja a la IVM. El Grupo D corresponde a treinta y tres gusanos individuales expuestos, o sus ancestros habían estado probablemente expuestos, a lactonas macrocíclicas en Japón. Para estos ejemplos, el historial de tratamiento de los perros no es preciso, aunque en Japón se usan habitualmente lactonas macrocíclicas.

Experimento

Se recogieron microfilarias de tres perros llamados Tip, Kendall y Tootie. Estas microfilarias proceden de la misma población que el grupo C. Se realizó un ensayo in vitro con estas microfilarias de cada perro individual usando una dosis de la dosis letal del 95 % de IVM (IVM-DL⁹⁵), lo que significa que a dicha dosis, el 95 % de las microfilarias no expuestas previamente deberían estar muertas. Se contaron las microfilarias que murieron. Después, las microfilarias se incubaron con una segunda dosis de IVM que corresponde a dos veces la IVM-DL⁹⁵. Se contaron las microfilarias que murieron.

Biología molecular

El ADN genómico de los gusanos adultos individuales se extrajo con el kit DNeasy™ de Qiagen (Qiagen Inc, Mississauga, Canadá). La extracción del ADN genómico de las microfilarias individuales se extrajo usando el kit de ADN QIAamp de Qiagen, seguido del kit de detección selectiva Repli-g® de Qiagen, que permite la amplificación del genoma completo a partir de una cantidad de ADN muy pequeña. Solo se dispone de unas pocas secuencias de *D. immitis* en GenBank, así que se realizó bioinformática en base a las secuencias de *O. volvulus*, *B. malayi*, *C. elegans* o *H. contortus*, para poder amplificar un segmento de 620 pb del gen de la glicoproteína *D. immitis*. La amplificación se realizó mediante PCR usando los cebadores siguientes: Pgp-1-sentido 5' gga caa tta tcc ggt ggt ca 3' [SEC ID N°: 2] y Pgp-1-antisentido 5' tcg caa att tcc ttc cac tt 3' [SEC ID N° 3]. La desnaturalización se realizó a 94 °C durante 45 s; hibridación a 56 °C durante 45 s; y extensión a 68 °C durante 2 minutos para 35 ciclos. La amplificación por PCR se confirmó mediante electroforesis en gel a 100V durante 40 minutos con un gel de agarosa al 1 % que contiene 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Los productos de la PCR se secuenciaron usando el sistema analizador de ADN 3730XL (McGill University/Genome Quebec Innovation Centre). Se usó la Taq ADN de High Fidelity Platinum® Taq (Invitrogen) en la reacción de PCR para evitar la introducción de errores durante la amplificación. Cada cromatograma individual se analizó con el software Sequencher™ 4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI 48108, EE.UU.). Este programa permitió la discriminación en cada nucleótido y la selección de únicamente picos secundarios que fueron más del 90 % del pico del nucleótido principal en el cromatograma. Este elevado nivel de discriminación proporcionó confianza en la determinación de homocigosidad y heterocigosidad en las posiciones polimórficas.

Análisis estadístico

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP= del grupo C (de baja respuesta a lactonas macrocíclicas) se compararon con las frecuencias genotípicas de los SNP de los otros tres grupos usando la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher.

La regresión lineal para evaluar si existe una correlación entre el genotipo de la P-glicoproteína de las microfilarias del grupo C y su correspondiente fenotipo de Ivermectina-DL⁹⁵ % se realizó usando la versión 5.00 para Windows del software GraphPad Prism, software GraphPad, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Resultados

Se encontraron dos SNP frecuentes en el fragmento analizado [Figura 1; SEC ID N°: 1]. Uno se localizó en la posición 11 (A11G) de dicho fragmento analizado, mientras que el segundo estaba en la posición 618 (A618G). El SNP A11G estaba en una región de codificación justo antes del segundo dominio de unión a TAP y tuvo como resultado un cambio de amino desde una lisina a arginina. El SNP A618G se localizó en una región no codificante. En base a las secuencias disponibles de *O. volvulus*, *B. malayi* y *C. elegans*, el fragmento analizado comenzará aproximadamente en la posición .1200 de la secuencia de aminoácidos.

Entre los 37 gusanos adultos genotipados en el grupo A, las frecuencias del genotipo en la posición 11 de los homocigotos AA, GG y heterocigotos AG fue del 81,1 %, 0 % y 18,9 % respectivamente. Entre los 34 gusanos adultos genotipados en el grupo B, las frecuencias del genotipo en la posición 11 de los homocigotos AA, GG y heterocigotos AG fue del 91,2 %, 2,9 % y 5,9 % respectivamente. Entre las 92 microfilarias que se genotipificaron en el grupo C, las frecuencias del genotipo en la posición 11 de los homocigotos AA, GG y heterocigotos AG fue del 57,6 %, 35,9 % y 6,5 % respectivamente. Entre los 33 gusanos adultos genotipados en el grupo D, las frecuencias del genotipo en la posición 11 de los homocigotos AA, GG y heterocigotos AG fue del 100 %, 0 % y 0 % respectivamente [Figura 2]. La frecuencia del genotipo homocigoto AA fue significativamente menor en el Grupo C en comparación con el Grupo A ($p=0,008$), Grupo B ($p=0,0001$) y Grupo D ($p=0,000006$). La frecuencia del genotipo

homocigoto GG fue significativamente mayor en el Grupo C en comparación con el Grupo A ($p=0,000001$), Grupo B ($p=0,00005$) y Grupo D ($p=0,000006$) [Tabla 1]. Además, la frecuencia del alelo A y el alelo G fue significativamente menor y mayor, respectivamente, en el Grupo C en comparación con el Grupo A ($p=0,000002$), Grupo B ($p=0,0000001$) y Grupo D ($p=0,0000000001$) [no mostrado].

Tabla 1: Comparación de la frecuencia del genotipo del SNP en la posición 11 del grupo C frente a los otros tres grupos

Grupo C			
	AA Valor p	AG Valor p	GG Valor p
Grupo A	0,008.	0,04	0,000001
Grupo B	0,0001	0,6	0,00005
Grupo D	0,000006	0,1	0,000006

El genotipo del SNP en la posición 11 y 618 se combinó [Figura 3]. Por ejemplo, el genotipo AA-GG correspondía a al genotipo AA en la posición 11 y el genotipo GG en la posición 618. Entre los 9 fenotipos combinados posibles, solo se encontraron seis genotipos diferentes en la población de la muestra total, AA-AA, AA-GG, AA-AG, AG-GG, AG-AG y GG-GG. En el Grupo D, solo se encontró el genotipo AA-GG. Algunos genotipos se encontraron en algunos grupos como GG-GG en el grupo A, AG-AG y AA-AA en el grupo B. El grupo C fue el único grupo en el que se encontraron los seis genotipos diferentes. Es interesante el hecho de que el genotipo GG-GG fue significativamente mayor en el Grupo C en comparación con el Grupo A ($p=0,000001$), Grupo B ($p=0,00005$) y Grupo D ($p=0,000006$) [Tabla 2] y no se encontró en los grupos A y D.

Tabla 2: Comparación de la frecuencia del genotipo del SNP combinado en las posiciones 11 y 618 del grupo C frente a los otros tres grupos

Grupo C						
	AA-AA valor p	AA-GG valor p	AA-AG valor p	AG-GG valor p	AG-AG valor p	GG-GG valor p
Grupo A	0,1	0,07	0,0000007	0,1	0,1	0,000001
Grupo B	0,2	0,00007	0,4	0,5	0,5	0,00005
Grupo D	0,2	0,00000002	0,7	0,3	0,5	0,000006

El grupo C es un grupo de microfilarias individuales aisladas de tres perros: Tip, Kendall y Tootie. Las microfilarias de Tip y Kendall fueron los únicos genotipos GG-GG y AA-GG, mientras que se encontraron seis genotipos diferentes en las microfilarias de Tootie [Figura 4]. La frecuencia del genotipo GG-GG fue 51,3 %, 30,7 % y 20,7 % en microfilarias recogidas de Tip, Kendall y Tootie respectivamente.

El estudio *in vitro* [Tabla 3] mostró que solo el 8 % y el 39 % de las microfilarias de Tip murieron tras la exposición a una dosis de IVM a la DL_{95} %, que es la dosis a la que el 95 % de las microfilarias deben morir. Exponiendo las microfilarias de Tip al doble de la DL_{95} %, solo el 24,1 % y el 50,4 % murieron. El 56 % y el 79 % de las microfilarias de Kendall y Tootie murieron tras una dosis de IVM a la DL_{95} %, no obstante el 99,2 % y el 100 % de las microfilarias de esos dos perros murieron tras la exposición al doble de la DL_{95} %.

Tabla 3: Resultados del ensayo *in vitro*

IVM	Tip	Tip	Kendall	Tootie
DL_{95}	5/62,2	13/33,3	14,2/25,6	27,5/35
	8 %	39 %	56 %	79 %
DL_{95} (x2)	14,2/58,8	16,3/32,3	25/25,2	44,2/44,2
	24,1 %	50,4 %	99,2 %	100 %

Se encontró una correlación significativa (bondad del ajuste $r^2=0,93$; $p=0,008$) [Figura 5] entre el genotipo GG-GG de las microfilarias de Tip, Kendall y Tootie y su fenotipo IVM- DL_{95} %.

Análisis

A partir de diferentes informes con nematodos veterinarios y más recientemente en *O. volvulus*, que está filogenéticamente más estrechamente relacionado con *D. immitis*, se sabe ahora que se produce selección genética con el tratamiento repetido con lactonas macrocíclicas en los genes del transportador ABC. Con la nueva aparición de perros con respuestas bajas a lactonas macrocíclicas, es importante tener un marcador genético fiable para detectar cambios genéticos asociados con la potencial propagación de la resistencia a lactonas macrocíclicas.

El estudio es único porque se compararon muestras de *D. immitis* con un historial de tratamiento diferente y de diferentes regiones. A este respecto, los gusanos nunca expuestos a IVM se compararon con las muestras que habían estado expuestas a lactonas macrocíclicas y a muestras que mostraron respuestas bajas a IVM tras una fuerte exposición al fármaco. Cada muestra individual se secuenció para una región específica del gen de la P-glicoproteína que no estaba disponible en GenBank.

Los datos muestran que existe una clara presión de selección de lactonas macrocíclicas sobre el gen de la P-glicoproteína en *D. immitis*. El fenotipo GG-GG de la P-glicoproteína puede usarse como herramienta de marcador genético en el campo para seguir la diseminación de los respondedores subóptimos a IVM/lactonas macrocíclicas en perros infectados con gusanos del corazón.

Ejemplo: 2

Como se indica en el ejemplo 1, se encontró una fuerte correlación entre el genotipo GG-GG en una P-glicoproteína (número de acceso: HM596853 – **SEC ID N°: 6**) y un fenotipo de insensibilidad a IVM en un ensayo *in vitro* con mf de *D. immitis*; cuanto más insensibles eran las mf a IVM, mayor era la frecuencia del genotipo GG-GG. En este ejemplo, se comunica la respuesta al tratamiento en perros positivos para el gusano del corazón originarios de Nueva Orleans y se determinó la frecuencia del genotipo Pgp asociada con la falta de sensibilidad a lactonas macrocíclicas.

Materiales y procedimientos

Caso: El perro era un macho mezcla de labrador castrado nacido en febrero de 2006 y con un peso de aproximadamente 31 kg. Era un perro rescatado de Nueva Orleans,, Louisiana, EE.UU., recogido por el Equipo de Rescate de Boudreaux, Nueva Orleans, y transportado después a Canadá, donde fue adoptado en enero de 2008.

Diagnóstico: El perro fue llevado al hospital Main West Animal Hospital (MWAH) en Welland, Ontario el 6 de junio de 2008 (día 1) para una revisión. La sangre extraída del animal dio un resultado positivo en el análisis del antígeno del gusano del corazón PetChek® PF (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME)) y contenía mf de *D. immitis*. El 11 de junio de 11, 2008 (día 6), se realizaron pruebas iniciales (análisis de sangre, radiografías torácicas, exploración física, análisis de orina). La auscultación reveló un leve incremento de los ruidos broncovesiculares en los pulmones y un soplo cardíaco de grado III-IV/VI. El resto de la exploración física fue normal. La radiografía torácica reveló un aumento moderado de la parte derecha del corazón y un patrón pulmonar intersticial en el campo pulmonar caudodorsal. Estas exploraciones indicaron enfermedad por el gusano del corazón de clase 2.

Historial de tratamiento: Se inicio tratamiento con adulticida el 11 de junio de 2008 (día 6) con 2,5 mg/kg i.m. de melarsomina diclorhidrato (Immiticide®, Merial Inc.). Al tratamiento le siguieron dos tratamientos i.m con 2,5 mg/kg de melarsomina diclorhidrato el 9 de julio y el 10 de julio (días 34, 35). Durante los siguientes 90 días, con el fin de eliminar las mf circulantes, se trató al perro una vez con milbemicina oxima (MO) y dos veces con IVM (véase la **Tabla 4**). Los días 159 y 160, cuatro meses después de la última dosis de adulticida, se trató de nuevo al perro con 2,5 mg/kg de melarsomina diclorhidrato i.m.. El posterior análisis diagnóstico y los tratamientos microfilaricidas se resumen en la **Tabla 4**.

Pruebas del antígeno del gusano del corazón: Durante el tratamiento del perro se realizaron varias pruebas del antígeno del gusano del corazón, incluidas DiroChek® (Synbiotics Corporation, San Diego, CA) y PetChek® PF (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME), que son pruebas ELISA en micropocillos, y SNAP® PF (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME), una prueba en formato de membrana diseñada para el uso rápido en consulta (véase la **Tabla 4**).

Prueba de Knott: Se mezclaron nueve ml de 2 % de formalina y 1 ml de sangre (recogida en EDTA) en un tubo de centrifuga. La centrifugación se realizó en una centrifuga LW Scientific EZ Swing SK a 3.000 rpm (604 m/s²) durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante fluido. Al sedimento en el fondo del tubo de centrifuga se añadió una gota de 0,1 % de solución de azul de metileno, se mezclaron y una gota de la mezcla teñida se examinó al microscopio para detectar mf de *D. immitis*. La **Tabla 4** indica cuándo se realizó esta prueba, y cuando se determinó, el nivel de microfilaremia.

Análisis genético: El 12 de mayo de 2010 (día 706) se extrajo una muestra de sangre (5 ml) en EDTA para análisis genético de mf. La sangre era altamente microfilarémica. Se aislaron cincuenta y tres mf individuales vivas en la muestra de sangre. El ADN genómico de las mf individuales se extrajo usando el kit QIAamp DNA (Qiagen Inc, Mississauga, Canadá), seguido de amplificación del genoma completo con un kit de detección selectiva Repli-g® (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canadá). La amplificación por del gen la glicoproteína P (Pgp) se realizó usando los cebadores Pgp-1-sentido (5' gga caa tta tcc ggt ggt ca 3') [**SEC ID N°: 2**] y Pgp-1-antisentido 5' tgc caa att tcc ttc cac tt 3' [**SEC ID N° 3**]. Como se describe en el presente documento, se encontró que un genotipo GG en las posiciones

en la P-glicoproteína correspondiente a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1A se correlaciona con la insensibilidad a las LM. La desnaturalización se realizó a 94 °C durante 45 s; hibridación a 56 °C durante 45 s; y extensión a 68 °C durante 2 minutos para 35 ciclos. Se usó la Taq ADN de High Fidelity Platinum® Taq (Invitrogen) en la PCR para minimizar la introducción de errores durante la amplificación. La amplificación por PCR se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Los productos de la PCR se secuenciaron usando el sistema analizador de ADN 3730XL (Genome Quebec Innovation Centre, McGill University). Cada cromatograma se analizó con el software Sequencher™ 4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg: La estadística F jerárquica de Wright se calculó para un total de diez polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) diferentes de tres genes. Además de los dos SNP en la P-glicoproteína, medidos anteriormente, se investigaron ocho SNP adicionales, dos en un gen de β -tubulina (número de acceso: HM596854- SEC ID N°: 4), y seis en un gen de la proteína del choque térmico (número de acceso: HM596851 – SEC ID N°: 5), en base a un análisis previo realizado para determinar la información basal genética para *D. immitis*, que mostró polimorfismo en estos sitios.

Análisis estadístico: Las frecuencias del genotipo se compararon usando la prueba exacta de Fisher.

Resultados

Tratamiento: Dos días después de la última de tres dosis de melarsomina diclorhidrato en julio de 2008 (es decir, el día 37), el perro mostró signos transitorios compatibles con muerte de gusanos de corazón adultos (temperatura rectal elevada, letargo, tos, incremento de los ruidos pulmonares). Comenzando el día 41, estos signos se trataron con prednisona (Apo-Prednisone; Apotex, Toronto, ON, Canadá), 1,3 mg/kg dos veces al día durante 6 días.

Tras la administración de milbemicina oxima (MO) por vía oral a 0,74 mg/kg el día 74, IVM por vía oral a 50 ug/kg el día 95 e IVM por vía oral a 200 ug/kg (4X la tasa de dosis microfilaricida normal) el día 125, el perro permaneció continuamente microfilarémico. El día 207, seis semanas después del segundo régimen de tratamiento con melarsomina diclorhidrato, los días 159 y 160, una prueba de Knott seguía siendo positiva, por lo que se trató de nuevo al perro con 200 μ g/kg de IVM por vía oral. Un mes después, el día 242, una prueba del antígeno de *D. immitis* fue negativa, lo que confirmó que perro estaba libre de gusanos adultos. No obstante, el perro todavía estaba microfilarémico. Por tanto, comenzando el día 243, se administró al perro MO por vía oral a 0,74 mg/kg cada 2 semanas cuatro veces (véase la **Tabla 4**). A pesar de ello, el día 298 el perro seguía microfilarémico. Por consiguiente, se administró MO por vía oral a 1,1 mg/kg los días 298, 312, 326, 340 y 354. El día 356 se extrajo sangre del perro y se analizó: todavía había mf presentes y una prueba del antígeno de *D. immitis* todavía era negativa. El día 375, se envió una muestra de sangre al Animal Health Laboratory, University of Guelph (AHLUG): la microfilaremia era de 6.530 mf/ml, y una prueba del antígeno seguía siendo negativa (véase la **Tabla 4**). Como resultado, comenzando el día 384, se administró al perro MO por vía oral a 2,0 mg/kg una vez al día durante 7 días. El día 420, el perro tenía una microfilaremia de 355 mf/ml. El día 420, se trató de nuevo al perro con MO por vía oral a 2,0 mg/kg, lo que se continuó una vez al día durante 8 días. A pesar de este segundo régimen con dosis altas, el día 480, aunque todavía con un resultado negativo en la prueba del antígeno del gusano del corazón, el perro tenía una microfilaremia de 1.810 mf/ml.

Análisis genético: Se extrajo sangre del perro el día 706 y se aislaron las microfilarias en la sangre para análisis genético. Entre el día 428 y el día 706, no se trató al perro con lactonas macrocíclicas. La frecuencia del genotipo GG-GG en el gen Pgp fue del 45,3 % en las mf vivas aisladas de la muestra de sangre. El genotipo GG-GG hace referencia al genotipo Pgp en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1.

Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg: El coeficiente F varió de 0,23 a 1 para los diferentes SNP, lo que indica un exceso de homocigosidad en esta población (**Figura 6**). En particular, el exceso de homocigosidad fue muy alto para los SNP de Pgp (coeficientes F de 0,88 y 1).

Tabla 4 – Pruebas diagnósticas e historial de tratamiento para perros entre 2008 y 2009.

Fecha (Día)	Nombre de la prueba de antígeno- resultado (+ve o -ve)	Dosis del adulticida (melarsomina) *	Concentración de microfilarias en sangre (mf/ml)	Dosis del fármaco microfilaricida (V.O.)	Comentarios
2008					
6 de junio (1)	PetChek +ve ^a		Prueba de Knott + ve ^a		
11 de junio (6)		2,5 mg/kg			Clasificado como enfermedad del gusano del corazón de clase 2

ES 2 545 188 T3

9 de julio (34)		2,5 mg/kg			
10 de julio (35)		2,5 mg/kg			
18 de agosto (74)				MO, 0,74 mg/kg	
3 de septiembre (90).			Prueba de Knott + ve ^a		
8 de septiembre (95).				IVM, 50 µg/kg	
6 de octubre (123)			Prueba de Knott + ve ^a		
8 de octubre (125)				IVM, 200 µg/kg	
10 de noviembre (158)			Prueba de Knott + ve ^a		
11 de noviembre (159)		2,5 mg/kg			
12 de noviembre (160)		2,5 mg/kg			
12 de diciembre (190)				MO, 0,74 mg/kg	
29 de diciembre (207)			Prueba de Knott + vea		
30 de diciembre (208)				IVM, 200 mg/kg	
2009					
2 de febrero (242)	SNAP - ve ^a		Prueba de Knott + ve ^a ≥100b		Interpretación: ausencia de gusanos del corazón adultos
3 de febrero (243)				MO, 0,74 mg/kg	
17 de febrero (257)				MO, 0,74 mg/kg	
3 de marzo (271)			Prueba de Knott + ve ^a ≥100b	MO, 0,74 mg/kg	
17 de marzo (285)				MO, 0,74 mg/kg	
30 de marzo (298)			Prueba de Knott + ve ^a ≥100b	MO, 1,1 mg/kg	
13 de abril (312)				MO, 1,1 mg/kg	
27 de abril				MO, 1,1 mg/kg	

(326)					
28 de abril (327)			Prueba de Knott + vea		
11 de mayo (340)				MO, 1,1 mg/kg	
25 de mayo (354)				MO, 1,1 mg/kg	
27 de mayo (356)	SNAP - ve ^a		Prueba de Knott + ve ^a		Sin gusanos del corazón adultos
8 de junio (368)				MO, 1,1 mg/kg	
15 de junio (375)	DiroChek -ve ^c		Prueba de Knott + ve ^c 6530		Sin gusanos del corazón adultos
24 de junio (384)				MO, 2.0 mg/kg diarios durante 7 días	
30 de julio (420)			Prueba de Knott + ve ^c 355	MO, 2.0 mg/kg diarios durante 8 días	
28 de septiembre (480).	PetChek - ve ^a		Prueba de Knott + ve ^c 1810		
2010					
12 de mayo (706)					Microfilarias recogidas para análisis genético

MO = milbemicina oxima (Interceptor®); IVM = ivermectina (Ivomec® Inyección para ganado vacuno, ovejas y cerdos, Merial Inc.); *Adulticida = Immiticide®; a = Main West Animal Hospital (es decir, prueba llevada a cabo internamente); ^b = Idexx Laboratories; ^c = Animal Health Laboratory, University of Guelph

5 **Análisis**

- Se encontró que las mf o adultos de *D. immitis* de perros que se sabe que son sensibles a LM tenían frecuencias del genotipo GG-GG en el gen Pgp que varían de 0 a 18,5 %, mientras que las mf más resistentes a IVM (ensayo *in vitro*) tenían una frecuencia de GG-GG de 51,3 % y la frecuencia de este genotipo se correlacionó altamente con el nivel de insensibilidad a la IVM. En las mf del caso descrito en el presente documento, la frecuencia del genotipo GG-GG fue 45,3 % (p = 0,002 en comparación con las mf de una infección canina susceptible, y p = 0,000006 en comparación con los gusanos adultos de diferentes infecciones susceptibles, como se indica en el Ejemplo 1). La correlación hallada en el ejemplo 1 entre el genotipo de Pgp y el fenotipo de respuesta a IVM parece reflejar sensibilidad *in vivo* y sugiere un nivel elevado de insensibilidad a IVM en las mf del caso descrito. El elevado exceso de homocigosidad de los SNP de Pgp es coherente con la selección de un genotipo de Pgp particular como resultado de la presión farmacológica. Previamente se ha demostrado que MO e IVM matan las mf a 500 µg/kg y 50 µg/kg, respectivamente. No obstante, ninguno de los regímenes farmacológicos usados en este caso, a tasas de dosis aumentadas o usando múltiples protocolos de tratamiento (por ejemplo, MO a 2,0 mg/kg al día durante 8 días) eliminó las mf. Dado el fenotipo de respuesta al tratamiento y el genotipo que se ha demostrado que se correlaciona con la insensibilidad a LM, se puede extraer una conclusión de resistencia a LM en las *D. immitis* en este perro.
- Se ha sugerido que dos escenarios de tratamiento, la administración de preventivos de LM a perros que contienen estadios en desarrollo de *D. immitis* que son mayores de 3,5 meses de edad y la administración de preventivos del gusano del corazón a perros microfilarémicos, conducen potencialmente al desarrollo de resistencia a LM en *D. immitis*. Es más probable que la resistencia se desarrolle en zonas de transmisión más intensa y, por tanto, de presión farmacológica más alta. De forma incuestionable, la profilaxis sigue siendo la mejor herramienta para controlar la infección por el gusano del corazón, siempre que los fármacos sean eficaces. Habiendo dicho esto, dados los anecdóticos informes de falta de respuesta a los preventivos LM del gusano del corazón, hay razón para creer que el caso descrito en el presente documento no es, probablemente, el único perro infectado por *D. immitis* resistente a LM. Por tanto, se necesita urgentemente una investigación sobre la prevalencia de resistencia a LM. A este respecto, el ensayo del genotipo descrito en el presente documento y en Bourguinat et al. puede ser útil. Puede

ser necesario desarrollar nuevas estrategias para controlar *D. immitis* resistente a LM. Una investigación debería indicar si este genotipo está confirmado a un foco específico o está más extendido; dicho conocimiento podría ser importante para guiar el desarrollo y uso de posibles estrategias de control alternativas.

Referencias

- 5 Ali MM, Mukhtar MM, Baraka OZ, Homeida MM, Kheir MM y Mackenzie CD (2002). Immunocompetence may be important in the effectiveness of Mectizan (ivermectin) in the treatment of human onchocerciasis. *Acta Trop.* 84: 49-53.
- Ardelli BF y Prichard RK (2004). Identification of variant ABC transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Annals Trop. Med. Parasitol.* 98: 371-384.
- 10 Ardelli BF, Guerriero SB y Prichard RK (2005). Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143: 58-66.
- Ardelli BF, Guerriero SB y Prichard RK (2006a). Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from *Onchocerca volvulus*: linkage disequilibrium and genotype diversity. *Parasitology* 132: 375-386.
- 15 Ardelli BF, Guerriero SB y Prichard RK (2006b). Characterization of a half-size ATP-binding cassette transporter gene which may be a useful marker for ivermectin selection in *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145: 94-100.
- Ardelli BF y Prichard RK (2007). Reduced genetic variation of an *Onchocerca volvulus* ABC transporter gene following treatment with ivermectin. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101: 1223-1232.
- 20 Atkins C. Canine Heartworm Disease: Current Treatment and Prevention Approaches. 26 Simposio anual de WALTHAM®Diets/OSU. Small Animal Cardiology 2002. [<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?&CID=WALTHAMOSU2002&PID=pr02984>]
- Awadzi K, Boakye DA, Edwards G, Opoku NO, Attah SK, Osei-Atweneboana MY, Lazdins-Helds JK, Ardrey AE, Addy ET, Quartey BT, Ahmed K, Boatın BA, Soumbey-Alley EW (2004a). An investigation of persistent microfilar-idermias despite multiple treatments with ivermectin, in two onchocerciasis-endemic foci in Ghana. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98: 231-49.
- 25 Awadzi K, Attah SK, Addy ET, Opoku NO, Quartey BT, Lazdins-Helds JK, Ahmed K, Boatın BA, Boakye DA, Edwards G (2004b). An investigation of persistent microfilar-idermias despite multiple treatments with ivermectin, in two onchocerciasis-endemic foci in Ghana. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98: 359-70.
- Bennett JL, Williams JF y Dave V, 1988. Pharmacology of ivermectin. *Parasitol. Today* 4: 226-228.
- 30 Blackhall WJ, Pouliot J-F, Prichard RK y Beech RN (1998a). *Haemonchus contortus*: Selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Exp. Parasitol.* 90: 42-48.
- Blackhall W, Liu HY, Xu M, Prichard RK y Beech RN (1998b). Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95: 193-201.
- 35 Blackhall WJ, Prichard RK y Beech RN (2003). Selection at a γ -aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131: 137-145.
- Boersema JH, Eysker M. y Nas JW. 2002. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet. Rec* 150: 279-281.
- 40 Bourguinat, C., Pion, S.D.S., Kamgno, J., Gardon, J., Duke, B.O.L., Boussinesq, M. y Prichard, R.K. (2007). Genetic selection of low fertile *Onchocerca volvulus* by ivermectin treatment. *PLoS Neg. Trop. Dis.* 1(1)e72: 12-22.
- Bourguinat, C., Ardelli, B.F., Pion, S.D.S., Kamgno, J., Gardon, J., Duke, B.O.L., Boussinesq, M., y Prichard, R.K. (2008). P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 158: 101-111.
- 45 Bourguinat C, Keller K, Blagburn B, et al. Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm preventatives and P-glycoprotein genotype. *Vet Parasitol* 2011 American Heartworm Society (en prensa) doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.024.
- Bourguinat C, Keller K, Prichard RK, et al. Genetic polymorphism in *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol.* 2011 American Heartworm Society (en prensa). doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.023. Bowman DD, et al., 1992. Effects of long-term administration of ivermectin and milbemycin oxime on circulating microfilariae and parasite

- antigenemia in dogs with patent heartworm infections. En: Soll MD (Ed.) Proceedings of the Heartworm Symposium '92. Amer. Heartworm Soc., Batavia, IL, pp. 151-158.
- 5 Bowman DD, Neumann NR, Rawlings C, et al. Effects of avermectins on microfilariae in dogs with existing and developing heartworm infections. En: R.L. Seward, eds. Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '01. American Heartworm Society, Batavia, IL 2001;173-178.
- Bowman DD, Torre CJ. The effects of preventative dosages of macrolide treatments on circulating microfilariae in dogs with patent heartworm-*Dirofilaria immitis*- infections. US Companion Animal Health 2006; 9-11.
- Churcher TS, Schwab AE, Prichard RK, et al. An analysis of genetic diversity and inbreeding in *Wuchereria bancrofti*: implications for the spread and detection of drug resistance. PLoS Neg Trop Dis 2008; 2: e211 (1-9).
- 10 Courtney CH, Zeng QT y Maler MM, 1998. The effect of chronic administration of milbemycin oxime and ivermectin on microfilaremias in heartworm-infected dogs. En: Seward RL (Ed.) Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98. Amer. Heartworm Soc., Batavia, IL, pp. 193-199.
- Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK y Avery L, (2000). The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 97: 2674-2679.
- 15 Eng JKL y Prichard RK (2005). A comparison of genetic polymorphism in populations of *Onchocerca volvulus* from untreated- and ivermectin-treated patients. Mol. Biochem. Parasitol. 142: 193-202.
- Eng JKL, Blackhall WJ, Osei-Atweneboana MY, Bourguinat C, Galazzo D, Beech RN, Unnasch TR, Awadzi K, Lubega GW y Prichard RK (2006). Ivermectin selection on β -tubulin: Evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol. 150: 229-235.
- 20 Feng X-P, Hayashi J, Beech RN y Prichard RK 2002. Study of the nematode putative GABA type A receptor subunits: Evidence for modulation by ivermectin. J. Neurochem. 83:870-878.
- Geary TG (2005). Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. Trends Parasitol. 21: 530-532.
- Hampshire VA (2005). Evaluation of efficacy of heartworm preventive products at the FDA. Vet. Parasitol. 133: 191-195.
- 25 Hearn FP y Peregrine AS (2003). Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. JAVMA 223: 482-5, 455.
- Kaplan RM (2004b). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol. 20: 477-481.
- 30 Le Jambre LF, Lenane IJ y Wardrop AJ (1999). A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*. Int. J. Pharm. 29: 1979-1985.
- Lespine A, Dupuy J, Alvinerie M, Comera C, Nagy T, Krajcsi P, Orlowski S. Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug transporters: the bases of the pharmacokinetics of lipid-like drugs. Curr Drug Metab. 2009 Mar; 10(3):272-88.
- 35 McManus EC, Pulliam JD. Histopathologic features of canine heartworm microfilarial infection after treatment with ivermectin. Am J Vet Res 1984; 45:91-97.
- McCall JW, Ryan WG, Roberts RE y Dzimianski MT, 1998. Heartworm adulticidal activity of prophylactic doses of ivermectin (6 mg/kg) plus pyrantel administered monthly to dogs. In: Seward RL (Ed.) Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98. Amer. Heartworm Soc., Batavia, IL, pp. 209-215.
- 40 McCall JW, 2005. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: A review, an update, and recommendations. Vet. Parasitol. 133: 197-206.
- Mottier, M.L. y Prichard, R.K. (2008). Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. Pharmacogenetics & Genomics, 18: 129-140.
- Njue AI, Hayashi J, Kinne L, Feng X-P y Prichard RK (2004). Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. J. Neurochem. 89: 1137-1147.
- 45 Osei-Atweneboana, M.Y., Eng, J.K.L., Boakye, D.A., Gyapong, J.O. y Prichard, R.K. (2007) Prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection and efficacy of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two phase epidemiological study. Lancet 369: 2021 – 2029.

- Sangster NC, Bannan SC, Weiss AS, Nulf SC, Klein RD y Geary TG (1999). Haemonchus contortus: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins. Exp. Parasitol. 91: 250-257.
- 5 Strote G, Bonow I, y Attah S (1996). The ultrastructure of the anterior end of male Onchocerca volvulus: papillae, amphids, nerve ring and first indication of an excretory system in the adult filarial worm. Parasitology 113:71-85.
- Trawford, A.F., Burden, F y Hodgkinson, J. (2005). Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkey herds at the Donkey Sanctuary, UK. Abstracts of the 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Christchurch, New Zealand. p196.
- 10 Venco L, McCall JW, Guerrero J, et al. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. Vet Parasitol 2004; 124:259-268.
- Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G y Sangster NC (2004). Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol. 20: 469-476.
- Xu M, Molento M, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R y Prichard R (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. Mol. Biochem. Parasitol. 91: 327-335.
- 15 Diagnosis, prevention and management of heartworm infection in dogs: Guidelines, canine heartworm disease. American Heartworm Society, revised January 2010. Sheldon B. Rubin; Charles Thomas Nelson; Doug Carithers; Wallace Graham; Lynn F. Buzhardt; Stephen Jones; Julie Levy; Dr. Robert Stannard; Carol Robertson-Plouch; Byron Blagburn; John W. McCall; y Dr. Jorge Guerrero. [http://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/canine-guidelines.html]
- 20 La mención de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior.
- 25 Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece entiende habitualmente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la capacidad de respuesta de un nematodo *Dirofilaria immitis* a una lactona macrocíclica, comprendiendo dicho procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1, en la que el genotipo GG en dichas posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N° 1 indica que es probable que el nematodo sea resistente a dicha lactona macrocíclica.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la lactona macrocíclica es ivermectina, selamectina, milbemicina oxima o moxidectina.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de ácido nucleico de la P-glicoproteína del nematodo posee una identidad de al menos 80 %, preferentemente una identidad de al menos 90 %, con la SEC ID N°: 1 sobre la totalidad de su longitud, o en el que la secuencia de ácido nucleico de la P-glicoproteína del nematodo es idéntica a la SEC ID N°: 1 sobre la totalidad de su longitud.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el genotipo del nematodo se determina mediante secuenciación del ADN, hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo, polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP), análisis por micromatriz o enfoques basados en PCR, RT-PCR o qRT-PCR; o el genotipo del nematodo se determina usando una sonda, tal como un oligonucleótido, un aptámero o un anticuerpo.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido es un cebador.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que posee una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente de al menos 90 % con la SEC ID N°: 1 sobre la totalidad de su longitud o que es idéntica con la SEC ID N°: 1 sobre la totalidad de su longitud, comprendiendo dicha secuencia el nucleótido guanina (G) en las posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N° 1.
7. Un kit de determinación de la capacidad de respuesta de un nematodo *Dirofilaria immitis* a una lactona macrocíclica, comprendiendo el kit:
una sonda capaz de determinar el genotipo del nematodo *Dirofilaria immitis* en las posiciones en un gen de la P-glicoproteína del nematodo correspondiente a las posiciones 11 y 618 de la SEC ID N°: 1.
8. El kit de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la lactona macrocíclica es ivermectina, selamectina, milbemicina oxima o moxidectina.
9. El kit de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la sonda es un oligonucleótido, un aptámero o un anticuerpo.
10. El kit de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el oligonucleótido es un cebador.
11. Un procedimiento de selección de un tratamiento para tratar a un animal infectado con un nematodo *Dirofilaria immitis*, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1, y seleccionar el tratamiento en base al genotipo de dicho nematodo en dichas posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho tratamiento seleccionado es una terapia basada en arsénico, dietilcarbamazina, antibióticos o una combinación de uno o más de los mismos, si el nematodo tiene el genotipo GG en dichas posiciones en el gen de la P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1.
13. Un procedimiento de selección de un profiláctico para prevenir la infección de un animal con un nematodo *Dirofilaria immitis*, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo de dicho nematodo en las posiciones en un gen de P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1, y seleccionar el profiláctico en base al genotipo de dicho nematodo en dichas posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho profiláctico seleccionado es dietilcarbamazina si el nematodo tiene el genotipo GG en dichas posiciones en el gen de la P-glicoproteína de dicho nematodo correspondientes a las posiciones 11 y 618 en la SEC ID N°: 1.

```

1      G
CGAATCCAA AGATATTATT GCTTGATGAA GCGACCAGTG CATTAGATGC GGAAAGTGAA AGAGTTAGCT TTTTAAATTT TAAATTTTAA ATCTCTTGGA
100
101
ACTATTGAAT GATTTTAAAT TCACTATTCT TTAGTCACG AAAAAATTAGT TGGTTTCAAA AAATTTCTATA ATTTTAAAAA GTCTTTGCGA GAGATTATTT
200
201
CATGTACAAT TTAATPATCTT CATGAAAAAT TAGGATTAAT ATTTGTTAGG ATAATCAGCT AAACCTGAATA TAACTTAGCA AATTTTTCAT ATCATTAGAA
300
301
ATAAGGAACA TGAGGTAAAA AAATATGTGA ATATTGCGAA TACTTTTGAA TTGCCCTTTT TCTTAGTAAT TCTCATTATC ATAGTTTCAT TTCAGACAGT
400
401
TCAACAAGCT TTGGACGTTG CAAGTAGCGG TCGAACATGT ATTACAGTTG CACATAGACT ATCATCCATT CAGTTTGCAG ATCAGATATT TTTTGTAGAA
500
501
AATGGAAAAG TAGTTGAGCA GGGAACACAT CAAGAGCTCA TTGAATTGGA CGGGAAGTAC GCTGATTTAA CTCGCAAAACA AGATTTGAGG TCATAAATGG
600
601      G      623
TCAGAAATGA AGATAATATG GTA

```

Posición 11 nucleótido A= aminoácido K (lisina)

Posición 11 nucleótido G= aminoácido R (arginina)

Figura 1

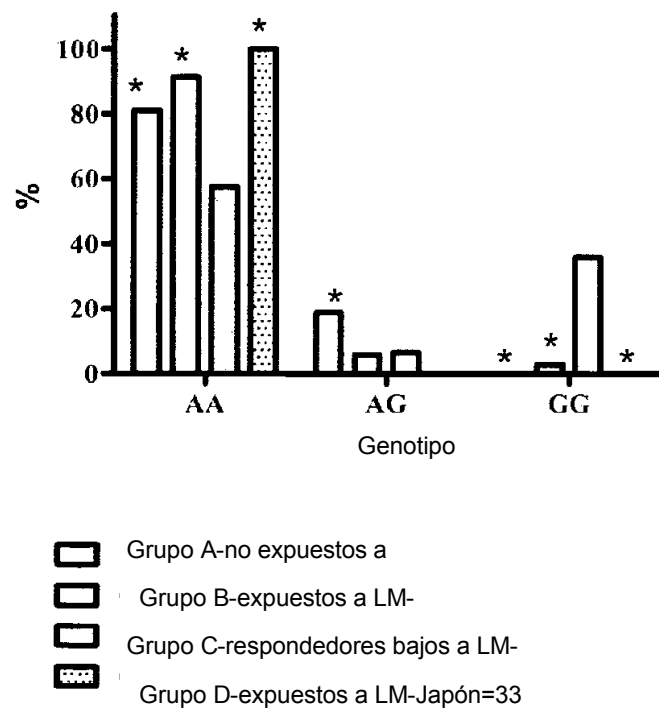


Figura 2

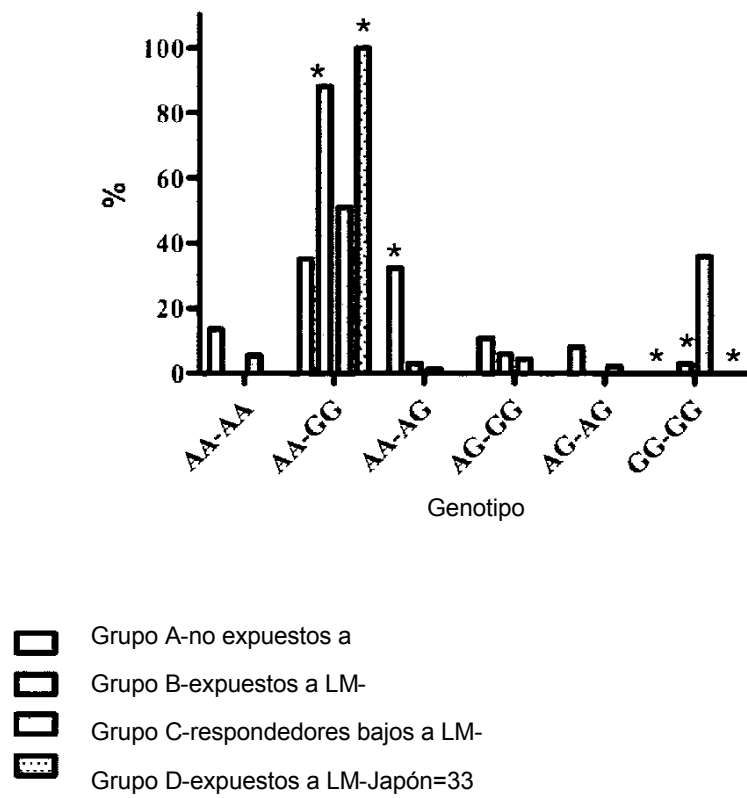


Figura 3

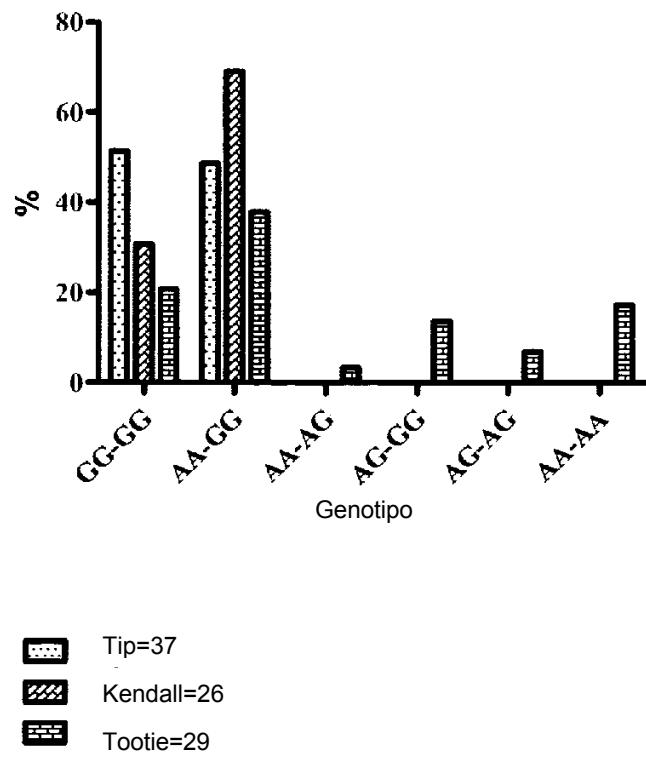


Figura 4

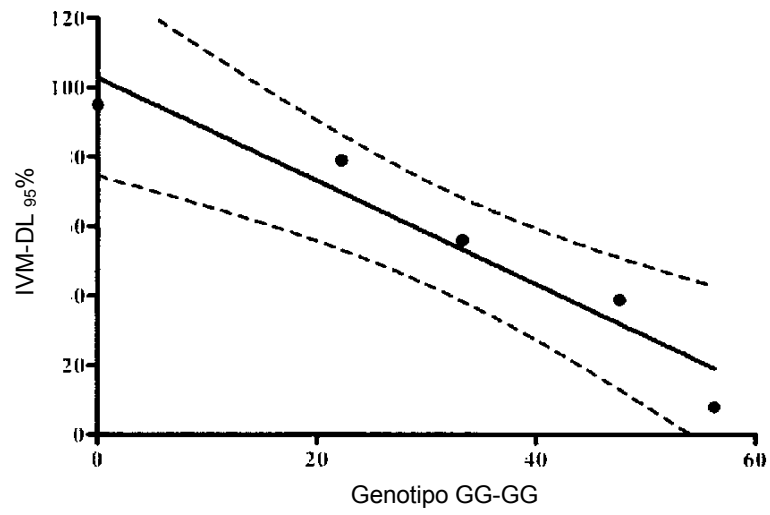


Figura 5

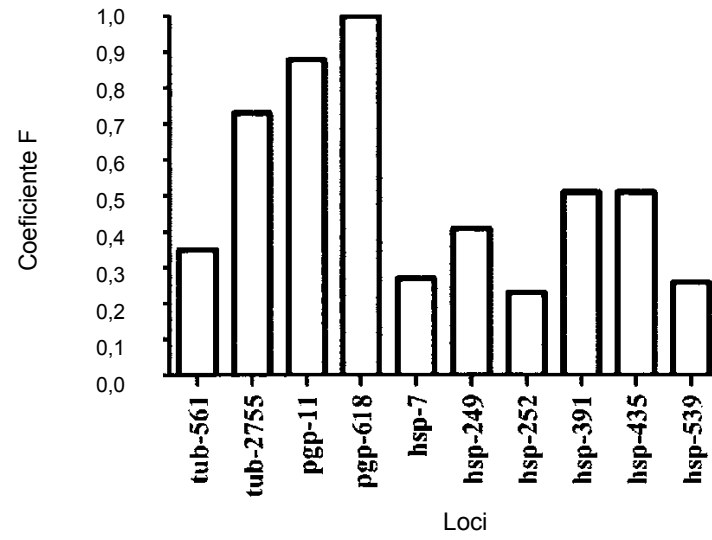


Figura 6