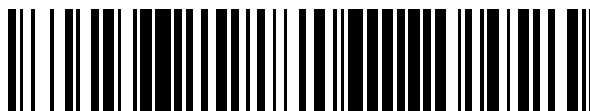


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 187**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2014** **PCT/US2014/044000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO14210097**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2014** **E 14742404 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 3013977**

54 Título: **Marcadores para predecir la resistencia a fármacos de lactona macrocíclica de la Dirofilaria immitis, el agente causal de la enfermedad del gusano del corazón**

30 Prioridad:

26.06.2013 US 201361839545 P

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

15.04.2019

73 Titular/es:

ELANCO US INC. (50.0%)
2500 Innovation Way
Greenfield, IN 46140, US y
MCGILL UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

PRICHARD, ROGER;
BOURGUINAT, CATHERINE y
GEARY, TIMOTHY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 709 187 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

Marcadores para predecir la resistencia a fármacos de lactona macrocíclica de la *Dirofilaria immitis*, el agente causal de la enfermedad del gusano del corazón

Campo

- 5 Se desvelan aspectos genéticos relacionados con la resistencia a endectocidas de lactona macrocíclica (LM) en parásitos nematodos (por ejemplo, *Dirofilaria immitis*). Se desvelan polimorfismos de único nucleótido dentro del genoma de *D. immitis* que, individualmente o en combinación, se correlacionan con un grado de respuesta reducido de los parásitos a las LM. Además, se desvelan procedimientos para la detección de estos parásitos, procedimientos para el tratamiento de estos parásitos y kits para la determinación del grado de respuesta de estos parásitos a las LM.

Antecedentes

La dirofilariosis es una parasitosis de animales y ocasionalmente de humanos, que puede ser el resultado de la infestación por una especie de *Dirofilaria* tal como *D. immitis*, *D. repens*, *D. tenuis*, *D. ursi*, *D. subdermata*, *D. lutrae*, *D. striata* y *D. spectans*.

- 15 *Dirofilaria immitis* (gusano del corazón) es un nematodo parásito que habitualmente infesta perros, zorros, lobos, coyotes y gatos. Los gusanos del corazón pueden provocar lesiones vasculares graves y pueden ser mortales, especialmente en animales altamente activos.

- El ciclo de vida de *D. immitis* es muy conocido (revisado en McCall y col., Adv. Parasitol. 66:193-285, 2008). En resumen, un mosquito puede infestarse cuando extrae sangre de un hospedador infectado (por ejemplo, un perro). En el mosquito, las microfilarias (mf) se desarrollan a la fase larvaria infecciosa. Cuando el mosquito infestado se alimenta, puede transmitir larvas a un nuevo hospedador (por ejemplo, otro perro). En el nuevo hospedador, las larvas continúan madurando entre ocho y diez semanas, después de lo cual se mueven al lado derecho de los pulmones y la arteria pulmonar, donde se convierten en adultos. Los gusanos adultos se aparean y las hembras producen huevos, los cuales se desarrollan en el útero para dar embriones largos y finos (microfilarias) que se liberan en el torrente sanguíneo. Un mosquito que tome el mf en circulación cuando extrae sangre del hospedador infestado comienza el ciclo de nuevo.

D. immitis puede encontrarse dondequiera se encuentre su vector, el mosquito. En general, *D. immitis* se puede encontrar en todo el mundo, pero es muy común en zonas con climas templados y cálidos.

- Las lactonas macrocíclicas (LM) a menudo se prescriben como opción terapéutica o profilaxis en el tratamiento de *D. immitis* en aplicaciones veterinarias. Los ejemplos LM incluyen ivermectina (IVM), milbemicina oxima (MO), moxidectina (MOX) y selamectina (SLM). Sin embargo, la resistencia a las LM es común en una diversidad de nematodos parásitos y parece estar desarrollándose en *D. immitis*. Se han descrito varias pruebas para la detección de la resistencia a antihelmínticos en nematodos de ganado y de caballos, que incluyen, la prueba de reducción del recuento de huevos en materia fecal, la prueba de eclosión de huevos, la prueba de desarrollo de larvas en microagar y pruebas moleculares basadas en la resistencia a benzimidazol (revisado en Coles y col., Veterinary Parasitology 136:167-185, 2006). Prichard y col. (Patente europea EP 0979278) describe una secuencia de glucoproteína P en *Haemonchus contortus* que puede ser útil para el diagnóstico de la resistencia a LM en nematodos parásitos. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de procedimientos para detectar *D. immitis* (gusanos del corazón) que sean resistentes a una LM.

Sumario

Se han descubierto variaciones genéticas (por ejemplo, SNP) en los genomas de nematodos de *Dirofilaria* spp. que se relacionan con un grado de respuesta reducido de los nematodos a las lactonas macrocíclicas. En un ejemplo, el nematodo es *Dirofilaria immitis* (el agente causal del gusano del corazón en los animales). En un ejemplo, las lactonas macrocíclicas son ivermectina, selamectina, milbemicina oxima o moxidectina.

- 45 Se desvelan procedimientos para determinar el grado de respuesta de un nematodo de *Dirofilaria* spp. a una lactona macrocíclica. En un ejemplo, el procedimiento implica determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico que incluye una o más de las SEQ ID NO: 1-127 del nematodo. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico posee al menos el 80 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico posee al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos de una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos de una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos y que posee al menos el 95 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para determinar el grado de respuesta de un nematodo de

Dirofilaria spp. a una lactona, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos que posee al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118 e incluye el sitio polimórfico.

- 5 En una realización del procedimiento, la presencia de un nucleótido alternativo en el sitio polimórfico en las moléculas de ácido nucleico indica que es probable que el nematodo sea resistente a la lactona macrocíclica. En una realización, el procedimiento puede incluir aislar la molécula de ácido nucleico del nematodo y, opcionalmente, purificar los ácidos nucleicos antes de determinar el genotipo del nematodo. En una realización del procedimiento, el genotipo del nematodo se determina por secuenciación de ADN, procedimientos basados en hibridación que incluyen oligonucleótidos específicos de alelo, análisis de micromatriz, procedimientos basados en enzimas, polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), fusión de alta resolución (HRM, forma sigla de *high resolution melt*) o estrategias basadas en PCR, RT-PCR o qRT-PCR.

- 15 Se desvelan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico posee al menos el 80 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico posee al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos de una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos de una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos y que posee al menos el 95 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico.

- 25 Se desvelan kits para determinar el grado de respuesta de un nematodo de *Dirofilaria* spp. a una lactona macrocíclica. En un ejemplo, el kit contiene una sonda que tiene la capacidad de determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico de una o más de las SEQ ID NO: 1-127. La sonda puede ser un oligonucleótido, un cebador o un aptámero. Utilizando el kit, se puede determinar el genotipo del nematodo, por ejemplo, por secuenciación de ADN, procedimientos basados en hibridación que incluyen el uso de oligonucleótidos específicos de alelo, análisis de micromatriz, procedimientos basados en enzimas, polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), fusión de alta resolución (HRM) o estrategias basadas en PCR, RT-PCR o qRT-PCR.

- 30 Se desvelan procedimientos para seleccionar un tratamiento para tratar un animal infestado con un nematodo de *Dirofilaria* spp. En un ejemplo, el procedimiento implica determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico que incluye una o más de las SEQ ID NO: 1-127 y seleccionar el tratamiento basándose en el genotipo del nematodo. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico posee al menos el 80 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico posee al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos de una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos de una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos y que posee al menos el 95 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1-127 e incluye el sitio polimórfico.

- 45 En un ejemplo, el procedimiento implica tratar al animal con uno o más agentes alternativos cuando se encuentra un nucleótido alternativo en el sitio polimórfico. Los agentes alternativos pueden incluir uno o más de una terapia basada en arsénico, dietilcarbamazina y antibióticos. En un ejemplo, el procedimiento puede incluir aislar la molécula de ácido nucleico del nematodo y, opcionalmente, purificar los ácidos nucleicos antes de determinar el genotipo del nematodo. En un ejemplo del procedimiento, el genotipo del nematodo se determina por secuenciación de ADN, procedimientos basados en hibridación que incluyen oligonucleótidos específicos de alelo, análisis de micromatriz, procedimientos basados en enzimas, polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), fusión de alta resolución (HRM) o estrategias basadas en PCR, RT-PCR o qRT-PCR.

50 **Breve descripción de los dibujos**

- La **Figura 1** ilustra las frecuencias de genotipo para el SNP dentro de cada uno de los marcadores indicados, para aislados susceptibles y con PDE. Los gráficos son representativos de los marcadores que también se designan como las SEQ ID NO: 1-109 dentro de la solicitud. Para los marcadores designados con un asterisco (*), el genotipo indicado muestra el análisis de la complementaria inversa de las secuencias mostradas como las SEQ ID NO: 1-109 dentro de la solicitud.

Descripción detallada

Definiciones

En el presente documento, "lactonas macrocíclicas" o "las LM" significa productos, o derivados químicos de los

5 mismos, de microorganismos del suelo que pertenecen al género *Streptomyces* incluyendo, pero sin limitación, avermectinas y milbemicinas. Estas moléculas se utilizan para tratar especies de endo- y ectoparásitos en una amplia diversidad de hospedadores. Las avermectinas en uso incluyen, sin limitación, ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina y selamectina. Las milbemicinas disponibles incluyen, sin limitación, milbemicina oxima y moxidectina. Las lactonas macrocíclicas tienen un potente y amplio espectro antiparasitario a bajos niveles de dosis. Son activos frente a muchos nematodos inmaduros (incluyendo larvas hipobióticas) y artrópodos. Una única dosis terapéutica puede persistir en concentraciones suficientes para ser eficaz frente a infestaciones por nematodos durante periodos prolongados después del tratamiento.

10 Se desarrollaron tratamientos preventivos para el gusano del corazón con lactona macrocíclica (LM) para el tratamiento de perros y gatos, que todavía no estaban infestados, para prevenir el establecimiento de infestaciones en adultos teniendo como objetivo las fases del desarrollo L3/L4. Las lactonas macrocíclicas también tienen efectos en el estadio de microfilaria (L1). Los endectocidas de lactona macrocíclica tales como ivermectina (IVM), milbemicina oxima (MO), moxidectina (MOX) y selamectina (SLM) se utilizan durante la temporada de transmisión para la quimioprofilaxis del gusano del corazón en perros y gatos.

15 En el presente documento, "grado de respuesta" significa que un nematodo responde después de la exposición a una lactona macrocíclica (LM). En realizaciones de la invención, un nematodo puede responder siendo sensible o resistente a una LM. Sensibilidad a una LM significa que la lactona macrocíclica afecta negativamente al nematodo *D. immitis* expuesto. Por ejemplo, una LM puede ser mortal o casi mortal para el nematodo *D. immitis*, acortar su vida o inhibir su capacidad para reproducirse. La resistencia es la reducción en la eficacia de un fármaco, en el presente documento las LM, para curar una enfermedad o mejorar los síntomas (por ejemplo, la erradicación de los gusanos del corazón de un perro). Un nematodo *D. immitis* puede ser resistente a una LM si el fármaco destinado a neutralizarlo es ineficaz, menos eficaz o tiene una eficacia reducida. Un nematodo *D. immitis* también puede ser resistente a una LM si el fármaco, a una dosis específica destinada a neutralizarlo, tiene un efecto reducido. En realizaciones de la invención, el grado de respuesta de un nematodo a una lactona macrocíclica se puede determinar *in vivo* o *in vitro*.

30 En el presente documento, "pérdida de eficacia" o "PDE" significa que hay al menos una disminución percibida en el grado de respuesta de los nematodos a las LM. La disminución percibida en el grado de respuesta puede ser percibida o puede ser real. En un ejemplo, la disminución en el grado de respuesta de los nematodos a las LM puede ser real, en cuyo caso se puede decir que los nematodos son resistentes a las LM. En otro ejemplo, la disminución en el grado de respuesta de los nematodos a las LM puede ser percibida y no real. Por ejemplo, en el caso en que un perro infestado con gusanos del corazón se trate con las LM, con el fin de eliminar el gusano del corazón del perro, el dueño del perro puede no cumplir con la administración apropiada de las LM al perro. En ese caso, la infestación con el gusano del corazón podría no eliminarse del perro debido a que, por ejemplo, no se administraron dosis suficientes de las LM. El dueño del perro, u otro observador, puede creer erróneamente que las LM se administraron de manera adecuada al perro (por ejemplo, el dueño cree que le administró las LM como se le indicó, pero, en realidad, se omitieron administraciones, se administraron dosificaciones inadecuadas, etc.) y, debido a que los gusanos del corazón no fueron eliminados del perro, los parásitos de gusano del corazón son resistentes a las LM. En al menos algunos de estos casos, los gusanos del corazón no se eliminan del perro debido a la falta de cumplimiento del tratamiento. En estos casos, la presencia continua del gusano del corazón puede no deberse a la resistencia a la LM de los organismos del gusano del corazón (es decir, la disminución en el grado de respuesta de los parásitos del gusano del corazón es percibida y no es real). En los casos de PDE, generalmente no hay confirmación de que la infestación con el gusano del corazón sea realmente resistente a las LM.

45 En el presente documento, "resistente" o "resistencia confirmada" generalmente significa que se demostró que los organismos del gusano del corazón tienen al menos un grado de respuesta reducido a las LM. En un ejemplo, los perros infestados con gusanos del corazón se tratan con las LM, utilizando un régimen que se sabe que normalmente libra a los perros de la infestación por gusanos del corazón (es decir, no se cuestiona el cumplimiento del tratamiento con LM), pero el tratamiento no libra al perro de los organismos del gusano del corazón. Dichos organismos del gusano del corazón, que normalmente serían eliminados de los perros por cumplir el tratamiento, no se eliminan debido a su reducido grado de respuesta a la LM. Se dice que tales organismos del gusano del corazón son resistentes a las LM.

55 En un ejemplo, se puede decir que un nematodo *D. immitis* es resistente a una LM 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 murieron después de la exposición a una dosis o concentración DL₉₅ (una dosis o concentración letal de un fármaco que debería haber destruido al 95 % de los nematodos de *D. immitis*) de una lactona macrocíclica.

En otra realización, se puede decir que un nematodo *D. immitis* es sensible a una lactona macrocíclica si a los sumo aproximadamente el 5 %, a lo sumo aproximadamente el 4 %, a lo sumo aproximadamente el 3 %, a lo sumo aproximadamente el 2 %, a lo sumo aproximadamente el 1 % o si el 0 % de los nematodos sobrevivieron después de la exposición a una dosis o concentración DL₉₅ (una dosis o concentración letal de un fármaco que debería haber destruido al 95 % de los nematodos de *D. immitis*) de una lactona macrocíclica.

En el presente documento, "ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" o "molécula de ácido nucleico" puede referirse a un polímero de ADN y/o ARN que puede ser monocatenario o bicatenario y que contiene, opcionalmente, bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o modificadas que tienen la capacidad de incorporarse en polímeros de ADN o ARN. Los "ácidos nucleicos", "secuencias de ácido nucleico" o "moléculas de ácido nucleico" puede abarcar genes, ADNc, ADN (por ejemplo, ADN genómico) y ARN codificado por un gen. Los ácidos nucleicos o secuencias de ácido nucleico pueden comprender al menos 3, al menos 10, al menos 100, al menos 1000, al menos 5000 o al menos 10000 nucleótidos o pares de bases.

Los "ácidos nucleicos", "secuencias de ácido nucleico" o "moléculas de ácido nucleico" pueden modificarse por cualquier medio químico y/o biológico conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la reacción con cualquier producto químico conocido tales como agentes alquilantes, azúcares de oscurecimiento, etc.; conjugación a un grupo enlazador (por ejemplo PEG); metilación; oxidación; radiación ionizante; o la acción de carcinógenos químicos. Dichas modificaciones de ácido nucleico pueden producirse durante la síntesis o el procesamiento, o después del tratamiento con reactivos químicos conocidos en la técnica.

En el presente documento, una "molécula de ácido nucleico aislada" puede referirse a una molécula de ácido nucleico que no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia polinucleotídica más grande; y/o puede estar sustancialmente exenta de otras moléculas de ácido nucleico u otros contaminantes que se encuentran en su entorno 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.

En el presente documento, el término "identidad" o "idéntico" se refiere a la similitud de secuencia entre dos o más moléculas de polinucleótido, en una posición dentro de las moléculas, o en más de una posición dentro de las moléculas. La identidad se puede determinar comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de identidad entre las secuencias de ácido nucleico es una función del número de ácidos nucleicos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias, por ejemplo, a lo largo de una región específica. El alineamiento óptimo de las secuencias para las comparaciones de identidad se puede realizar utilizando una diversidad de algoritmos, como se conoce en la técnica. En un ejemplo, la identidad de secuencia se puede determinar utilizando el algoritmo muy conocido BLAST, disponible de forma pública (por ejemplo, BLASTn y BLASTp). En otra realización, el experto en la materia puede alinear fácil y adecuadamente cualquier secuencia dada y deducir la identidad/homología de secuencia mediante una simple inspección visual.

En el presente documento, "polimorfismos de único nucleótido" o "los SNP" se refiere a variaciones genéticas (o de no identidad) en ubicaciones específicas en un genoma (es decir, un sitio polimórfico). En general, en una posición específica en un genoma, la identidad de un nucleótido puede ser invariante o constante. En algunas posiciones en un genoma, sin embargo, la identidad de un nucleótido puede no ser invariante. En tales posiciones, puede haber un nucleótido presente en la posición en una frecuencia relativamente más alta que otros nucleótidos, cuando se analizan los genomas de distintos individuos dentro de una población. El nucleótido más comúnmente encontrado en tal posición puede denominarse el nucleótido de tipo silvestre en esta posición. Sin embargo, puede haber uno o más otros nucleótidos encontrados en esta posición en frecuencias relativamente más bajas. Estos nucleótidos pueden denominarse nucleótidos alternativos. Las frecuencias en las que se encuentran los nucleótidos alternativos pueden variar. En un ejemplo, los SNP descritos en el presente documento pueden desempeñar un papel en el grado de respuesta de los nematodos a las LM. En un ejemplo, los SNP pueden identificar o etiquetar una región de un genoma que puede desempeñar un papel en el grado de respuesta de los nematodos a las LM (es decir, el SNP en sí no está directamente implicado en el grado de respuesta a las LM alterado, pero puede estar genéticamente vinculado a cambios genéticos que están implicados en el grado de respuesta alterado). En un ejemplo, la presencia de uno o más de los SNP desvelados puede indicar que el parásito cuyo genoma contiene el uno o más de los SNP es menos sensible a las LM, en comparación con los parásitos que no tienen los SNP.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio polimórfico" puede referirse a una región/ubicación específica en un ácido nucleico en la cual se observan dos o más secuencias de nucleótidos alternativas en un número significativo de muestras de ácido nucleico de una población de individuos. Un sitio polimórfico que es de un nucleótido de longitud se puede denominar en el presente documento un "polimorfismo de único nucleótido" o un

"SNP".

En el presente documento, "marcador" o "marcadores" generalmente se refiere a secuencias de ácido nucleico que pueden contener uno o más de los SNP. Estas secuencias de ácido nucleico pueden ser de distintas longitudes.

En el presente documento, "genotipo" se refiere a la constitución genética de una célula, un organismo o un individuo (es decir, la composición alélica específica del individuo), habitualmente con referencia a un personaje específico en consideración. En el contexto de la presente solicitud, genotipo generalmente se refiere a la identidad de los nucleótidos en posiciones de los SNP. En un ejemplo, un genotipo GG puede significar que en una posición específica de un gen (por ejemplo, un sitio polimórfico) 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 pueden o no dar como resultado de forma directa distintos rasgos fenotípicos, pero que en general, dentro del contexto de la presente solicitud, se correlacionan con un grado de respuesta disminuido de los parásitos a las LM. En cualquier organismo diploide particular, con dos copias de cada cromosoma, el genotipo de cada gen comprende la pareja de alelos presentes en ese locus, que son iguales en homocigotos y distintos en los heterocigotos.

Los enfoques adecuados para su uso en la determinación del genotipo son conocidos en la técnica y pueden incluir, sin limitación, PCR, RT PCR, qRT PCR, SSCP e hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo. Otros enfoques pueden incluir la hibridación de ácidos nucleicos a micromatrices de ADN o perlas, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, forma siglada de *restriction fragment length polymorphism*), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales (t-RFLP, forma siglada de *terminal restriction fragment length polymorphism*), el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, forma siglada de *amplified fragment length polymorphism*) y amplificación de sonda dependiente de la ligamiento múltiple (MLPA, forma siglada de *multiplex ligation-dependent probe amplification*).

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, incluso dentro de la secuencia o en uno o ambos extremos de la secuencia, pero que las bases nucleotídicas adicionales no afectan materialmente la función de la secuencia del ácido nucleico.

Genomas y los SNP

En un aspecto, la divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que poseen al menos el 80 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1-127, a lo largo de toda su longitud, y que comprenden los nucleótidos alternativos en la ubicación del SNP (es decir, el sitio polimórfico), indicándose los nucleótidos alternativos mediante el nucleótido subrayado en las SEQ ID NO: 1-127, como se desvela en la presente divulgación. Los nucleótidos alternativos generalmente tienen una menor frecuencia de aparición en las posiciones indicadas dentro de las secuencias, como se muestra en la Figura 1 y en la Tabla 1. En una realización de la divulgación, el genoma de un parásito nematodo, o de una población de parásitos, puede contener uno o más de los nucleótidos alternativos en los sitios polimórficos mostrados en las SEQ ID NO: 1-127. La presencia de estos nucleótidos alternativos generalmente se correlaciona con una sensibilidad reducida de los parásitos a las LM, en comparación con parásitos que no contienen los nucleótidos alternativos. Con más detalle, la invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de respuesta de un nematodo de *Dirofilaria* spp. a una lactona macrocíclica, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos que posee al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118 e incluye el sitio polimórfico.

Además se desvelan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden, consisten en o consisten esencialmente en la secuencia representada en las SEQ ID NO: 1-127.

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede comprender una secuencia que corresponde a la de las SEQ ID NO: 1-127 a lo largo de su longitud, y que contiene el nucleótido alternativo en el sitio de SNP (es decir, el sitio polimórfico). En realizaciones de la divulgación, la secuencia de ácido nucleico puede ser al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 % o 100 % idéntica a las SEQ ID NO: 1-127, pero se aisló de un nematodo que tiene el nucleótido alternativo en la posición en cada secuencia, mostrada mediante el nucleótido subrayado como se desvela en la presente solicitud.

En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede comprender una parte o fragmento de, las SEQ ID NO: 1-127 que también contiene el sitio polimórfico y el nucleótido alternativo en el sitio polimórfico. En diversos Ejemplos, el fragmento de las SEQ ID NO: 1-127 pueden tener 5, 20, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 o más nucleótidos de longitud.

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede obtenerse de un nematodo *D. immitis* que contiene una o más de las SEQ ID NO: 1-127 como se desvela en la presente solicitud. Como se usa en el presente documento, "obtenido de" puede referirse a una molécula de ácido nucleico que se aisló de una fuente natural, por ejemplo, un nematodo de *Dirofilaria immitis*. Además puede referirse a una molécula de ácido nucleico hecha por el hombre, por ejemplo, de forma recombinante o sintetizada basándose en una molécula de ácido nucleico aislada de un nematodo *D. immitis*.

Detección de los SNP

Los SNP pueden detectarse mediante cualquier procedimiento que pueda determinar la identidad de un nucleótido en una posición específica en un genoma (por ejemplo, un sitio polimórfico) y que permita la comparación de las identidades de los nucleótidos en la posición específica del genoma entre individuos o poblaciones de individuos. Las diferencias en las identidades de los nucleótidos en una posición específica pueden ser indicativas de un SNP.

Para detectar los SNP se puede usar una diversidad de procedimientos. En un ejemplo, pueden usarse procedimientos basados en hibridación. Los procedimientos basados en hibridación generalmente se basan en la hibridación de sondas de ADN complementarias al sitio que contiene el SNP. En un procedimiento, la hibridación dinámica específica de alelos (DASH, forma siglada de *dynamic allele-specific hybridization*) se basa en diferencias en las temperaturas de fusión que son el resultado del emparejamiento de bases no coincidente. Mediante el diseño de sondas que hibridan de forma diferencial basándose en cambios de nucleótidos en los genomas diana, se pueden detectar los SNP.

En un ejemplo de un procedimiento basado en hibridación, pueden usarse balizas moleculares. Las balizas moleculares son sondas nucleotídicas monocatenarias, con un fluorocromo en un extremo y una molécula de inactivación de fluorocromo en el otro extremo, que puede formar una estructura de tallo-bucle y colocar el fluorocromo y la molécula de inactivación próximos entre sí. En ausencia de hibridación de una baliza molecular con una región del genoma, el fluorocromo se inactivará, debido a su proximidad cercana a la molécula de extinción. Cuando la baliza molecular hibrida con una región del genoma, en general, el fluorocromo no formará una estructura de tallo-bucle. En estas condiciones, el fluorocromo emitirá fluorescencia, debido a la distancia al fluorocromo aumentada de la molécula de inactivación.

En un ejemplo de un procedimiento basado en hibridación, se utilizan para la hibridación con los SNP micromatrices de oligonucleótidos, que son matrices de alta densidad que contienen cientos de miles de sondas. Comparando la hibridación diferencial con sondas redundantes, es posible detectar los SNP.

En un ejemplo de detección de los SNP, pueden usarse procedimientos basados en enzimas. En un ejemplo de un procedimiento basado en enzimas para la detección de los SNP, se utilizan endonucleasas de restricción para digerir un ADN genómico. Determinando las longitudes de los fragmentos que son el resultado de la digestión, se puede determinar si la endonucleasa no logra escindir determinados sitios dentro de un genoma debido a un cambio de nucleótido (por ejemplo, un nucleótido alternativo) en la secuencia reconocida por la endonucleasa.

En un ejemplo de un procedimiento basado en enzimas para la detección de los SNP, se utilizan procedimientos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En un ejemplo de esto, se diseñan dos parejas de cebadores de forma que solo uno de ellos funcione en la amplificación de un sitio que contiene un SNP, dependiendo de si el SNP está presente. Los tamaños de los productos amplificados son distinguibles, informando, por lo tanto, qué pareja de cebadores funciona y si el SNP está presente.

En un ejemplo de un procedimiento basado en enzimas para la detección de los SNP, se diseñan sondas nucleotídicas para hibridar con un sitio genómico y producir una falta de coincidencia, ya sea esté presente o no un SNP en el sitio genómico específico. Se utiliza una endonucleasa (por ejemplo, endonucleasa Flap) que escinde una de las sondas, dependiendo de si existe una falta de coincidencia. Usando fluorocromos y moléculas de inactivación, unidos a una o más de las sondas, se pueden detectar los SNP.

En un ejemplo de un procedimiento basado en enzimas para la detección de los SNP, se utiliza extensión de cebadores. En este procedimiento, los cebadores hibridan con el ADN genómico inmediatamente corriente arriba del SNP. Después, se usa ADN polimerasa para extender el cebador en una reacción de minisequenciación. La reacción de secuenciación determina la presencia de un SNP.

En un ejemplo de un procedimiento basado en enzimas para la detección de los SNP, se usa la actividad 5'-nucleasa de la ADN polimerasa Taq. Se realiza un ensayo TaqMan de forma simultánea con una reacción de PCR. El procedimiento se configura de modo que la reacción de PCR se extienda a través de un sitio que contiene un SNP y libere un fluorocromo de una sonda que hibrida con la región de SNP, dependiendo de si la sonda contiene una falta de coincidencia debido a la presencia del SNP.

En un ejemplo de un procedimiento basado en enzimas para la detección de los SNP, se usa la ADN ligasa para ligar dos sondas, una que hibrida con un sitio de SNP en un genoma, dependiendo de si el SNP está presente, y una segunda sonda que hibrida adyacente al sitio de SNP. Si ambas sondas hibridan con el genoma sin faltas de coincidencia, la ligasa conectará las dos sondas, lo cual se puede medir.

Existen otros procedimientos de detección de los SNP, que incluyen, por ejemplo, detección de polimorfismos de conformación monocatenaria, electroforesis en gel con gradiente de temperatura para detectar faltas de coincidencia en la estructura secundaria debidas a los SNP, cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento para detectar estructuras secundarias con falta de coincidencia, análisis de fusión de alta resolución, uso de proteínas de unión a faltas de coincidencia y otros.

En un ejemplo de detección de los SNP, se puede obtener de un sujeto una muestra biológica que comprenda un nematodo *D. immitis*. El sujeto puede ser, sin limitación, un perro, zorro, lobo, coyote y gato. En el contexto de la invención, una muestra biológica puede ser cualquier muestra (por ejemplo, líquido corporal, excremento, órgano, tejido, etc.) procedente de un sujeto. La muestra biológica puede ser de un sujeto que se sabe que tiene, o se sospecha que tiene, una infestación por nematodos de *D. immitis*. El nematodo *D. immitis* puede aislarse de la muestra biológica con procedimientos y técnicas de separación convencionales.

Una muestra de ácido nucleico puede aislarse u obtenerse de un nematodo *D. immitis* antes de su uso. Los procedimientos para aislar ácidos nucleicos de organismos y tejidos son conocidos. Dichos procedimientos pueden incluir, pero sin limitación, extracción convencional de ADN, con digestión con proteinasa K seguida de extracción con fenol cloroformo, extracción con hidróxido de sodio y rotura física, seguido de purificación, por ejemplo, por centrifugación con cloruro de cesio o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); o el uso de kits comerciales. Un experto apreciaría que pueden usarse distintas estrategias para aislar una muestra de ácido nucleico de un nematodo *D. immitis* adulto en comparación con una microfilaria. En una realización de la invención, la muestra de ácido nucleico comprende ADN genómico.

Las secuencias de ácido nucleico de los ácidos nucleicos del parásito se pueden determinar usando uno cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. En algunas técnicas, utilizando procedimientos basados en ordenador, las secuencias de partes separadas del genoma se ensamblan en representaciones del genoma lineal completo del parásito. En un ejemplo, se puede utilizar secuenciación masiva paralela. La secuenciación masiva paralela (también denominada "secuenciación de última generación") puede abarcar diversos procedimientos de secuenciación de ADN de alto rendimiento. Uno de estos procedimientos es el sistema HiSeq2000 de Illumina®.

A través de la comparación de secuencias de distintos parásitos o poblaciones de parásitos (por ejemplo, comparación de un genoma consenso o de referencia obtenido de parásitos sensibles a las LM con un genoma consenso o de referencia obtenido de parásitos resistentes a las LM), se pueden identificar los presuntos SNP.

Los presuntos SNP pueden analizarse adicionalmente. En un ejemplo, se utilizó análisis de SNP de alto rendimiento utilizando PCR combinada y espectrometría de masas MALDI-TOF (análisis Sequenom®). En general, este sistema utiliza la extensión de un cebador oligonucleotídico o una sonda utilizando nucleótidos de terminación de cadena para producir productos de PCR de distintos tamaños para cada alelo de un SNP. Los productos de PCR de distintos tamaños se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

SNP desvelados

En un ejemplo, los marcadores genéticos de *D. immitis* incluyen las siguientes secuencias (las SEQ ID NO: 1-109), donde los nucleótidos subrayados (es decir, los sitios polimórficos) indican la posición del nucleótido dentro del fragmento que se correlaciona con la resistencia a las LM (es decir, el nucleótido alternativo). En estas secuencias, el nucleótido en la posición subrayada es generalmente distinto del nucleótido encontrado en esta posición en organismos que no son resistentes a las LM (tipo silvestre). En las siguientes secuencias, el nucleótido subrayado en la secuencia indicada es el nucleótido alternativo que se correlaciona con la resistencia a las LM. En el encabezado de cada secuencia, se muestra el cambio de nucleótido del nucleótido de tipo silvestre al nucleótido alternativo (el alternativo correlaciona con la resistencia a la LM) en el sitio polimórfico (por ejemplo, C en el tipo silvestre y A en la secuencia alternativa se designa como C→A). Las frecuencias de genotipo para cada SNP en los sitios polimórficos se muestran en la **Figura 1**. En la **Figura 1**, para los marcadores designados con un asterisco (*), el gráfico presenta los genotipos de la secuencia complementaria inversa, en comparación con la secuencia de nucleótidos presentada en las SEQ ID NO: 1-109.

MARCADOR 617 (SEQ ID NO: 1); C→A

AACATAAACATATTGAACTGAATCCTGCAAACAGTTCTCTTATAACGTGAACCATAACT
AAATTTAGAGAAAATATGAAAAAGAAAAATAAGTTGCTTTTGCTCGTGACCAACTCTA
ATACCCAGGAAATCAAGAAGTGATAATGAGTAATGTCATCATTAGATTTCAGTAATTGG
TGACACTATCAATATTATTATTATACTTAAAAATACGACGACCACTTATCGTAACTT
AAAGCATGCATAATACGACTGTCATCATATTACATTTCTTCAAGTTCGTATTGGACAAG
TGATT

MARCADOR 714 (SEQ ID NO: 2); C→T

GACAAGCGTTGACGGGAGAGACGATATAATAATAAGAAGGCATTGGGTATCAGAAG
GCACAATCCAATTATAAATGCCAAGGCCAAAATGAATAAAATTTATGCTGACGATTTGA
TCAATTACGAAGAATTTCCGATCGGCTCGAATCTTIGTTTGTATGTGCACTACTGTTA
ACTTAATCTTTGTTTTATATACTTTTGCCTGTATATATAATATATTTCATGTCAACTGAT
ACGTTATGATGTTTTTTGTAAATTAAGTTGATCGGAAACCTGAAGTCTATTTCAAATT
TAAGAAAT

MARCADOR 814 (SEQ ID NO: 3); T→C

TTTTAGGAAAATGGTGAAGTGTAGAGAGATATTATCGGAACGACAAGGTCCACTTCGA
ACGGGTCTTTTATTGTGACGAGTGTGAACCAAGTTTTGGCATTTCATAATGACAGGT
AGCTATTTTCCATCATCCATTTTGTATTAGTGCAAGCAAGTCATGAGTCGAAAGA
AAATCTCAAAAGAAAAAATGAAATTTCAAGGTTCAAAGGACTGCGTCCATTATTCGCA
CTGGTTGATGAGAACGTACAGATTCCAGAGCGGCAATGCTGCACAGTATCTTTTGT
TCACTTCTGAAT

MARCADOR 887 (SEQ ID NO: 4); C→T

TCGATTAAAAATTATCATCGATAAAATTCTAAAATTTATTTTAGTAAAATTATTATTT
TGATGAATAAGTTAACAAAAAATTTTAATAACTTTTTGATTGCGCAAAAATCTAATTCG
TTAAAAAGTCGTTCCAAACAGATATCGCTTGTTCGATGAAAATGTCCGGTTGTTAGAA
AATCATAAATTGGTTCAAATAATTTTCCAGAACGTTGAAAAAATATTCCCTTGTATCG
GATAAATAACCATTACAATTTTCCACTCGTGTTGCATGTGTTTCTCGACAAAAATCAGC
TAA

5

MARCADOR 1514 (SEQ ID NO: 5); T→C

TCAACAGAAATCGAGATTCCAAAAAGTTTCCTACAAATACTTAATTATCAATGGATATT
TAGTTTTGTTATCTGTTATCATAAGTTCTGCTTCTTACACGATTAAAAATGTCCAAGAA
TTTTTTACTATTCAAATGAGGGAAATAAAAAACCAATGCCAATAATATCCAGAACTAC
ATACATCTTTCTTTTTTTCGAAGCTCATCTATTCCGGCCGAAAACAATGAAGAACATTAA
AATTCTTAAAGATAGTCTTAGCCTTTTCTTGACCACTATCTTAACTGTGAGCGCTAA
AATGT

MARCADOR 2557 (SEQ ID NO: 6); T→C

AATAGTCGTCTCATTACTTTTTGACTTTTATAATTCGAGAATCTTATGTAGTCCTTCACT
TTACCCTTCTTCTGTGCAACTAAGAATTACAGCATTATTTTCGAATTTAATGTGTAAAA
GACAATAGCAGATTTTGTAAATTTGTGTTAACTCACTTTATATTTGCTTCATATCGT
GACAGAGAATTACTATTTTCAAGAGATTACTTGTCAACAGAGAATCTCCAGAAAGAT
TTTTATTTACGTGCGAAAATGGACAAAAATGGTTTCTTATCATTAGCACTGATAGCTAG
TTTCC

10

MARCADOR 3367 (SEQ ID NO: 7); G→A

TATCTCTTGTGTGTGTTCTGCATTGTATCAAAGTGGGTAAATTTTGCTTTAGACGTTG
ACTTATTGTCTTTTTTAAGTTATATTCTAGTCCATGTTTTCTTTGCAAAATTTTTTT
CCGCCGCTATGATTCATTGTTTTGTTGTAACCTCTCTATTAAGTTGCTTTTAGTTTGA
ATTGTATCAAATTTCAAACATTTAAATACGCACTAGCACTATTTTTCTTATCTCAAT
TAAGCGAATCCCGGAACAAGATTTAATCGATTTCCGAATCACAATTAATCACTGGAA
AAC

MARCADOR 3488 (SEQ ID NO: 8); T→C

ATTTTCCTTAACAAATCATTTTCAAACGAAAAACATTAAAAAGTGTTAAAATAAAATG
GTGATATTGATAAGAAATTAATTCAACCTGCATATCAATTCTTGTAGCGGCCATTTTCT
TAGCAAGTTCTATAGCAGCTCGATCCATATCACCTTCTTGCTCTAATGTCAATTCGG
TTCCGGAATTTTTTTTATTTTGCCATTCTTCATCTTTTTTTTATTTTTTACTGATATAGCT
ATAGACCCTTTCTCCCGTGCATGCCTGTAGGCCTGTTCTGATATACAGGCTTGTGAA
CCACTG

MARCADOR 4553 (SEQ ID NO: 9); C→T

TTCTGGGGTAGTTATACGGAAAATTAGACAATGAAGAGAATCAAAAAACATGCGATTT
TCAAACAGAGGAACTTTGGTACTTTTGCCTCGACTTACTTTATTTTAAAACCCATACAA
AATAAATGTTTCATTTGATTGATTTGTCGTACTAATAATTAGAGCTTCAACATTAGGA
TTTTAATAACCTTCAATTTATTTTCAAGAAATTAAGAACTTACGTATGGATGGAGAAAAT
ATAAAGAATGGCGATGACAAATAAGATTTGCTATGAAAAAACTAATGCCACAAGATCC
GAATGCA

MARCADOR 5266 (SEQ ID NO: 10); C→T

TTTATGAACAAAAATAATAAAAAATTAGGATAACAGATATCAATTTCTTTTAGCTATAAAT
ATACGCTTCGATTGAAAAAAGCTTTCAAATTATAATTAAGGCATACGTTACGATATAGA
CAATTAAGTCGACATTAATTATTTGAAATATTTTAAATTTTTTCTCTTTCTTTTTTCTA
TTCTCTTCCAAAGTGTCAAATAGTTATGAAATTGTCAGAAGCTAAAATGATAATATTAT
TCAAGTTTATTACCTAATCTTTTATCACCTCATTTCTTATCATTTATCTGAAAATCTAAT
C

5

MARCADOR 5365 (SEQ ID NO: 11); G→A

ATGTTGAATTTTTAATGAAACTTTTTCGGTGCATAAGCATTACAGATCTGTAAGCTGTG
CAAACCCTGTTTCTTTGTAAATTGAAACAAAGATCATTTATTGTTTCCAGCGTCGATTT

GACCTGGATAAATGTGGTACCAAAGTAGATGACGAGAGGTAAGTGCAAACAAAATG
CACAAAATGATTTTGTGCACTCAAATCATTTTAAAGTTTTGTGCAATTTTCCATTTTA
TAGTTTCGTGATCGGTTGTTATTCATCAACTTGATTTTGTGTTTTTGTGACTTATAT
TTCAT

MARCADOR 5667 (SEQ ID NO: 12); G→A

TTTGACACTTTTACGATACCTTACAAACTCATCTCCAGCACCCCAATTTACAATATCGCTG
CCTAAATAAAGAATTTATTCGGATATGAGACTGTAGTTTTTATTCCGTACCAATCATAG
TAGAACAGATCTATAGCATGGTGTCTACTAAAGTTGTGACTGGCTATTAAGTATGTG
GGTGTGTTTTACGTGTGCGTGGGTGTTTGTGCGTGTGTGCGTGTGCGTTTTCTGCACAT
ATTTTCGTGCGCGGTGTCTGTGTGTGCCGTTTGTATATGCCGAGTGTAGCTGTGTG
TATGTTCTTG

10

MARCADOR 6568 A (SEQ ID NO: 13); G→C

CACTCATAATATACCTGTCAACAACTCAGAAATCTGAATAAAATGACGCAAAAATGA
CAAAAACATTTTATCAACCTTTTCTTCATCACTCCCCCGCATTTCCAATTTTCTTCCAA
ACTGTTTTTGTGCTGCTACAAAGTCATCAGCCACTTCATTTTCTTCAAGATGGTTCTGA
GACGCCATTCTTGGATTCACCCCTTATTTCAACTGTTTCCGAAGTCCCAGCAGTTGAA
GCTGAACCTAGCATTTATATCACCACCCGATGTCAAAAAATGACAGCGGTCAGAGAA
TACGACTTCC

MARCADOR 6568 B (SEQ ID NO: 14); G→A

GCTAGGTC AACAGTTGGTTTATTTGGACTTATACGATATTAAACATAATATCGCCTCAT
ATACACAGAAATATCAAAAAACGAACACAGCTAAATCGAAGAATACGAACAAATGTT
TTAAAAATTATATTAAATCTTTTAATGCTCTCTACAATGTCGTATCTTCCCTTTTGTCTG
TATTTCTCCTTTGTTCCACCACTGCTATTTCTCATGCCTTTGAACATATGGTTCTCGTT
GCGTCGAATTGTCCTCGAAACTGTTGTTTCTGTCTGAATTACGTCGAACTGCTGGACTT
TGTCGG

MARCADOR 7633 (SEQ ID NO: 15); T→C

ATATCTCACTTCTGACATAAATTGAAGTGGCACTGATTTGAATGAAATGATAAATAAAA
TAAAGACGACAAGGTAGTGGAAAAAAAAAGAGGAGAAAAACACCGTTTAGTTTTGGAT
GCAAGCTCGAATCTGAGTTTTCTTGCAAACCGTACACTGATCAATTTTCTTACACAAA
CATAAGAAAAAAGAAGTGATTTTACTGTAGCTGTATCGTATAATTCAAATCATATATA
TATATGTTTCAATAATCTATACATTTATGTATTTTTTTTTTTGAATGGAACAGTGAATGA
TTTTAAA

MARCADOR 9400 (SEQ ID NO: 16); T→C

ACAAATGCCATCGGGAGAGAAATATCGTTGGCGTACTGATCACATTGGCGGTATCAC
TTCTTTGAAACTCCAGCTGGTATTGTGTATCATTTTCATGCAATACGCTATTTTTGATC
GAATATGTGACGGCGTAGTGTTTCATTTTCCAACGCATCTTACGTTGCGTGTATGGA
TGATGACGGACAATTATTGGAATATCAAACACCGGATCGATTGCATTCCGTAACCTTG
AAACGTGACATATATGGGAGAGTAGTGCAAATAACTTCAGATGGCGAAAATATTTTCT
TCGAATATGG

5

MARCADOR 9473 (SEQ ID NO: 17); C→G

ATAATATATATTTCCATTGATAATTTTTTCATATTATGTGATGTTTGAAATTTTCTGCA
ATTGCTACATTCCGATTAAAACTTTTATTATCCGTA CTGGAGAATTTTGCTTTTTTTTG
ACGGTTTGTTCAATAAGTTGTCAATATATTGTCTGCCTTAGTAAAACCTTTCTAATCTA
TCCGTTCGAATTGGAAGTTGAAAGTTCAGCATCATTCTTTTAGTGAGGTGTTTAAGTT

GTTCAATAGATATTATTAGAACGATCTCAATTAAAATCTTCTGAATGATTTTATGTTTT
TAT

MARCADOR 9858 (SEQ ID NO: 18); A→G

GCAGCACATTGCACACAGTAAACTGCAAAGTGAATTAAGAGATATTGGGTTGAATTAT
TTCTAATTTAAAAGGATATAATAAATGACTTTGATGATTGTTGATTTTAAGGTATCTCG
GAAGACTCCATCAGTCTCAGTGCTCTAGCAATCGCTATAGGTACTAAAAGAAAAGAAA
AGATGTCTCGTTATTCACCTTTGAAATGTACATATCAAATCATTTTGTTCGTATGAAATTA
AGTATATTATGTCTAATCGTATCATTGAAATGAATTTACTGTCAGTGTAGAACTATT
TAGGCAG

10

MARCADOR 10349 (SEQ ID NO: 19); A→G

AGAGTTCAATCGCCAAGTTGTTCTTTTTCTCGCTCGCAGAGATCAAAACGGTGTTGG
CTATACTCATTATCATCAGGCTGTGATAGACATCTCTTAGAATTTAGTGCTTTTCTG
GATGAAAACATTATTTCTCAAACATGACACTTAAGGACAATAGTGCGTGACTTCTTTG
TTAACGTACACGAGAGAAAACAAAACAGATGATGCTTGTTATCTTGGTGATAAATGTGTA
TTCAGAATAATGTTATATATCTTTGCGTGACAAATATCATTTGTTATACTTCGGATAC
GCCTTTTTAT

MARCADOR 10520 (SEQ ID NO: 20); A→G

AACTTTACTTGAACTTTTTGGTGTTCAATTTGAATATTATACCAACCATTGAGAAGA
CTGTATATAGAAATGAACCTTCAAGAATTAATCGAAATTTTATTAATAATCTTTTATTTG
AATATTTTCAATTATTTAACTCATTACTATTTGCAGTATATTATTAGATCTAATGTAGAAA
AAAAAATCAGATGGCAAAAATAATATCATAGGTTTGTTTTTAAATTCATTGCAAAATT
CAGTGCGCCGTTCCAGTCGCTCGTAATTACCCTATCCCTGAGCTTTACAAAAAGAAT
GCTTT

MARCADOR 10678 (SEQ ID NO: 21); A→T

AGGTATCTAGATAGCATAATAAATTACTACACAAACCGATGGAAACGCAAGTTTGGCG
TTGCGTGTTGATACAAAATATTAGAGCCAAGGATGGTATCACATGTAAACTGCAATT
TTGCTATTTGTTTAAAGCAAATAAGAAATAAATAITTCGTTCTTATTCTTTAATTTATTTT
ATCAGATGGCTTTGTTATACCATAATTGTAAATCTGTCATATCTTAATTGCGCAATAGC
CCAAGATTCTTGATATTCTTACATTTACAATTTATTTTCTTATTTCTAGTTTTAGAATT
ATA

5

MARCADOR 11676 (SEQ ID NO: 22); A→G

AATAGCTACTCACAGCTTAAGTTAACTAATGGATTCTTGAATTTATTTAAGCGTGTAGT
TAAGCGATTAATATGATGGATGCCAGAATCGCTTTGTCTTATAGTTTTGTCTCGACA
GAAAGGATGCATTGTTGTCTTGAATTTGTTCAAGGGAAAATTAATAGGTTTCTTTCAA
TGACTCCTATTAATTTTTTTGAATTTAGGCTTGCAATTGCGTGTTCTGATCCACTATTA
GCACGTACGGGTATCGCAGTGCCATGTGATGCAGCACTATGCAAAAACCACTCCAT
GTCACCTG

MARCADOR 11933 A (SEQ ID NO: 23); A→G

TCTGTTGTAAGTTTCACAATCCAGTTAATTTAAGCTCAGCTTATTTGAAATTTTCAACA
AAATTACGAAATTAATTTCTCGGTTCAATTTTTTCAACCACCAAATATTTAGCATAATT
GGCCTGAAATCGTCAAAGTTTACAACTTTTGTTGAGCAATCTTCTTACTCTTACAA
TAAACATGATTAACCTTGTCGTCATACCAATCTCGTTTATAGCAAATTCTTTTCAAAAAA
ACATTGCTACAAATTTTATATCGCATCATTTCAACACGCATAATTATTTTTCATATATGA
AAA

10

MARCADOR 11933 B (SEQ ID NO: 24); T→C

TTCACAATCCAGTTAATTTAAGCTCAGCTTATTTGAAATTTTCAACAAAATTACGAAAA
TTACTTTCTCGGTTCAATTTTTTCAACCACCAAATATTTAGCATAATTGGCCTGAAATC
GTCAAAGTTTACAACTTTTATTCAGCAATCTCCTCTTACTCTTACAATAAACATGATT
AACTTGTCGTCATACCAATCTCGTTTATAGCAAATTCTTTTCAAAAAAACATTGCTACA
AATTTTATATCGCATCATTTCAACACGCATAATTATTTTTCATATATGAAAAACCATATT
ATAA

MARCADOR 12716 (SEQ ID NO: 25); A→G

ATTAACCTCTGAACCCAAAGACTGTTGGTTAAAATAAAGATCTATTTTAGTTATACATCT
AACATTAAAGGTTTTCTGACGGAACAAGTAGGTTTGATAATTTTCATGTAAGTGTAAA
GAACACCTGTGAAAGGGATCAGTAAATTTGGGGGATGTAGCACGGAAATATGAAGC
TGAGTGTTTTGTACCCAAAAGTTTTTCAAATCTGCGAAATAACGAGAGGTGTAATGAT
CGTTTTTAACCAAATTTTTTGATTCTAATCCTTCCCACAGTTTTGAAATTCAGTAAGCA
TTTCTTTT

MARCADOR 12925 (SEQ ID NO: 26); T→C

TTGCAACAAATCAATAATAAAAGACTTGCGGCTAACAATATATTTGATTCTTTTTTACC
GTTATTATTATGACAGGTAATAATAGTATTACAAGCATATTTGTAGGTGTCAATTTTTT
CAATTCAAATTTTCTTAATTCATTATTTCTTCCTTTTCTTAATAAATAGTCTTTCCATTTA
AGAATTAACCTTTTTGAAATCTTTAATGAGAAGACACAAAAGATTCCGGATAATTTTGCA
TCATCTTTTCTATTTTCGCGTTAGTATTTTATGTTTTCAACAGATTTTTATGATTTAACTA
TA

MARCADOR 13063 (SEQ ID NO: 27); C→T

GATAAAATGGGTTCTTGTCAAGCTCATTTGGCATATCTTCGTCTTCTATATTTATATCC
TTTAATATCTTCTCTTTTTTCAAATTTTCTTCCCGACGTTTTCCATATCGACCTCTTTC
TTCATAAATTTATCTTCTCATTTGCCTCATTTTTGACTTTTCATCCGTTTCATCCTTA
TTTTCTTTTTTTCATCTCCTATTTTACCTTTTCTTTATCAACTTCTATCTTAACTTTCT
CAATGTTTTTTTTATTTTCTTTCATCTTTTTGTTTTCTTCTATTGACATACTATAACAAA

5

MARCADOR 15000 A (SEQ ID NO: 28); T→A

TTTTACGAACAATTATTTTCATAAAAGATTTCGTATTTTTGATTAGTTTTTAAGAATTTTTTT
TTATTATTTTTAGCCAACAAATATATTTTTCAAATTTGTTAAATTTGAAATTATAAATTTCA
AACTAAAAAAAAGCAAAAAGCTAAGCCAATAGAAATAACATACATGTGTAATATAAAAT
ATAAAGTATTCGAAATGAAAATCAAAGTTTCATAACAAAAAACAAAAATATTCTAACCC
TTTTAGATTTTCATCAAACTTCACTAAAAAGTTAAATTTAAATTTTCAAATTGTTATACA

MARCADOR 15000 B (SEQ ID NO: 29); A→G

CGAACAATTATTTTCATAAAAGATTTCGTATTTTTGATTAGTTTTTAAGAATTTTTTTTTATT
ATTTTTAGCCAACAAATATATTTTTCAAATTTGTTAAATTTGAAATTATAAATTTCAACTA
AAAAAAAGCAAAAAGCTAAGCCATTAGAGATAACATACATGTGTAATATAAAATATAAA
GTATTCGAAATGAAAATCAAAGTTTCATAACAAAAAACAAAAATATTCTAACCTTTTA
GATTTTCATCAAACTTCACTAAAAAGTTAAATTTAAATTTTCAAATTGTTATACAATGAT

10

MARCADOR 15709 A (SEQ ID NO: 30); T→C

TCAAAGACAAAATGAAGAACTTAACAAAAAAAAGGCCAATAAATAAAGGCTATTTTCGT
GAAAAATCTAAAAAAAAGATCTGTTCTTTTGAATCAAGTGATTCTTCTACTACA
TTCGTGTTGTAATTCTTACTTGTATACAGTCCCCAGTTTTTTCGACGATAAAAAACATTT
CGATAAGTGAGTTTGAATTAATTGAATTTTAAAAGATCATAAAAAATAAATCAAATAA

AAAGACCAAAATTAAGTCTGATAATTCCAGAAAACACAATAATAAATATACAAATAATA
AAACT

MARCADOR 15709 B (SEQ ID NO: 31); T→A

AAATAATTCACATAATTTCTCATCATCAAATTATTTCTGACAAATCGATAAATCAACGATTA
TAATAGCGAAGAGAATGAAAATTAATGTGGTGCACAGTATACGGACCCCATATACAAT
GTTCAACAGAGATGAACATTTTTTTTTCTATTAAAGTTTTCTGTTTCGGCGAAAGAAAGAC
ACTTTCTAACGATGCTTTCTCCCAACTCCCCTTGCAATGATAGAGGATGCAGCCAA
GATTCGTGCGACTCAAGCAGCATCACTCAACCGGCCATCACTTCGGGACCTTTTTCCC
TGCCTTTTA

MARCADOR 17333 (SEQ ID NO: 32); A→G

CATTGCGAATGACCGCTATGGAATATCAATTAGCAGATATTAATCGTGAATTAAGCAC
ATTGGTGGAATTTTTACGACCAAATCGAATTTCAAAAAATGCTACACTTGCAACATCA
GCAACCATTGCAACATATAACAGTACTTCGATGCGTAATGTAAAAAAGAAATGTAATG
CATCTGAAAGCTGAAAATTCATCTGATATATTGAAGCAAAGGTAAGATTATTTTTAAG
ATATCATTCTTGATGCTCTCATAATTTCTACATCAAATTAATCAAACGATTCATTTATG
TTCATTT

MARCADOR 18110 (SEQ ID NO: 33); C→T

TTCTTGTTGTACCTATCATAGATGATAACTTAAGTACCAATAGCAATAGTGCAACGAT
GCAAGGATTCTGATTAATGATTATAAAAGTTTAACCAATCTTCTTCATTCCTTCTAATC
AAGAGAAAAAAAATGAGAACATTTTTATGACATTTGAAGAAAGGCAATTTATCGCTG
AAAATTCTACTGCGATATGGAAGTATCAGATAGAGAAAATAAATATTAAATATGGATT
TCATACGAAAAATGATAAAAGATAATAATTTACATTTTGGTGCTTTACTGATATGATTG
GAGTATT

5

MARCADOR 19999 (SEQ ID NO: 34); T→A

CGATATTTTTTTGGACGAATCAAACCTTTTTGGGAAATCATTTGATGTCACAAGCATGG
TTTGAGAAATTTTTTTCCGAATTAGTTCTGCTAAAAATACTCCAAATGAGTCTAGTGGA
ATTAAGCTAAGCACCTTAAGTAAGTTGAGAAAAACGTTTCCATTTGACTAACAAGGCT
AGTATATCGACATGAGACAGAAATGGTTATTACTTCACTCACTTCATGAAGCGAATAC
GAAATATCTGTTCACTTTAGTTTCAATCTACTATTTTACCAATAAACGTGTTCTTTTCCG
GATAAAT

MARCADOR 20570 (SEQ ID NO: 35); T→C

TCTTAATTGATTTTCTTAACTCGAAACACTTGTCTTGATTACTGTGCTGTACTTTATCTT
ATTAAATTAAATAATTTCCATGACCACTTCATACCATTGACCATCAAACCTTTGATGAAG
TTTATGTGTGAAGTGCCAAACAATCATTCATCCCTTCAGTTTAACTTATTGCTGGTCAA
ATTCATAAAAAATGCAAATTATCAAGCAGATAGTAATTGAGTGAACGTAGCGTATTCTC
GAAATTTCTTTCTTGTATTTACCTTATATAGAACAACGTATATTGTAGCATATATTCA
ATAT

10

MARCADOR 20587 (SEQ ID NO: 36); G→A

TTTCTGAGTTTGCGTTACAGCGCCAAATCTTCACGGAGATAGATAAAATACTTATCGT
GAAATTTTGCGCCATGATTTAAAAAACACGGAGATAAAAAATAAATGCTTATCGGTG
ATAATTTAGCGCCATAATATGAATGAATTGAAAAACAATTTGAGTAGAAACATGACAT
AGAGTTTTCTGTTTCTGGCTACGAAAATGGATGAATTTTTCTGGAATCGAATTCAGTC
AAAGAAATAGGAACGTTGTTACTAAATGATCGAAAAGCTTTCTAAAATTAATTTATGA
CGTCTAAG

MARCADOR 20698 (SEQ ID NO: 37); T→C

ATCTAAATCTTCGTTTTATAGTGGTAAGACTTCCATTTGCTGCATTCTTGCAAATTAAG
CTGTTGAAAATACTTTTTTTTTTATAGATTTCGAATTTAATCATATTATAAGAAGAATT
AATTCGAATAGAATTTTAAATCATTTAAACCTTTAAGTTTTAAACTAATATAAGTTAT
GCAGATTTGCGGAAAAAGTCTCATTTGTTAATTCAATTATTCCAAAATGTAATAATTTT
ATAAATTCAAATTTAACTACTACTAACTTCTGAAGTCAGGAGCCAGTAGCAACAACG
TAAT

MARCADOR 21554 (SEQ ID NO: 38); A→G

AACTTTACATTTATATTCAATTTTTTTTTATTTGTTTGTGTTTTAGAAATTTGAAAATGGG
TACTAATCAGTGTCAATTTGCAGCCTCTTAGACCCTCTTTATAACGACCGATTTCGATGA
AATACGTCATCAATATGCCAGTTTATTGTTCCGGTGGAGAATGTTTTCAAAAGTTGCT
GAAGTGATGAAGTATAGTGAGAATGCACCTTATTCAGCACCATTAAAGAAGTAAATTTT
TGCTTTGGAATTTGACAAAGACAAAGCAGGAAGTTGACAACGATGTTCTGATGAAAC
GGTTTCGA

MARCADOR 22174 (SEQ ID NO: 39); A→C

GTCTATTTTGGCTGTCTTCTAATAATTCATTTTGTAACTTTTGAATATGATAAATGTA
GAAATTTTTCTTCCTGGTCTATAATAGTTTAATAATGTGTTGTAGTAATAGTTTTGGT
GCCGTTGAAATATTTCAATGATATGCTATCGCAAATTAGGAATTCAAATCAAGGTTA
CAAGATAATTCAAAAACAAACAACGTAAAAATGAAATAATTTCTTCTTCTTACTTACCA
ACAGGCATATCATCATCATCCTCAAATTCATGACTATATTTAACATTGTCATATTTGAA
TAATC

5

MARCADOR 22254 (SEQ ID NO: 40); C→A

CGACGCAAAAATCTTTCAAATTGTCACCCAGTTCTCTAAGTGATTCCAATGATGTTGG
TAAACATTCTGCATGATGTACCGGGTAATGAACTACCAAGTTGTTTTTGGCTTTTAATA
CAACTCGCAAAGATTCTGAAAACCATGAAATTAAGAAAGATTAAAATAATCTGAACTCT
TTTTTTCATTTTCTTGAACCTAGCAATATACTGAGTTGGATAAAATTTAGAAACGAA
ATTTGCGAAATTTATTGAGTAAATTCAGGAAAACCTCGGTTTCGGTATTCTAAATATAAA
TAGATA

MARCADOR 22259 (SEQ ID NO: 41); A→G

GTTTCTTTGGTTTATCTCAGTAAGATTTGGGCGGAAATTTGAGTTATACTTTTCATTTT
CATGTGCTGTTTTAAATTTCTTCCATATTAGTATAATTTTCAAATAATTGTAGCGTCACT
GGTTTATTTAAGGATAACAGGTTGGACTGCAGTGGCTGAGAAGTGTCTTGCCGGTCA
ATTGTTTGTGTTGATCAACTTGTACGAGTTACTGATATCGACATATATAATACACGG
CAAATTCATTCGTTTTGAGTACTGCATCAAAAACGGGATTATCGGTACTTTGTAAATC
GCAGTAT

10

MARCADOR 24708 (SEQ ID NO: 42); C→T

GACCCCTGCTCACAAGGCAGTTCCCACAGACAATCACACATCTAATCACACACATCA
ACTCATCCGACGTAGGCTATCAATAAGGAAAATTGCATTGCTTTATCGTCTAACTGTA
ATAAACATCTACATAATGAAATTATTTGCGCACTATGACAACATAATATCGCCCAATGCA
AATATTTGTCTCAGAGTTATTCCCTTTTAACAGCTGTTGAACGAATAGATAGGACGTC
ATGTGGATGATCTACTTGTTCAAAGGTTGAGGTAACACATGAAACACATGAAAACGG
TAATTTAAAA

MARCADOR 25276 A (SEQ ID NO: 43); A→G

AAAGAATGGTCAGCAAGATGTGGAAAATCGATTACTATAGTTGAAGTATGAATCGAAG
AGGTTTTTTTTAAATTCTAAGAGAACGAATAATCGGCAAAGAGAAAGTTGAGTAACCTT

ATTTTGCCTTGTTTTCAGTCAATTTATAATATGCGGTTAATTGTGTTAAAGAAAGTACA
AGGTATGAAATCTAAGCCAAGAAATAAGAGAAAAACAGCTAATGATTATTTCTGCATTTT
TTCTTTTTCGACACAACTTGAACCAGAATCAATTGAACTAGTAATCAGATTTTGATT
ATTGCTT

MARCADOR 25443 (SEQ ID NO: 44); T→C

TTAGATTTTGCTGAAGCATTGTTGGTTAGATCGATGAAAATATAATTATGAGAGATTTT
GTTGAAATTCAGCAACAAAATTATTATTCATGTCTTCATGCTGTGCTGTTTGTATTTTATT
TCTTCTTTGACATCGGTTATATTTTGTCTTCCAACAATATAAAAAAAAAAATTATAATCA
ATTGGTAATCAAATTAATACTCTAATTGTTAGCTCCCTAAATCAGCTTTAAAAAATAA
TTGCTTAATTGGTATTTGCTACTATTAGCAAACCTGAACTATCCTTTTCTCGAATGGTG
AAC

MARCADOR 26447 (SEQ ID NO: 45); G→A

ATGAGCTGATATTTGATATGCATATTAATAATAGGGTAAATTACATTAAGTTAGATATC
GTTCCGATAAATTAATTAGAAAAATGTTTACCAATTAGATCGCAATGATGTAAATTT
CACGTATTTTTATTCTTAAGATTTATTTGCAAAATTCAAAAATATGTCTTATGAAAAATA
ATATTTCTGTGTAAGAACAAGGGACCGATTCACTTGATTTATTCGCAACAATCGAAA
TTCAAATTAGTAATTTTAAATATTGCTTTATTCAAACCATACCAATAATAATTTGAGAG
ATTT

5

MARCADOR 26730 (SEQ ID NO: 46); A→G

ATTGATTGATTCAAATAAGAAATTTAAATTATTTCCCCTTTTTTTCAAAGATTTAACAA
ATATTATTTATTTGATCTCCTCGTTCGTTCTTATCTTTTTGATTATCAATCCATCCTCCT
CCATCATATAGCTAATTTATTTTTTGCATCGTAAATCAATTGATGTATGATTGATTTCTT
GATTATAAAAAGTTAGAAGAATTGAATTGCTTAAATTTAATTATTGATAATGAAATATTA
TTATATTTCAAATGATACGAAGAAATATGACGATGATAAGAGAAAAATATGATATTTAT
C

MARCADOR 26974 (SEQ ID NO: 47); C→T

TACGATAAGTTATTTTATTTTACACATCTCCATCCTTGACTAGTGTCCGTGCCGACTGT
CGGACTTGAACCGACAACCTACTAATTACAAGTCAGTTGCTCTACCCAATTGAGCTAA
GCCGGCCATCTAGAATGTGCGACCCCGTCTGTTGTTACATCTTCTATAATCGTTTGGTA
TTCAGGACTCTCTTCTTTCGTGGGTGGAGGATCTTGATACAGTTGACTATTAATAAATA
GGGCCTTTGTTAGTCTGTTACAACCTCATAGACAAAGGCGACAATTTTAGCTTACATCT
TACGTTATGC

10

MARCADOR 27080 A (SEQ ID NO: 48); A→G

ATGGTAGAAAATTATATGAAAAATATCATACTAAAAATATAACAGATTGTTATAAGGT
ATGGTTTAAAGAATTTACAACAATTGATTATTTATGATAAAAAAAAAAAAAAGTAAATCAGT
GAATCATTAAGATAGTTATGATAAGCAGTTTGTTATTTCGGTAAAGCGAATGATTAGAGG
AATTATGGGACGAAACGTCTATAACCTATTCTCAAACCTTTTAATGAGTATGACGTGTCT
TGCTTGCTTAAAATTATTTCAATGATCATTTCACTTTACCAGTATGATCATGATTAGAC
TTGAA

MARCADOR 27349 (SEQ ID NO: 49); T→A

TTAGTATCGATATTATCACAAATGATATCACTTTTCATCAATACTGGATACGATTTTATTA
GTATCATAAATTTTGTGGCTCGCATTCCGAAAAGTTTTACACGTAGAAGATTAACCTGCA
ATATGATTTATTTTATCATTTTCGAATATCCAACTTTTGAAATAATTTCGAAAATGTTGAAA
AATTTTGAAAAATTGTAAACAAATATTACAAAAATATCAAATGAAATTAATAACTGTC

CATTTCAAAAAAGAAGAAAAATTATGAAATTACCAATTAACAGGACTTATTAATT
AAA

MARCADOR 27461 (SEQ ID NO: 50); G→T

TGTGGAAATAAAGTACAATTAATTGCTGTTGCTTAATAATATTATTTTCATTCTTGGC
TTTTTTTTCTTTCCCGTGATATTATAAAATATAGTTTTTTAATTTTAACAAATCGTCAT
AATTATTTAAAAAATACTGAGGTGAGTAAATGTAATTGGTTGCTGGAAAAAAGTGGG
TGATGAGAGGTGAATGAAAGCAGAATAGTTTATGATTGCATCAAATTCCTCCTTAAT
CTGTGATTAATAATCAAACAAAACCCGAAAAGTTTCTTCTTCGCCTTTTTCTTCTCTTG
TTTCA

MARCADOR 29128 (SEQ ID NO: 51); T→C

CGAAATCCGCCGCGTGCATTACTTTGCGCTTGTTGATTACGACGCATTTGTTGCTCG
TTGATAACCTTATCAATCATCATACGTCCGTTACGTATGCAATCAACATCGCCAGTTA
GGCTGAAATCAAATGGATGGCGATGATATCAAAAACAAAAAATAAGGAGTATTTGCTGA
ATCATTTCTTTTTCTGTATTATTATCAAAATTTTCTCCTTTCCATTGTTTCCTTCTTAATC
AAGTGAATGCTCATTTTCAATTTGAAATAATCCAACGTAATAATTCCCCATATTCCAAT
TACTTTC

5

MARCADOR 29168 (SEQ ID NO: 52); A→G

AGAAATATTAAACTTTGAAAAGATGTGACATGTTCTGTAACAAAAGCCCCAAAATTTCGA
CTGCTGCGGCTTGAAGTAAATTTTGAATATGCTACATCAGTAGTGCAACAGATGGT
TCGATAAATAGTGGTAAGTGATGGGAATCCTAGGAATAGATGGGAATTGTATTTGAGA
TATAAATTTGATGCATATTTTCATAGTTGATTATATCTACGATCACACGTTGAATATTCT
AAAAGCAAACCTGTAATTAATAATTGAATTTGAAAATTTCCAAGAATTAAATTTGGTAA
CAAAAA

MARCADOR 29455 (SEQ ID NO: 53); T→A

ATTGTCAGGAATGAGAAGCAAGTTTTGGATACTTAAGGGATGAATGGAACACATACAT
GGCAGAAAATGTTAGTAATCAAACCATTTAAATTACTTAGCCACTATGCTAAACTTTCT
AGAAGTATGGTTGAACGTTTAAAAACCTTCGCAAAAATTGTATTAGATTATCTTAATCT
TCCCTACATCAAAACAGAGAATTTTGTCTACGACGTGAGTCTGCATGTATTAAGGA
AGTTCGTATCATGACGTAAATATCCTGAGTGATTATTGAATTCAGAAAATGAGCTTTT
CATTTGG

10

MARCADOR 29816 (SEQ ID NO: 54); G→A

ATATGAGTGTTACATGTGTACGTTACATGTAAATATTATATGTTATATGTAAAAATGTC
ATGTATAGCATCTATTCACGTGTACGTACACGTGTATATACATATACATTGATACTTAA
TACGTATACGCATGAATGAACAGATATTATATATTTTACGTACACTAGACTCACATGTAC
CTCTGTATACGCATACATGTACAGATATATGTTTGACATACGTAAATTCATATATGCTT
TTATTTATGCTTATATTAATTGTCACATACATGCCTTATATTTTCGTTGTTATAAACACA
TAAA

MARCADOR 30575 (SEQ ID NO: 55); T→C

GAAAATAAAATTAGCTGAAAATATATGCGAGGTAAAGCACACAGAAGAATTAAC TTAA
GGTAATATATTGTAAGAATTTTTATATTCGGCGCACCTAATAATTTTTAGACCGCATAT
GCCCAGTATTTGAAACTGGTAGCGCTGTTCTGTACTTGCTGTTGTCCATGTTATGTATA
TGATACCATTCCTAAATACTTTTTGCGGCTGTGGTTTCCAGTGTTGATGTGACTGGTAT
GATGCCTAACACTGGATCCTTCCATCTGCGGCATTTTGTGAAATTCTTATTGATGTG
AGCTGTTTA

MARCADOR 30991 (SEQ ID NO: 56); A→G

CAACTGTGAATCATAAACATTACTTAAATTAATGAAGCTAGTTAACGACAAATATATTT
TTTTATGTATCAGTGCTATCATATAACATAAAAACTTACTTTCATTAATAAATGAGCTCA
AATATTGACTTTTGTCCAAAATGCTCAAAATGTCGTCATAATATTTGAAATGAAGATAA
TTTCACGCTTTTGAAGCCTCCTCTCACGTCTTTAATCTTCTTTCTTCTTCTTGCTC
TAATGGTTCTGCGAAAAACACGGTGCAATAATCACTTCCATAATTTATACAGTACAT
AAGC

MARCADOR 31796 (SEQ ID NO: 57); A→G

CTGCTTAACTCTTTTCATTTTTCAGAGAATCTTCTCTAAAATTGTGAATTGATCCAAAC
CAAAGAATATGGATAATGTGATTGAATTCCTGGAATTTAGATTTTGAGAGTTTTGAA
GTTTTTAAAGAGATTGAATTTCTGTGACCTTCTGGTTATATTTGATGTCAATTCGGGATG
CGTATTTTGGCGAAAATTTTGGCCTCACTGCAATCTTGTTAAAAGTCAAAAAAATTC
AATCGTAGAATTTCGGGTTTACCTGATATTACTGGAAATCTCTGATCTTTGTTCTAGAT
TGCTGT

5

MARCADOR 32164 (SEQ ID NO: 58); A→T

ATAAAGAATTTGCAACTCTGTATACCTTTTTGCAGTGCAAAAGCGGATGAATTCCTCA
CTGCAGTGTGACAGATTCCTTTGATAAAATTGCTTCGTTCTTATGTAACTTGGAAT
CTCGGTAGTTATGCTTTTGCTAGTTGAAAATGTTCTGCTCTTGTAACATGCAAAAA
GAGATTATCTTTGTTCTATTATGGAAAGATTCTTTTGAATTTTGACGACTGAGAAGAC
AAATTTTATCCCAACTTGTCACTGCAATAAAAATTTTCTGACCTGTTTCTTAACCTT
CCAAGT

MARCADOR 32223 (SEQ ID NO: 59); T→C

AAAATCAAATCAATATGATCAGATAACTCATACTTATCTTACTGAAAATTCCTCATTCA
AGGGAAATAAATAATTGCAATTCCTGATTCCGATCATGGATGATTTTCAAGCAAATTAC
CAATGATATCTATCGATAACGATTACAGCATACAGCTATAACTTATTATTGATTGAATT
GATGAAAATAATTTTACCAGAAATTTATCAATGTTTATCTCATTGCAGTATACGATGTT
TAGTGTGACAACACTTTTTCTTGGAATAATTGTGCATAAATCATTGATTGCATTTAGTA
TTGGA

10

MARCADOR 34439 (SEQ ID NO: 60); T→C

TCCTGCCCACATTCTTTCTACTTTAGATAATCAACAGGAGTTAGTTGAAAGAGAAGAC
TAGGAACAGTTGCAACTTCTGAATCTTTCTGACTTTCTTTTCGTTTTGTAAATTATTTATT
TGATAAATTTAAAATTCGAAGAGAAATAATCCAAGGTCCAACCTCTTTTTCTGTTAGT
TCTTGCGAATGCTCCATCAAAATGCAAAAATATGATTAGAATTCTGATGGAAATTAACA
AAATCGATTAGATAAGAAAAGTACAAAACAGAACTAACTTTTTCTCCCATTTTCATAT
TATAG

MARCADOR 34903 (SEQ ID NO: 61); T→C

TCATTGCTTTAATACTTTTTAACGAGAATTTTCTCGATCAAATAAGATCTGCAATTGA
TATACGTCAATAAGCGAACATTAGCTGTATTACACGCTAATATTCACATATGATGAAC
GTTGTAAGCGTCATACATCAACATATATCCATCCGATAAATAATGACCACTACACATT
GCTACCAACCATCCTATCCCGCCACTATTTGAAATGAACTGAGAAGGAGTTATCGAC
ACAGGCTTCCTAGCAACCAAACAAAAGACGAGACAGATGAATAGATAGACAGACAGA
CGAACATACAA

MARCADOR 35336 (SEQ ID NO: 62); A→G

AGATTCTGGTTATTATTGTATTTCTGATTTATTTAATCCCAACTTAAAGATTCATTGGCT
ATTGTTTAGCATCTATATCAATTTTATAAATAAATAGTAATACCTGATGAAAAGCAATAA

ATAATTAGATGCAAATTTTAATTAGATACAGTTTGATGGAAAACATTGAAGCCATGTAC
AACTAATTTATGCATGTTGAATTATGCATGCATAATTAATTTATGCATGACAGCAAGTT
TGGTATAAAATTAATTTTGTATGAAGATAAAATTTTATAAATAATGATAATAATGCTGGT
AA

MARCADOR 36040 (SEQ ID NO: 63); T→C

ATTATTGAAAAGAATAATGTAGCTAATTAGTTGAAGCTGTTAAAAGTAAAGCTAAAAAG
ATGATGGAAATTATTCGTATAAACATTCTTTGTAAACAAACAGTCATTTCTGTGAATAA
ACAATTATAATTATAAACAACTATTTTCAAGACAATAAAAAAATTAGGAAGCATTGTTG
TGATAATCAATAGTTGATAGACTGTCAATGTATTTTTATCAGTCGTGCTGCTTTTTTTC
CCTTTCTTGACTCATTTATTTTATTATTTATTGATAGAATGTCAATATTCTAGTCATTTG
TTAT

5

MARCADOR 37881 (SEQ ID NO: 64); T→C

ATCTTAACTTGCTTTAAACAAATAAATTAAAACAGCCCAATGTTCCAAGAAAAAAGAT
AAGTTAAAAGTGGGGTGTCAAAAATTTATGAATTGAATTGGACAGTTATTCAGATCC
TGAAAATACGCTTCTCTGATCACTGCAATATTTCCGATAAATAAGTGAACATTAGGT
TAATCTTAATTTTCCCTTAACTTTCTTAGCCTTTTTTAAATTTTTGGATTATTCAAGCA
TTTTTATTGCGGTATCGTTTTTGTAACAAAAAAGTATAATTCAACATTCAGGCTCGAC
GTTATG

MARCADOR 38622 A (SEQ ID NO: 65); C→A

AATTAATAAAAAGAAAGGAATACGATAAAATATCTATTTTTTTGAACTAATCAAACATAT
TCCTCACTGCTCACCGGATAGTTGCTTTCTAATTTTACATTAAGAAATATATTTTTTTTT
TTCAATAAGGAAAGTTATGCAGACTAGGAGAATTCTACTCTGAAGAAGAGATAAGCAT
GTTAGAATTATTAATCTATGGAAATATCCTTAAAGAATGCCTATAGTAGCTCTGAT
TTCGAAAAAAAAGCAAAAAACAAAATAACAAATTCTGCTCAATTGAAATAAAAAACTT
TCCT

10

MARCADOR 38622 B (SEQ ID NO: 66); C→T

TAAATATCTATTTTTTTGAACTAATCAAACATATTCCTCACTGCTCACCGGATAGTTG
CTTTCTAATTTTACATTAAGAAATATATTTTTTTTTTCAATAAGGAAAGTTATGCAGAC
TAGGAGCATTCTACTCTGAAGAAGAGATAAGTATGTTAGAATTATTAATCTATGGA
AATATCCTTAAAGAATGCCTATAGTAGCTCTGATTTTCGAAAAAAAAGCAAAAAACAA
AATAACAAATTCTGCTCAATTGAAATAAAAAACTTTCCTTCAACTTCCAGCATCACTGC
TGTGA

MARCADOR 38622 C (SEQ ID NO: 67); C→T

AACTGCTAAAAAATTGAACTAGTGTTAGATTGATAAGTGGGCAGATTAAAACCAATT
GTGTTATTGGCCCGTTAATTAGTGA CTCTGAATAGCTATGGCGAATCGTATAGTGTG
TACCGACGACGTATCTATCAAATGTCTGCCTTGTTAAATTTTCGATGATAGTTTATGTG
CCTATTATAGTTGTAACGAGTAACGGAGAATAAGGTTTCGACTCCGGAGAGGGAGCC
TGAGTTGCCACATTCAAGGAAGGAAGCAGTCGCGAAGATTACCCACTCTTAGAATGA
GGAAAGAGTGAC

MARCADOR 38622 D (SEQ ID NO: 68); C→T

GAAAACTAAGAAGTAAGTGAAATTTCTAAGTTCTTTCCCAGAAAGGTTAGATCCAATA
TTTGTTTTCATTTTAGCATTTTATCCAATGAAAAATGTGCCCAATAAATACTTGTATAT
AGTATTGCATTTAAAACTTCAGAAAGCACAATGAGATCTAAGCTCAGAAATATGACG
AATACCAATCCTTTTCCTAGTCTTACCGCTTCTTAAC TTTGTGTCGCTTTATAAAAATT

AAAAATAAAAAGTTGAACAATGGGAATTACATCATTTTCATCTGAATGGTTTATTTCTT
ATTCT

MARCADOR 39492 (SEQ ID NO: 69); T→C

CTTCCCTAGCTATGCCTTTTCGTCACTTAAGCTTCNNNNNNNNNTCTAGCTACGTAT
CGTTATCATTTATGCTTCTTTAGCTACGTTTCTCCATCATTTATGCTTCCTAAGCTACG
TATCTTCATCACTTACGCTTCCCTAGCTATGTCCTTTTCGTCACTTAAGCTTCTTTGGCT
GCGTGTCTTCATCATTAACTTCTTTAGCTACGTATCGTTATCATTTACGCTTCCTTAG
CTACGTCTTTCCATCATTTATGCTTCCCAAGCTACGTATTTTCATCATTTATGCTTCCT
TAGATA

5

MARCADOR 42291 (SEQ ID NO: 70); G→A

GATCTTAAATTCTATGAACTTCTTCTGCATGGTATTGTTTCCAACAGAATATAATGA
CAATAGCAACAGTATTGGTTATATAAAAATATTGACTGCAGCAGGATTATATTTCAAGT
TCTTTTAATTTCAATTTATTTATTTCTTTCAATTTACTTTTACTGTTTTTATGTTTTCTTCTT
AAAAAATATGATTTCTCTCACTGTTCTCTTTCACTATCTATATTTATTTGATAATTGCT
TATATGATAACTAGCTAAAGGGAAATAAACTTTCACTCATCATAGCTTCATTTTAGTAA
A

MARCADOR 42411 (SEQ ID NO: 71); A→T

CTATACTAATCAGTCCACTATCCATTTT TAGGTTGCAAAGTTGCAATGACGGTTTGAT
TTCATCCTCCAATGCAATTTTGAGTCTCAATCTCGAGAGATAGATCGATCGCTTTTAG
CTTGATTTAGCTTGGTTAATGTTGTGAGGGATATTGGGCAGAAATTCTGTCAAGCGTT
ACTTAATGAAATAGTAAATGATCACTGATATTTATTGTTAATGATACTTGAGCTCTCTA
GATTATGAACTGGAAGGTTTTCGATAGAAATAATCGATACATATATTAGAATCGACTTC
TTTTTTC

10

MARCADOR 45689 (SEQ ID NO: 72); A→C

TCATCTTTTTCACATTTCAATTAATCATCATTTTATCAATTCCTATTTTAAACAAATTCT
TTTCAAATATTCTCTCTTTCTCTTTTGTGTTTCCGCTTATTCATTCTAATGATGAA
CAGATGTAGAAAATTTGCATTCTATTGCTCACTACAATTTTGAGTAGAATATATTTAAT
TATTTGATTCGAGACAGATGGTTATAGCCTTTAGCTTCAGCTTCTCGTTCAAATTAAGT
ACTTGTGACCTTTCCAAGTACCATTAAAGCTTTCTGCGTTTCTAATTAGAAAAAAA
GG

MARCADOR 45719 (SEQ ID NO: 73); G→A

GCATTTTAAAGTTAAAAGTATCACGCTGCATGACACCTCACGTTTGCTATCTCAAATTG
AGTAGGTTAGAATCTTTTTTGGCTACTATTCAAATATTAATAATAAATTGCTGCAAAC
AGATTTACACCCGGAAAAAATTAATTTTTCTAGCAATGTTTTAACTCCCTTATTAAT
ATTTATAGAAAATCGACTACTTAAAAAGAATTGACTAACATTTCTGAATCTCTGCAGAG
ATTTATAGATGGATTAGCATCCTACAAGTTTTTATCTTTTTGCTATATTTCCATTATTT
TTTA

MARCADOR 46063 (SEQ ID NO: 74); T→A

GATAAGACGTCTTATTTTGTAAATAATTCAAAAATTAATTAATATAGAAGTAAGATCTTGA
TAATAATTAATATGCTCAAATTTCTTAATGAGAATATGTTTCAGGATGAAGATGAAGTGA
AAGAAATTGATAGATTGAGGAAGCAATTGCTAATTGAAACAGAACAGCTCGTTTCCAA
TTCTCTTAAAGATTTACTGAAGAAAATTTATTATCCACTTGAAGAAGCTATTGATCTCA
AAATTCATCAGAAATTAATTCAACAAATTGCTGCCTTGTTGAAGTGTATTAGTATCTTG
GATAA

MARCADOR 47481 (SEQ ID NO: 75); C→G

ACCGCAAAATACCTAAAAATTTCTATAACAACGATTAACACGGCCTCGAACTGGAAGC
ATATTAATCCATGCGTGGCTCAAACCTTCAATCATAAAGACAAGATCTAGAGATCAACA
CAAAATGGTGAATTGTTACCCTATCGTTGCTAAAGTTTGAGAGAAAAAAGTGCTAAAT
CAAGTAGTACACCAAATTTAGTTAATATTAAGAAATCAATTTAGTACTGAATTTAAACA
AATGAAATTTTACGATAAAAATAAAAAAGTACCTGATCAAACAGCGTCCTCCCGTTATTC
CCATTGCT

5

MARCADOR 47722 A (SEQ ID NO: 76); C→T

TATAAGACTAGTAAACAGATCGTAATATAATAAATATCGATTTTTATTTTAAATTTTCGAA
AACTTCCAAATCTATCGATATGAAATTAAGATCAATTTTTAATTTCCATAATATATTTA
GATTCTATCCCAACATCACTCATCTTTATGICAACCTTATTTAATTCTCTTATTAACATTA
TATTTCTTGTTTACAATGATAAATTTTATCAATTTTCTAATATGATAGAACATCTTCATC
ATCTGAAGATATGCTTTTCTCATCTTTGTAACAATTCGTATCGCTTCTGATTTTACTTTC

MARCADOR 48750 B (SEQ ID NO: 77); G→A

GTTTTATTATTGCTTATTGAATAGTGATAATAACACTTTGATATGATATTGTTTTGTTGC
GATCATTGTATTGATTATAACCTTAATTAAACGAGGATATTATGGGAAATGTATTTATT
ACAAAATTAATATGAAAGGTTGAAGTCTTGACGAACTTTCAAACACATTTCTCGAAT
TTTCTCTGCAAAAATATCGTTACGATTTTTGGAAATTATGAAGTCCAAGAATTCAATCG
AGAGTTCGCCATGTCACCTTTGGCTAGTTTCGTTTGTTTTAATATTTCAATCAAAGTC
AATT

10

MARCADOR 48750 C (SEQ ID NO: 78); G→A

CCTTGGATATTGTTCTTGACATCGTTGATCAGAAGGTCACCGTAGTGTTCCGGTGAGC
GAGATGGAATTGGACTCAGGTTTATTCTCCGTTTTTTTCATGTTTTTGAATTTTAGAGA
GAAAATAATGTTTGTCTGAATGGTTAGCAAACCTAATTAGTTTTTAAGTTATCAGGAAC
CGAAGTATCTTCTTTTGCATTTCTTTAACCTTTTTTCATCAAATTTTTTAACAGTAACAAG
ATTTTTTTGAGAATTTTCAAAATATTTTTGACTTCTGATGATATTTGATGAGAAAACCAT
CACTG

MARCADOR 48790 (SEQ ID NO: 79); A→C

[illegible]

MARCADOR 49731 (SEQ ID NO: 80); T→A

TGGTATCACAGCACTGGGTTTAAATTTCAACAATCGGTTGACGATCTTTTCGGGATATG
CCTATACCCAGAAATGAACGTATGCCAAACGATGGTATGTTTGATGCAACAGACGAC
GTCAACTTAAAATGTGTTTTTTTTTCAAAAATTCAATATTTTTAGTTTAAAATTGCACGT
CAGTAAAAATTAATTCATAATAAATCTCTTTGATTTCTTCGTTCTCCTTTTTTTTTTCAGAA
AAAATTGAAATTTTACATACCTGATTTCCAAGAGCATATAAAGCATCACTTAAAGCATT
CTGCGA

MARCADOR 49824 (SEQ ID NO: 81); T→C

TCCTTTTCATGATTTGTAGCTAACCAATAAGATGTGTATATGTTTCATATATTTACTCTC
CCCTGACTCTTTTACACTCTCATTCTCTCATTGTTCATTTAGATAAGTAATATGCGCC
TTTCTCTTCCTGATTCTCTCAATCTTTCATCCCTTCATCTCCTCAATCTTTCTCCCATTG

TCTCAATCTTTCCTGCATTGCATTGATGAAACACGATAGTATTAATAAGCATAAT
TTGATAAATTGAAATAATTTTTTTNNNNNNNNNTCATTCTCTCAATCTTTCCTGCATT
GCA

5

MARCADOR 49904 A (SEQ ID NO: 82); A→G

TTTGAATTAACAAAATATTAACAATTACAACATTTTCGGAATTTAATTTAAGAATAATTT
AATTAATCAATTTCTATTTTGTATTTTAAAAATTACCACAATAATTATGTAATTTTTGG
GATATTTGAACTTTGAAAAAAGTGGTATTGATTTGAGAATAAATTAATTAATGTAATT
CTTGCTGCTCATCGTTCCATAACTTACAAATATTTCTCGGTATTTTATTTGAGATAATT
CTTATCATTTCTTCCATAGCTTTCAATATATTTATAACTTATTTGTAATCACTCTTATCA
C

MARCADOR 50378 (SEQ ID NO: 83); A→G

TTGAGATATCAAATCAAGCGTTGCATATTTATAGTACACTGGTGTAGCTGAAATCGCG
AAGAGAACACGAAAATCAGAGAAGTCAATGGTTCCTTTGTGTTGGATTTACATGAAA
GCATCCTTATGTTGTACATGCGTGATTACAATATGATACAAGATGTAAGCTAAAAATT
GTTTTATCTTTGTCTATGAGATGTAGTTCATACTCTATAATAAAGTCCCAACCCTTAAT
TCTCATATTCACAACCGTATCAGAATCCAACACCAAACCATTATAAAGAATGTTCTTCG
TCGAGGCG

10

MARCADOR 51565 (SEQ ID NO: 84); C→T

CCACTATCGCTTACACTTTTCTTTATCCTGTTCTTCTTCATCTTTGTTTTGGACTTTATT
TTACTGTCAGGTGACAAGCAAAGTAACGATGTTGGACTTTGCGAAGATGTGGATGGT
ACGCTAGAAAAAAATGAGGATTGGTTAATATGICTAATTATTACATCGCTTTTTTTTA
AATCTTTTCTAAATTAAACTGAATAATCAACTTATTTGCTATTCAGTTTATCTTATTTTT
TATCAACAAAATTGAGGAAACAAATCGCTTATCAGAATAATTGTTTTGATCAACAAAT
AAAG

MARCADOR 58162 A (SEQ ID NO: 85): G→A

CAATCCCACAAATTCAGTGTGTCGGCGGGTCAGCGAAGGGAAAGTTTGAACCGAGG
GTATGTACAAATTGTGATAATTTTGTGATGACGTAGTAAATTTTCATAGTTTTGCATGCT
TTAATGTTGATAGTCGCACAATCCTACGTTGATTAAATTTAGCTATTAGATATCCTACT
AAATTATGTTGTTTCATAATTTTTGTTTTTAAAATGCTCCACTTATATTTTCAGGTTGTGC
AGTGCTACAATAGGGGTTATGACGGCAATGATGTCCAATGGGAGTGTAAAGCGGAAA
TGAGCAATC

MARCADOR 58864 (SEQ ID NO: 86); T→C

TCAGATAAATTGTATTTGATGTTAATTCAAAGAAGAAAAAATAATCAGTAGAATATGA
ATCGAATAATATTCATACAACCAGTTTATTCATTATTATTCACTTTTAACGTCTAAATGA
CGTAGCTACGCTTTTTTCTCGCTTTCAAGCCTTTACTGACCAAGATTAATGTACATTC
TGTTGAACAAGATTAATCGACATTCTATCGATCAAGATCAAGCTTTTACTGATCAAGAT
TAATAATGACATTCTTCTGTTGATCAAGATTAATCGACATTCCATTGATCAAGATTAAT
CGAC

MARCADOR 62666 A (SEQ ID NO: 87); G→A

CTCTCTAAACCTATTGGTCACTAACTTGCACTGACTAAAACTATTGGTCATCAGA
CTTGTGATTCATTGAAAAGACCGTTAGCCGCTAAAATTATGATTCATAAAAAAATCT
ATTGATCATTAATCTGTAATCATTGAGAACTACAATCATTGGTCATTAAGTTTGTGC
TCTCTAAACCTATTGGTCATTAACTGACTAAAACTATTGGTCACTGAACCTAGAGT
CTATTAATAAAAAAATCATTGTATCAATAAATTTATTGTTTACTATCAAATCCATTGATT
ACTGA

5

MARCADOR 62666 B (SEQ ID NO: 88); A→T

TCTAAACCTATTGGTCACTAACTTGCACTGACTAAAACTATTGGTCATCAGACTT
GTGATTCATTGAAAAGACCGTTAGCCGCTAAAATTATGATTCATAAAAAAATCTATT
GATCATTAATCTGTAATCATTGAGAACTGCAATTCATTGGTCATTAAGTTTGTGCTCT
CTAAACCTATTGGTCATTAACTGACTAAAACTATTGGTCACTGAACCTAGAGTCT
ATTAATAAAAAAATCATTGTATCAATAAATTTATTGTTTACTATCAAATCCATTGATTAC
TGAATA

MARCADOR 7060 (SEQ ID NO: 89); G→A

AAAATGTATCAAATTCCTTCGATGCCATAAATTATACAGACTTGATTGGCATTTTTTCTA
ACTTTCATCATGAACCATTCATTTCTAAATTGATCCATTACAAAATCAACTTTGTGATA
TCATCAATCTCAGTCATAACGAGAAATAATGATAATATAAAGCGACTATCATTTGAATT
TCCTGAATATTCAAGATGTAATTACATCTTTTTTTAATGTAATCAAATTTCTTGCCAT
CAATAATTTTCAACATATGCTTTCATCGACTGCCTTATGCAGATCGTAATGATGACAG
CCA

10

MARCADOR 12056 (SEQ ID NO: 90); T→C

ATTGATTAAAAAGAATCAACATTAAATTTTTGATATAGTCGAGAAATCCTTCGTGATAA
TTCTTTTAGAACAAATCTTTACACTAACTTGTATTTACTTGCTTATTATTTGTCTAAAG
ATACTAACTATTTGTCAGTGGAATTTATGATCTTGGCATTATTGCATATAACGCTTTCC
TAAAATCTGAAATTTTTCAGTATTTTAAAACTAAGACGATTATTAATATTACTCAAAG
CTTAGAACTTTGATTATACTAATCAAATCAAAAATTTTCATCAGCGATTTTTGTTGTGTC
ATT

MARCADOR 16261 (SEQ ID NO: 91); T→C

ATTTTTTCCAGCAGAATTGTCATCAAAAATCCCATTTTTGATATCCTCTTCATCGAAAC
TTGCTCCTGAATCCAGAGAACAACGAAGAATGTGTAAATCTATTTTCAGTAGCCTGCTC
ATTGTGCAATTCAGCGACTTTATTTCTGTGCTTCAAGCTAACTTCTTCATTATGCCACT
CCTCTTCTCTCGCTATTTTTTCGCTATCTAATTCAAAATCTTCGTCTGAAACGGAATCA
ACTCCTGACGATGTACTCGACACTGATAATATTTTCATGCCGATTTTTCTCTCAAACG
AATCTTT

MARCADOR 23195 (SEQ ID NO: 92); C→T

GAATGAAGAGCAAAAAAATAGTCACGACCACCTGCAATAAAAAACAGCATCTCCGTAA
AAATGATTGAATTGATTCCCGAAATACGAGTTTATCAAATTGAGAATTATGCAAATTAA
TTATCAGCATGCAGATTTACTGATTTTATATCTCTCATACCGAAATTAAGGTGATGTTT
TCCATTTCTTTGTTTCCACAATGTCTTCTTTGTGAATCGTTTTGGATCAACTATTAATC
CGATCGAATCAATCCTCCAAATATGAGTTTATTCAACGTAACAAAACATTGTCCGAGA
TAATCAAA

MARCADOR 28579 (SEQ ID NO: 93); T→C

TGGAAATTTCGAAATCGAAAGGATGAAGAAAAAGGATCCTTGATCTATACATTAAATA
TCACCATATCAACTAGCATGGCAAGTCAAAGTAATGTTATCATTTAAATAAAAAAGATG
AATAGTAGGACTACAGGTTATATTGTTAAAAAGTCCGACAAATTTGGAGTAATTGACAGA
GATCAACGATTAAATGTAATGGATGATCTTATCTTCTTTTTCAACTACGCCAAAATGA
AAATAACAATTGAATTTGTGGAATAAGAACTAACATTTTGAAAATAAGATTGAACATT
TATAAAT

5

MARCADOR 48869 (SEQ ID NO: 94); G→A

GGTTGGATCATTATCGACAGAACTTTAGAAGTTTCTTGATAAGGACGAAAAGAAGCAG
CACCATTGCTGATCTAAACAAGGAAAAAAGACCTTTTTTGAATATTGAAGTTTTTACT
GATAGGTGCGTGCTGTGTACTGTGGGCATAAGTACAAGCTTCATGCTCCGCAGCGT
GAATACGTGCTGCATGCATACTATGCAGTAAAGGTGCGTGCTGCTATTGCTCAATAAG
TGTATAAATTGCTGCTTTTCTTGATAGTTAAATATTTTGTTTTCATTTTTTCCGCTATT
CAAAATAAAT

MARCADOR 53021 (SEQ ID NO: 95); G→A

GTTGGGATTTTCAGACTCTCACTCGGTGTGCTTTACAGTGATATCTGAATCGAAGTCA
CAAGCAGGTATGAATGCATAACAATAATCCATTGCAGAAACAAGGCAAAACTGA
GAAGCTCGAGCAATATAGCTATAGAAGCTGGTACCACAGATGACATTACATGGTATTT
CCATTTTCAGCTTCACAAACATTGTAAATAGCTTGCTTCGATGATTCAATATCTCGTTCT
ACGATATTCTTAAAGTAATTTTTATTTATTTGAAGTATAGATTACATCCATGTTCTATCT
ATCATTTT

10

MARCADOR 7986 (SEQ ID NO: 96); G→A

TGTTCTGAACATCTCTTTTTGATTATCTTTTTTAATTCCTCCATTATTTTCGTTTTTTTCG
TTGTGAATTAATATTGTTTGTCTTTGATTTCAGATGATATTTTCGGATCGTAAATAGATG
GCATCGGCATAAGCGTATTGAGAAGCATTCAATGGTGCACCTCTTGCTTCTTTTTTTTT
TGAAATCTTCTCGATAATCAAATAAGTGCAGGATGCCAATCATTAACAATTTTCGTTCC
ACTTTTTTCAGTTCTTATTCTTATAACACCACATCTCATTTGCAATTTTGTGCGCAATGAT
TTT

MARCADOR 48094 (SEQ ID NO: 97); C→T

TTTTTTCGAGGTCACTCTGGAAAAATAAATCATATTTTAAAAAGACATAAAATAAAAA
TATGTATATATAAGAAAATTTTACTCTGAATTTCTTAAGAAAATTCTCGATTCTGTTTT
CCATAAATTCGGAATATGTTGTCCCTGAATTAAAGAATTGATTCTTGCACACCATT
ATTTCTGTCTAGTTCTGTGTGAACAATGTAACCTGGAAATGAACACATAAACTGTAAT
ATTTTGAGCTTAAATAATTATGAGGATGCGAACTGAAGATATTCATAAATGTTTAA
AAAAA

MARCADOR 6568 (SEQ ID NO: 98); T→C

GTCCATGCATTGCTTTTCGGAAGTTAGTGTAGATTCAAGTGAATATTTAATACCAGTCT
CTTTCTAATTCAAAAGAGCCTCCCATTTCTTTTTTCAGTTTCAGTCTCTGAATCAGAGC
GTGTAATCTACCACTCCATTGCCGAAAACAGCTCGATGTATTTCTGCTACGTAGTGT
TTAGAATTGGCGTATGCCACTTGCTCATTATTCGCGCATGAAGTGTAACTGTGAATAG
AATGATACTACTGTTAGAAGAGAATGCGTTCACCTTTATTTAACATTATACTGATTCATT
TCTTCTTT

MARCADOR 17022 (SEQ ID NO: 99); C→T

AGTGAACGAGAAAAAACAGAAGAAGAGATAGCACATCAAGATCGTGAGAAATTAATT
AGACAAGAAAAAGCTCGTCTTACACAAATATATCAGGTTTTCTTTTTCTTGCTTTTGAA
AGTTATTTGAATTATCTCATTCTTTGAATTTTAAGAATAATTTAATTTTTTTTTGAA
ATTTTGCTTATTGAGCTCTAAATTTTGTAAGGTTTTCTAGGATGATGTTAGCAAAGC
AAAAAGAAATCCAAAAGTGATGGTAACAAACAGGAAGATTTTATAGTGAGGTACGAT
AATACG

5

MARCADOR 55751 A (SEQ ID NO: 100); A→G

TAGACAATATCATCCTTCCTTTTTTTTTGCTCAATTTCTCTGCTCATTGCTTTGATGATA
ATGGTAGGTGGTATAATGAAACGAATAGATAATTGATGTTGCGCAAACATTTGCTGTTA

AATTTTCAGTAAAGAAATTGACCTTTTTGCTTTGTGTTGGATGTTTAGCTTCATTTTCTT
CTTGTTCAATTGTCATATTCATTCTCTCAAACTTCTTGCTTAGCGATGCTAATATAAAT
ACTGGAAGAATGCCTTTGCTTTGTTTTAGTTGTAAATCATCACCAAGGTATTTTTTGC
AAAT

MARCADOR 55751 B (SEQ ID NO: 101); A→G

AAGATGAACTAAAAAAATTATTTGAAAAAAGAAAAATAAATTAATGAAATAAAAG
CAAAAATGAACAAACCGTATTAATTTTAAACAATAAACAATATCGAAATCGAAAAATGG
ACTATTATTGATGAACTATATTTTCAAATGTGAAGGTCAAAGTTTGTTTCAATTATG
ATAAATACAATTTAAATAAGATTAAGCTAACAAATAAGTTGAGCAAATTGATGAAACA
AACAAATCAGAATATATTACAGAAAATGATATAACATGAAAATATATTAGACCAATTAT
TTTTA

10

MARCADOR 15893 (SEQ ID NO: 102); T→C

TTGAAGTTTTTCAGATAAACTTTGATAAAAAATTGTTCTATGAATTCTCAAATTTCAATTA
GTGATACTTATTTTGAAGGTAATTATGCCTGATTGAATCTTCAATATCAACAAAATGAA
AATTTTAGTATGATTGTTAACTCATACACCTCTAATTAAAGGTATTTTCTTTATCCCATG
AAATGAAAATTTATTAAGAACTTAGAAAGCTACGGTATGCCTTTGATGCAAAAGAAAG
ATTCATTTTCATTAAATCATGTTTAAAAAAAAGAGCAAAGAGCAAAGGTGATGAAAGT
TTTT

MARCADOR 25462 (SEQ ID NO: 103); C→T

TTCTATACGAAATATTTGTCTGCCATAAATCTACTCAGGAACTCGATACATCAAAACAT
AAGTACGCTTGCTCTTTATTTTCGTTTGAAAAATAAATAGATCATTTTCGCACTTACA
TTTCAATTTCAATTGCTTTATTCATATCTTTCTGTTTTACTTACTGGTATTTAACAGTC
GTTGTTTACAATTTAATGATCTATGAAACACCATTTAATTGTATTTGGACTAACTTTTC
GACAAGCAAAAGATTAAAATTGTCTTCAGATACAGTTATAAATTTACATTGAAGATAAA
TGAA

MARCADOR 33494 (SEQ ID NO: 104); A→C

TAACGATCTGTATATCAATGGAATAATATTCAGTTCATGTTGTTACTCGATATGAGATAG
AATTACAATTTTGAACAAGATAATCTCAACAGCTATTTTCAAGAATAGTTAAATTAGG
ATACCATTCAAAGAACTTTAAAAAATGATTTCCATACATTAATGCTTTTTGTGTTTTCG
CTCTCGACCAGAATCCAGGAATTGTCCATTATCATCAATTTGATTAACCTTTTATCTTTA
TTCTAATTCTTCAACATTTCTCTAATTGATATTAGTTTCAATATTTTAATAAGTAAAAATT
TA

5 MARCADOR 17935 (SEQ ID NO: 105); T→C

ATAATGTGTTATTGATCAAAGGATTTTTAGTTACCTACCAGATGGAAAAAAGCAAGTT
TACGAAAACAGAAGTTAGCATCAACTTTTCATCCATGGTTACACCGTATATAATCCAAT
CGACTCATACTTTATGTTGATCTGATTTTATAGCAGATAACTAGTTACCTTGCTCAGCA
GCAGCTAAATCCTTTCTATTTGCTTAATAACAGAAATATTTTTCATTAACAAAGAAATTA
TACTCCGTGTTTGACATTTTCATTTTAATTTGTTCCAAAAATGAAAAAAGCTTCGTCCG
GAAAT

MARCADOR 48561 (SEQ ID NO: 106); C→T

ATTATTTTGTAGTTTTTTCATTTTTTAGTTCAATTTTCCTTTGCTTATTTTAAATATGCCAT
TCTTTATTCAGACTCATAGCGAATGCATATGTTTCAATTTTTTTAGTTACAGTTACAA
ATTCTCAATTTCTCTTTAATCATTTTTTTITCCAAAAATAGTCTGAGCACTCAACCATT
ATTCAACAATTGCAGCTTTTTTTTATTGGAGCCTTGTCAAATTATCAATTCGTTTCCATG

TTTATTATTGAAATAATAAACGGTATTTAGGATAACGAAGTTCGCTTAGCTTCTTTGAC
T

MARCADOR 42003 (SEQ ID NO: 107); T→G

AAAAATTCAGGTAATGAGATCAGTAATTTTTTTTGGTCACTTTGCTGTTTCTTATCAGC
TCATTGTTATCCATATCAAATGAGCGAAAGTGTGTATCACATATTGGCAGAGTGTAAT
CTATGAAGATTTTGCATATCAAAGTAATTATGAGAGAACTGATAATTTTATTTTAAAGT
AGTAGAAAACCTCGAATTAAGCTAATAAATAATCGGTTGATATCCATGAAATGAATTACT
AATGAAATGGATAATTGAGTAATAACAAATGATATTCATGAAGAAAGGCAGGTTTTTTT
TAATAG

10

MARCADOR 29566 (SEQ ID NO: 108); C→T

TATACTTAAAACAAGAAATACAATTAATGCCAATAGCAGAGTGAAACTTCTGAAAAATA
ATGAGTTGAAACTGGTAAAATTAACATTTTATTAGAAATTTGAGAACTTATGACTCCT
CATGGCACTATCACAAAATGTTTGAAAAAAATTGACAGCTCGCGTCGATTGCAAAAAT
CATGATTCCTGATATTTAGTATCGAACATGTGACAAATAATATAAAGACCTAACCATAA
AGCACTGAAACAACCTCGCGGAAACAAAAAATTAATTTGCATAAACACGGAATACGATC
AGAAAAT

MARCADOR 33868 (SEQ ID NO: 109); G→A

GAATTTTTTTTAGAAGGCTTGAAGTCGAGAATATTAGAGACTATATCGAAGACTTAAATA
ATCCTGGTAATCTTCTGTATGAATCAAAATTACCTCGAACAGAACCATTTCAGCACATC
ACGAGATAATTCATGGAATGAACTAGCCAATCAGAGCGTTGTAAAAGAAGAAAGTTA
TGAAATGACCTTAAATCAATTTAAAGCATGTCCTCGCCATATAAGCGTTGAAAAGTT
AGGATAGAATCAATTATCAAAAAAATATGTTAACTAGATCTTATCAATCAAAACATCAG
AAGGAAAA

En otro ejemplo, los marcadores genéticos de *D. immitis* incluyen las siguientes secuencias (las SEQ ID NO: 110-127), donde los nucleótidos subrayados (es decir, los sitios polimórficos) indican la posición del nucleótido de SNP dentro del fragmento que se correlaciona con la resistencia a las LM (es decir, el nucleótido alternativo). Los marcadores se identificaron después de la comparación de las frecuencias de genotipo entre individuos susceptibles e individuos resistentes a la LM confirmados. En estas secuencias, el nucleótido subrayado en la posición de SNP es generalmente distinto del nucleótido encontrado en esta posición en organismos que son resistentes a las LM (tipo silvestre). En las siguientes secuencias, el nucleótido en la posición de SNP en la secuencia indicada correlaciona con la resistencia a las LM. En el encabezado de cada secuencia, se muestra el cambio de nucleótido del nucleótido de tipo silvestre al nucleótido alternativo (el nucleótido alternativo correlaciona con la resistencia a la LM) en el sitio polimórfico.

MARCADOR 31307 (SEQ ID NO: 110); A→G

ATATGATAATAGTGAAACAATTCCATCACAAATAATATTATCGATTAGGAGATAAATTA
ACATTGATGCCTCAATTTTGGTCAACAATATATATTTGCTATTAGCATTTTTATTAAATC
GTTTTTATCTGACTTGACATAAATTGAAATAGAAAAAATTGAATCTGTTCCCTTGTTAGA
TTTTCTTCTAAAAATTCTTGAAATACAAATAATTTCTTAAATTTCAATATTTCTACATAAT
GTATTGCGACAAAAATGCTAATGATTGGCTTATTATTATTTTGAATAATTTTTTAATCAA
A

MARCADOR 26225 (SEQ ID NO: 111); A→G

AGCTCGAAGATCGGACAAAAATTTGTTTCAGCTTGTTGCCTTGAGGCTTTAGTCTGAAAA
GACACTTAAAGTATAAACAATTATATTCAAAAAATCTTATTTTGCATTTGCGTCTTAA
TTTTTGCTTTTGGCAAAGTTTTTCCGAGCAAGTTTTTCTATCTTCGAAAAGATTATATC
AATTAATAATTTCAATTTAAGCAATCATTGCCTCTTCGAGTTTCTGTTTCAGCAAATAAA
TATCACCACCACGACGCTGTGCGAAGAAAGAAACGCCTTTCCCAATTTCTCGTCTCA
ACTTTT

MARCADOR 47722 B (SEQ ID NO: 112); A→G

TAAGAAAGCTGGGAGATTTTCCAAAAACACTATTTCCACGATTTGTTGTTTTCTATGA
TCAATTCTTAATCAAACCTCTGAAATTCTCAAATTTTCGATTTCTATCCAACCTTCTACATA
TTTTTTTAGAAAATTCATATTTAGCAAAGCTGAGTGTAGAAATAATTCATACTTGCAATT
CATTTTTCTTAAATTTTGAATTTCTTAAAAAAGTATTTCAAATTACCTACCAATTTTGA
TTGGAAAATTCGTGGATGCTAAAAATTCAAATCAAATAGTTAAACAGTATTCTCTAATT
GT

MARCADOR 58162 B (SEQ ID NO: 113); T→C

AATTTAAAAAACACATCGACATTTTGCGGTACGGTAATGATTGTTTACAGTAACTAAAT
GTGTCCTACGGTAGTAATACTCGTGTACGTAATGAATGAGTATAGTGACCGGATATTT
CCTTCACTAGTAGGCAATATTAAGAAGTATTTTCATTTTCATATTCTATCTAAAATAAAC
CGATAAAATGGTTTTTGAATTATTCTTTTCAATTGTTATTTTTTGATCCTAAATTGTAA
AATACTGTAATAATTTAGCTAATTTCTATGATTCTATTCAATATGCTTAAATTAAATTC
TAA

MARCADOR 17709 (SEQ ID NO: 114); T→C

TCGTATTTGTTGTATGTAATATAGAAATATTGTTTAAATTCAATATGTAGAAAAAATTC
TANNNNNNNNNNAATTAATTACATATTA~~ACT~~CGTATTTGTTGTATGTAATATAGAAATA
TTGTTTAAATTCAATATGTAGAAAAAATTTCCATAATAAAGACGAACAGCATTTATAATT
ATCAATGATAAGTTGAAATTAATTCATCAATGATAAGTTGAAATTAATTTATTTGAAATA
ATTTCTTTGAAATTCGAATATAGACGAGAATTTTTTTTTTTTTGCTAATCGTTTATCAAA
T

MARCADOR 47141 (SEQ ID NO: 115); T→C

TCTAGCAATATAAATTACAAGAATATGCCGTCCAAGTATTTCAGAATTTATTATTAATTT
GGATAATAATACATTGTAAATACTGCGTATTCTGGATTATTATGCACTGCATAATAACA
TGCAATTTCTGCTACATATCGCGAATAAACGCCAAAAGATTTCTCGATAAAAAGAAAAT
ATAAGAATTCGTAAATGAATGTTGTGTGTCAGAGATATGTGTTAATTCATAAGTCAAGATG
TTGTAATCGATCCATATTAGTAATCATATTTACGTGCTCGTAAATAAAAGCGGTGATT
CTTGT

MARCADOR 48750 A (SEQ ID NO: 116); A→G

ATCGAAAAAAGATGATCTGATGACGGAAGGCGAAATGTCTGCAGAAGCTAAGATGAC
GGAAGAAAAAAGTGAAGAAATGAAAGAAGAAGCTGGTAAACTCAGAAGGAATGTAA

AACTGGAGAATCGAAAAAAGATGATCTGATGACGGAGGGCGAAATGTCTAAAGAAGC
TAAGATGTCGGAAGAAAAAAGTGAAGAAATGAAAGAAGAAGCTGATAAAACTCAGAA
GGAATGTAAACGGAAGAATCGAAAAAAGACGATCTGACGACAGAAGGCGAAAAATC
TGAAGTAGATGAGCC

5

MARCADOR 63962 (SEQ ID NO: 117); A→G

ACTAATGATAAGAAACGGAGCCGACGATTTTAGGAAATGAATAATAACGACATTGACA
ACCATTGTTAGAAAATTGATAGTACTGATAATAAAAGCTAGTTATAGAAAATTGATAAT
AATAATAAAATTGCTGGTAGCAAATGTCTAGAAGTGATAATAAAATTAATGATAGCAAA
TGGATTAGCAATGATAATTA~~AACT~~GATGATAGCGAATGGATTAGTAATGATAATAAAAT
TGATGATAGCAAATGACTAATAATGGTAATAAAAGTTAATGCTAGTGATAACTTGTATT
TTAAGT

MARCADOR 6372 (SEQ ID NO: 118); A→G

ACAGTTTATAGTTACAATATTCTCCGGTGACTAACTGTATTTTACAACCTTATAATTATA
GATTACAAAATATATTATAGTAGTTTTATAATTACAGTATTCTTAAGTGAATAACTATAC
TTTACAGCTTACAGTTACAGTAGTTTTCTATGTTTTTGAATATTAATTTTACATGGTTTT
TCCTAGTTTTCAGTTTCAAATTTTTCAGATATTTTATGTGTTAAAGCAAATTATATTCGAG
ATATAAAAAGTACTGGTCATATCTTACAATTCTCATCCTTCTATATTGGAAAGAATTGA
GT

10

MARCADOR 15611 (SEQ ID NO: 119); T→C

GTATTGGGACCGCGTATCGGGAAATCTGAAAGAAGTCTTTAACAGTATTTTAAATGAA
TAATTCAAATCGTTACTTCTTAATATATTAATTTATGCGTATATATGCAGTACATAGCAT
TGCTTAAATTCCTATTTTTCCGCGGTTAAAC~~CC~~TATGTAAGATAAGGGAGGTGATTG
TATCTGCGCCGTA~~CT~~CCTTGTTTTAATCTACCTGCTTGTTGTATATCCTCCACATATTG
TAACTGCAGCTTCACATTTGCATATATAGTAAGGGCATCGTTGTCTCCAGAAGAGATA
TATTATC

MARCADOR 46432 (SEQ ID NO: 120); T→A

GCTGCCCGAATGTTACAATTAGGACGAAAGTAAAAGTAGTTGACTGTAGGTATGACG
ATAAAGGAAAAATTTGTATCTTAAGACTTTACAATTTCTAAATATTACGTGTTTTATCGT
GCTAACATCACGAATTCCATATTCACAAAAAAATTTTGTAGAACTCCATCTGTTTTGG
ATGAATTTGCTACAGTTGAACTGGATGATGGAACGAAATTGCAAACATCTCTTATTGT
TAGTATTTTCTAAATTCTGTGAAATTTTGCAACGGCATTGTTTAATTATTAATTTGG
AGAAAG

MARCADOR 29594 (SEQ ID NO: 121); T→A

AAATAAGCAAATCCGAAAGTATTACATATACGGACTAAATATTGCCATTCATTCGGGA
GTATACCATTGCAACCATTGGTATTTTCATTTGATCGAGAAAACTAGTTTTTGTAGTTTG
GGATAAAGAGAAATGGAGAGAGGAACTTTTCATGATCAATTTCTTTACGTACTGAAATT
CATTTCTATGGATGTTCTTTTCTATTTTCATTCTCCTCAGCAAATACAGTCCGAACAGT
CATCAAATAAGTCTAAAAGGCATGAATAATATAAACATCAGCAACTTTTTAAATGAATG
CTTATTA

MARCADOR 26784 (SEQ ID NO: 122); G→C

ATTTCTATAAACATCTCTTGCATTGATTAATTTAACATGTTGCAATAAATATTTCTTACT
TTTGAATGTATCATTTACTAGAAAAAATTTCAATCGAGGAAATAAGTTTTAAATAAATT
CATATTTGAATTCATGTCAGTTCAAAAATTTCTATTACTATAATACATGTCTCTTGGTTGT
ATCTTTTTTTCTTTTGAAATAATACAATCAAACGGTTTCCTAAATTTTCATAGACATCAT
ATTTTAAAAAAAATGCATTTGAAAATTTTCGAAAATCAATGAACTTAATTGATGAAAAA

5

MARCADOR 51661 (SEQ ID NO: 123); C→G

GCATGTGTATGTAGTATTTCTTTGTAAACAACATATCTAATCTGTCTGTCCCTTTAACA
TTATAGAATAGTCAGTTAGTCCGCTATTTATTTTAATAACAAAATATCTCACTTAACTTC
CATTTCTTTCTAAATAATTTTGTTCGCTAGATCTTTCTATAATTTTCAAATTTTCAA
AAATGAATTAATCTTTTATTTATATATGTGTATGTATGTGTATGTATGTGTACGTT
GCATATATGTATATGTATGTGTGTATGTGTGTATATGTATATGTATATGTGTGTATGTG
TG

MARCADOR 7819 (SEQ ID NO: 124); G→C

TATGCATAATGTGCGACCAGCCAATAATGTCTTCAAACCATAATTATGCAGAAATAAA
TTTTTTCCAGAAATAATTTTTTTTTTTTACATATACTTCCGATCTGTGAGAAAATACAT
TTGAAGTGAAGTGTGAAGCAATGCTACTTTTTCAAACAACATTGTGAAAATGGATTAA
AACGCACCAATGGAGCAAGAGATCGTAAGTTTCGTTCCGCATGTCCTGTGGCAACGT
GTAAACCATCCGTAAACGATATATGATGTAAAAGCCGACACACCCAAATTAAATCCA
TTATAAACA

10

MARCADOR 26704 (SEQ ID NO: 125); G→C

AAATGGATCGTATTCACCTTCGTAAGAACTTAGTGAACGAAAAATCAAACCATCACAAT
AACTTTACTTTTTTTCTTTTTTTTACTAAACACACTATCCTATGAAAACAAAATGTCCAAA
TAGATTCATATGATAATGAACTGTGAAGTTATCCAATCTATCAGTTCTCGAAGAGGGA
ATAAATAAAAAACATTAAGCAACCCACCGATCTTCGCTGACCATCTCCTTCTTCATTAG
CAAGAAGCAAATCTTGTGGTGATATTTCTGCAACCATCTGCAAAATAAAGCACGAAAA
ATTAAGGA

MARCADOR 14329 (SEQ ID NO: 126); C→A

TTTGATATGCAATCAACTAACC~~A~~AATCAGAATTCAATGCATTCTGATAAATTTCTTCAA
TATCGTGCATCAATTGACATCATATTTTGACAGTGATGCTACCTTTTTAGCCGTATTT
CGGAAAAATATGAATTCAACCAGCTGCGTCCC~~A~~AAATTTAAGGCTGTAGCAAGTCCA
GCAACAACCAGCCCTACAAC~~T~~GAAAATTCTAAAACTGGTTCACGTGCTTATCATTAA
TAATTTCAACACTATCACTATCTCCACATGAAC~~T~~TGATCGATTATAATTTAGTAGAACT
GAAAAAAA

MARCADOR 56169 (SEQ ID NO: 127); T→G

ACAAATTCGTTTTAATATTGGATTACATTGAAATTGCTGAAATAAAGTGGAAATATTGA
AAAGCATTTTACAATATTTGTTAACAACATTATATTTAAAGAATATACACCTTGGTTTAA
ATGGTAAAATAATCTCAAGAATTTTCATTAG~~G~~TTAATTTTTTTTTTTATTTATTTATATTAC
AAAAAATTGTAAAAGAAAACAAAAACAACAATAATAACGGTGACAACAACAACAATAAT
AATAACAAAAC~~T~~ATTTGTTGTGATTTTGCAGCATTGATGTAGTGGGGATCTTTTGGAG
CGA

- 5 Las frecuencias de genotipo para cada SNP (las SEQ ID NO: 110-127) en los sitios polimórficos se muestran en la Tabla 1. En un análisis, se compararon las diferencias de genotipo de individuos susceptibles con individuos resistentes confirmados. En un segundo análisis, se compararon las diferencias de genotipo de individuos susceptibles con individuos resistentes confirmados y con PDE agrupados.

Tabla 1. Las frecuencias de genotipo para los marcadores que representan las SEQ ID NO: 110-127

Locus de SNP	Susceptible % de frecuencia de genotipo			Resistente confirmado % de frecuencia de genotipo			Comparación susceptible/resistente confirmado		Resistente confirmado + PDE % de frecuencia de genotipo		Comparación de susceptible/resistente confirmado + PDE	
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	valor p		CC	CT	TT	valor p
MARCADOR_31307*			100,0 %	2,9 %	11,7 %	85,4 %	6,3E-05		8,7 %	8,7 %	82,6 %	5,7E-06
MARCADOR_26225*		0,7 %	99,3 %	1,3 %	48,3 %	50,3 %	3,7E-21		1,9 %	47,2 %	50,9 %	1,2E-23
MARCADOR_47722_B*	6,5 %	1,3 %	92,3 %	22,7 %	33,7 %	43,6 %	5,0E-20		18,9 %	23,5 %	57,6 %	2,9E-14
MARCADOR_58162_B	0,7 %	1,5 %	97,8 %	26,7 %	18,6 %	54,7 %	1,8E-16		30,7 %	14,7 %	54,6 %	1,0E-18
	AA	AG	GG	AA	AG	GG			AA	AG	GG	
MARCADOR_17709*	100,0 %			74,1 %	19,0 %	6,8 %	4,3E-02		67,3 %	17,5 %	15,1 %	NS
MARCADOR_47141*	100,0 %			56,7 %	43,3 %		4,7E-23		68,8 %	27,7 %	3,5 %	3,5E-16
MARCADOR_48750_A	100,0 %			54,9 %	28,7 %	16,5 %	1,3E-15		54,1 %	24,8 %	21,0 %	1,9E-17
MARCADOR_63962	100,0 %			87,7 %	11,7 %	0,6 %	1,0E-03		81,9 %	11,8 %	6,2 %	1,7E-05
MARCADOR_6372	90,2 %	2,3 %	7,5 %	20,2 %	49,7 %	30,1 %	1,8E-32		35,8 %	32,9 %	31,3 %	2,0E-26
MARCADOR_15611*	90,5 %		9,5 %	53,3 %	26,7 %	20,0 %	9,3E-14		47,7 %	15,9 %	36,4 %	6,9E-19
	AA	AT	TT	AA	AT	TT			AA	AT	TT	
MARCADOR_46432			100,0 %	0,8 %	15,0 %	84,2 %	8,2E-05		3,2 %	10,3 %	86,5 %	3,0E-04
MARCADOR_29594	1,2 %	8,7 %	90,1 %	12,7 %	32,9 %	54,4 %	1,5E-12		12,4 %	20,8 %	66,8 %	1,4E-08
MARCADOR_26784			100,0 %	16,8 %	7,2 %	76,0 %	1,4E-07		10,1 %	4,4 %	85,4 %	1,0E-04
MARCADOR_51661	100,0 %			45,5 %	39,4 %	15,2 %	2,7E-23		48,9 %	29,0 %	22,1 %	2,7E-24
MARCADOR_7819*	94,9 %	1,9 %	3,2 %	45,2 %	39,2 %	15,7 %	3,1E-21		53,6 %	23,5 %	23,0 %	3,1E-19
MARCADOR_26704*	90,4 %	4,5 %	5,1 %	70,2 %	27,4 %	2,4 %	2,5E-08		65,8 %	22,7 %	11,5 %	2,2E-09
	AA	AC	CC	AA	AC	CC			AA	AC	CC	
MARCADOR_14329	1,1 %	6,1 %	92,8 %	6,4 %	14,0 %	79,7 %	9,9E-04		17,4 %	20,4 %	62,2 %	1,0E-13
	GG	GT	TT	GG	GT	TT			GG	GT	TT	
MARCADOR_56169			100,0 %	16,0 %	1,3 %	82,7 %	5,0E-03		21,8 %	1,1 %	77,1 %	4,8E-04

Para los marcadores designados con un asterisco (), el genotipo indicado muestra el análisis de la complementaria inversa de las secuencias mostradas como las SEQ ID NO: 110-127.

Kits y procedimientos

En otros ejemplos, las sondas pueden proporcionarse a un usuario como un kit. Dicho kit puede contener una o más sondas. Por ejemplo, un kit puede comprender una sonda que tiene la capacidad de determinar el genotipo de un nematodo en una posición de SNP en uno de los fragmentos desvelados en el presente documento. El kit puede comprender adicionalmente uno o más reactivos, tampones, materiales de embalaje, instrucciones de uso del kit y recipientes para contener los componentes del kit.

Una sonda desvelada en el presente documento puede ser una o más moléculas que tengan la capacidad de unirse a, o asociarse con, la muestra de ácido nucleico para determinar el genotipo del nematodo en una o más posiciones específicas (por ejemplo, el sitio polimórfico) en los fragmentos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar sondas para determinar si un nucleótido de tipo silvestre o alternativo está presente en la posición de SNP de uno o más de los fragmentos desvelados en el presente documento. Un ejemplo de sonda puede ser una molécula de ácido nucleico u oligonucleótido. Las sondas de ejemplo pueden contener un marcador o marcadores. Los marcadores de ejemplo pueden incluir marcadores radioactivos, marcadores enzimáticos y/o marcadores fluorescentes.

Un oligonucleótido utilizado como sonda o cebador puede comprender cualquier tamaño, forma y composición que sea adecuada para su uso en el contexto de la invención. Preferentemente, un oligonucleótido de la invención puede comprender ADN, ARN, nucleótidos sintéticos, nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados o combinaciones de uno o más de los mismos. En una realización, un oligonucleótido de la invención puede comprender ácidos nucleicos bloqueados y/o ácidos peptidonucleicos.

En realizaciones de la divulgación, 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 otros ejemplos, un oligonucleótido puede abarcar, sin limitación, un cebador o más de un cebador, por ejemplo una pareja de cebadores, tal como un cebador directo y un cebador inverso.

Un cebador puede ser un oligonucleótido que puede usarse para iniciar la replicación del ADN. Normalmente, un cebador es un oligonucleótido corto que puede ser de 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.

Se puede usar un cebador como parte de un estrategia para detectar el genotipo de un nematodo en una ubicación específica de un gen. Por ejemplo, un cebador puede ser útil en la amplificación de ADN tal como mediante PCR, RT-PCR y qRT-PCR, para el análisis posterior, tal como mediante transferencia de Southern, secuenciación, HRM (análisis de alta resolución de la temperatura de fusión) o SSCP (polimorfismo de conformación monocatenaria).

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 disolución, una cadena de nucleótidos puede formar interacciones intramoleculares que pliegan el aptámero en una forma tridimensional compleja. La forma de ese aptámero le permite unirse fuertemente contra la superficie de su molécula diana. Debido a la diversidad de formas moleculares que existen para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, se pueden obtener aptámeros para una amplia variedad de dianas moleculares, que incluyen, pero sin limitación, moléculas de ácido nucleico, enzimas, proteínas de membrana, proteínas víricas, citocinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Una sonda de la divulgación puede prepararse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas por un experto. Por ejemplo, una sonda puede producirse de forma sintética, de forma recombinante o puede aislarse de una fuente natural. En una realización, la fuente puede ser una fuente biológica, por ejemplo, de un microorganismo (por ejemplo, una bacteria o virus), un animal (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, una cabra o un ser humano) o una planta.

En el contexto de la divulgación, "una sonda" puede significar una sonda o más de una sonda. En los procedimientos de la invención pueden usarse de forma simultánea uno o más tipos de sondas. El diseño y producción de sondas se conocen en la materia. En general, una sonda puede producirse de forma recombinante, de forma sintética o aislarse de una fuente natural, por ejemplo, de una célula, un animal o una planta. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que la producción de la sonda puede depender del tipo de sonda en cuestión. Una sonda preferente puede ser una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un cebador), con o sin un fluoróforo o colorante. Una sonda puede ser lineal o en forma de horquilla, con un fluoróforo, con o sin un desactivador u otro fluoróforo (por ejemplo, para el análisis por FRET). También podría ser un anticuerpo que reconozca específicamente la secuencia del ADN (o de la proteína). Otra sonda podría basarse en una molécula de ARN. Lo que se prefiera puede depender de consideraciones técnicas, la estabilidad, el coste, la facilidad de uso, etc.

En otros ejemplos, las sondas de la divulgación pueden proporcionarse a un usuario como un kit. Un kit de la divulgación puede contener una o más sondas de la divulgación.

Usos de los procedimientos y los kits

Los procedimientos de la invención y los kits para llevar a cabo los procedimientos pueden tener aplicaciones en investigación, médicas e industriales. La invención encuentra una amplia aplicación en el tratamiento de los gusanos del corazón en animales infestados y en la detección de nematodos de *D. immitis* resistentes a la LM en una zona. Las aplicaciones representativas y no limitantes de la invención pueden incluir la detección, la cuantificación y/o el diagnóstico de la existencia de individuos o poblaciones de *D. immitis* que no son susceptibles a dosis normales de LM para profilaxis o terapia. En una realización, la capacidad de detectar y cuantificar las moléculas de ácido nucleico de la invención es valiosa en la medida en que indicará a un veterinario en ejercicio modificar los regímenes quimioterapéuticos para animales infestados con nematodos de *D. immitis* que tienen un grado de respuesta reducido a las LM. La identificación de nematodos de *D. immitis* resistentes a la LM puede indicar a un veterinario cambiar de la terapia con LM sola a una terapia que puede incluir un agente alternativo o agentes alternativos, tal como un adulticida (por ejemplo, fármacos basados en arsénico), dietilcarbamazina, antibióticos tales como la tetraciclina y combinaciones de uno o más de los mismos, para lograr la curación y/o minimizar la propagación de la cepa resistente. Como alternativa, un veterinario puede ajustar la dosificación de una LM y/o un régimen de tratamiento que utiliza una LM, en el tratamiento de un animal infestado con un nematodo resistente a LM. Las tasas de dosis recomendadas típicas para los tratamientos preventivos con LM incluyen, por ejemplo, 6 µg/kg para ivermectina; 500 mg/kg para milbemicina oxima; 3 µg/kg (de forma mensual) de moxidectina; y 6 mg/kg para selamectina. Un veterinario también puede combinar una o más de las estrategias de tratamiento y terapias citadas anteriormente en cualquier combinación adecuada para tratar a un animal infestado con un nematodo de *Dirofilaria* spp., por ejemplo, un nematodo *D. immitis* resistente a LM. Por ejemplo, un veterinario puede tratar a tal animal con un adulticida, tal como un fármaco basado en arsénico, y después seguir con un microfilaricida, tal como una LM o dietilcarbamazina.

En un caso, se puede usar un fármaco basado en arsénico para tratar a un animal infestado con un nematodo *D. immitis* resistente a LM. Un fármaco basado en arsénico puede incluir, pero sin limitación, clorhidrato de melarsomina. El clorhidrato de melarsomina puede usarse, por ejemplo, a una dosis de 2,5 mg/kg, dos veces, con una diferencia de 24 horas. Esto se puede repetir en 4 meses dependiendo de la respuesta al primer tratamiento y el estado, la edad y el uso del animal. Sin embargo, un experto entenderá que la dosis puede variar dependiendo de la gravedad de la infestación. Por ejemplo, un animal infestado, tal como un perro con enfermedad grave (clase 3), puede recibir una dosis y dejar que se recupere durante algunos meses antes de recibir la serie completa de 2 dosis.

En otro caso, se puede usar dietilcarbamazina para tratar a un animal infestado con un nematodo *D. immitis* resistente a LM. Puede usarse dietilcarbamazina, por ejemplo, a una dosis de 25 a 50 mg por cada 0,45 kilos de un animal. La duración de la administración puede depender de la afección que se esté tratando, la respuesta a la medicación y al desarrollo de cualquier efecto adverso.

En otro caso, se puede usar un antibiótico para tratar a un animal infestado con un nematodo *D. immitis* resistente a LM. Dicho antibiótico puede incluir, pero sin limitación, tetraciclina. Se puede usar una tetraciclina, tal como doxiciclina, que tiene como objetivo a los endosimbiontes de *Wolbachia* en *D. immitis*, por ejemplo, a una dosis de 10 mg/kg/día durante 40 días.

En un caso adicional, se puede usar otro agente antihelmíntico. Dicho otro agente antihelmíntico puede incluir, pero sin limitación, acaciasidas. Una acaciasida se puede usar, por ejemplo, a una dosis de 10 mg/kg/día durante 7 días.

En otra realización, la detección de poblaciones de nematodo *D. immitis* con los genotipos mencionados anteriormente puede indicar el uso de agentes alternativos, tales como dietilcarbamazina como profiláctico para proteger animales susceptibles, por ejemplo perros.

En un caso, se puede usar dietilcarbamazina para prevenir que un animal se infeste con un nematodo *D. immitis* resistente a LM. En este sentido, puede usarse dietilcarbamazina, por ejemplo, a una dosis de 3 mg por 0,45 kilos de un animal, una vez al día.

En otra realización, un kit de la divulgación puede ser útil como producto comercial en la detección de nematodos *D. immitis* resistentes a LM. Dicho producto puede ser adecuado para su uso por parte de, sin limitación, un veterinario, un médico, el propietario de un animal, un agricultor, el cuidador de un zoo, un epidemiólogo u otro consumidor que lo necesite.

Ejemplos

Los ejemplos tienen el fin de ilustrar un ejemplo y no deben interpretarse como limitaciones ilustrativas.

Ejemplo 1: poblaciones susceptibles y con LOE de parásitos de *D. immitis* utilizados en los estudios

Las diversas poblaciones susceptibles y con PDE de *D. immitis* utilizadas en estos estudios se describen a

continuación.

a. Aislados susceptibles de Misuri, EE.UU. Se obtuvieron treinta y cinco (35) ejemplares adultos de *D. immitis* de dos perros procedentes de una perrera de Misuri. Se desconoce los antecedentes de los perros anterior a su llegada a la perrera. Los perros no se trataron posteriormente. Se creía que los aislados de *D. immitis* eran susceptibles a los

b. Aislados susceptibles de Gran Canaria, España. Se obtuvieron setenta y un (71) ejemplares adultos de *D. immitis* de 12 perros procedentes de un refugio de Gran Canaria. Los perros nunca se expusieron a tratamientos preventivos con LM para el gusano del corazón y la prevención del gusano del corazón no se practica en esta región de Gran Canaria.

c. Aislados susceptibles de Granada, IO. Se obtuvieron diez (10) ejemplares adultos de *D. immitis* de 2 perros procedentes de Granada. Los perros se seleccionaron de zonas pobres y remotas de la isla, donde no se practica la prevención para el gusano del corazón LM.

d. Aislados susceptibles de Italia. Se obtuvieron seis (6) ejemplares adultos de *D. immitis* de la cuenca del Po en el norte de Italia. Se informa que la seroprevalencia de *D. immitis* en perros de esta zona es aproximadamente del 60-70 %. En esta zona se administran habitualmente a los perros tratamientos preventivos con LM del gusano del corazón. No obstante, no hay informes de PDE (pérdida de eficacia) en Italia.

e. Aislado con pérdida de eficacia (PDE) caso 1. Se aislaron microfilarias (mf) de un perro que se describió anteriormente (véase Bourguinat y col.; documento WO2011/120165). El perro era un mestizo de Labrador macho castrado, nacido en febrero de 2006, que pesaba aproximadamente 31 kg. Era un perro de rescate de Nueva Orleans, Luisiana, EE.UU., recogido por el equipo de rescate de Boudreaux, Nueva Orleans, y posteriormente trasladado a Canadá, donde fue adoptado en enero de 2008.

El perro se trasladó al Main West Animal Hospital (MWAH) en Welland, Ontario, el 6 de junio de 2008 (día 1) para una revisión. La sangre extraída del perro fue positiva con una prueba de antígeno del gusano del corazón (PetChek® PF; IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine) y contenía microfilarias de *D. immitis*. El 11 de junio de 2008 (día 6), se realizó una evaluación diagnóstica inicial (análisis de sangre, radiografías torácicas, examen físico, análisis de orina). La auscultación reveló un leve aumento de los sonidos respiratorios en los pulmones y un soplo cardíaco de grado III-IV/VI. El resto del examen físico fue normal. La radiografía torácica reveló agrandamiento moderado del lado derecho corazón y un patrón pulmonar intersticial en el campo pulmonar caudodorsal. Estos exámenes indicaron un diagnóstico de enfermedad de gusano del corazón de clase 2.

El tratamiento con adulticida se inició el 11 de junio de 2008 (día 6) con diclorhidrato de melarsomina intramuscular 2,5 mg/kg (Immiticide®; Merial Inc.). El tratamiento fue seguido por dos tratamientos intramusculares con diclorhidrato de melarsomina 2,5 mg/kg el 9 de julio y el 10 de julio (días 34, 35). Durante los siguientes 90 días, para eliminar las mf en circulación, se trató al perro en una ocasión con milbemicina oxima (MO) y en dos ocasiones con IVM (véase la Tabla 2). En los días 159 y 160, cuatro meses después de la última dosis de adulticida, el perro se trató nuevamente con diclorhidrato de melarsomina 2,5 mg/kg por vía intramuscular. El análisis diagnóstico posterior y los tratamientos microfilaricidas se resumen en la Tabla 2. Durante el tratamiento del perro, se realizaron varias pruebas de antígeno del gusano del corazón, incluyendo DiroChek® (Synbiotics Corporation, San Diego, California) y PetChek® PF (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine), que son pruebas de ELISA en micropocillos, y and SNAP® PF (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, una prueba en formato de membrana diseñada para el uso rápido en la consulta (véase la Tabla 2).

Para realizar la prueba de Knott, se mezclaron en un tubo de centrifuga 9 ml de formalina al 2 % y 1 ml de sangre (recogida en EDTA). La centrifugación se realizó en una centrifuga LW Scientific EZ Swing SK a 3000 rpm (604 m/s²) durante 5 min. El líquido sobrenadante se desechó. Se añadió una gota de solución de azul de metileno al 0,1 % al sedimento del fondo del tubo de centrifuga, se mezcló y se examinó una gota de la mezcla teñida al microscopio para detectar microfilarias de *D. immitis*. La Tabla 2 indica cuándo se llevó a cabo esta prueba y, cuando se determina, el nivel de microfilaremia.

El perro se trató de la siguiente manera. Dos días después de la última de las tres dosis de diclorhidrato de melarsomina en julio de 2008 (es decir, el día 37), el perro mostró signos transitorios compatibles con la muerte de los gusanos del corazón adultos (temperatura rectal elevada, letargia, tos, sonidos respiratorios en los pulmones aumentados). Comenzando el día 41, estos signos se trataron con prednisona (Apo-Prednisona; Apotex, Toronto, ON, Canadá), 1,3 mg/kg dos veces al día durante 6 días. Después de la administración de milbemicina oxima (MO) 0,74 mg/kg en el día 74, de IVM 50 ug/kg por vía oral el día 95, y IVM 200 ug/kg por vía oral (4x la tasa de dosis microfilaricida normal) el día 125, el perro se mantuvo continuamente con microfilaremia. En el día 207, seis semanas después del segundo régimen de tratamiento con diclorhidrato de melarsomina, en los días 159 y 160, la prueba de Knott fue todavía positiva, por lo que el perro se trató nuevamente con 200 µg/kg de IVM por vía oral. Un mes después, en el día 242, una prueba de antígeno de *D. immitis* fue negativa, lo que confirmó que el perro estaba libre de gusanos adultos. Sin embargo, el perro todavía presentaba microfilaremia. Por lo tanto, comenzando el día 243, se le administró al perro por vía oral MO 0,74 mg/kg cada 2 semanas en cuatro ocasiones (véase la Tabla 2). A pesar de esto, el día 298 el perro permanecía con microfilaremia. Por lo tanto, se administró por vía oral MO 1,1 mg/kg en los días 298, 312, 326, 340 y 354. En el día 356, se extrajo sangre del perro y se examinó: las microfilarias aún estaban presentes y la prueba de antígeno de *D. immitis* seguía siendo negativa. En el día 375, se envió una muestra de sangre a Animal Health Laboratory, University of Guelph (AHLUG): la microfilaremia era de 6530 mf/ml y la prueba de antígeno era aún negativa (véase la Tabla 2). Como resultado, comenzando el día 384, se le administró al perro por vía oral MO 2,0 mg/kg una vez al día durante 7 días. En el día 420, el perro tenía una microfilaremia de 355 mf/ml. En el día 420, se trató otra vez al perro por vía oral con MO 2,0 mg/kg, y esto se continuó una vez al día durante 8 días. A pesar de este segundo régimen de dosis alta, en el día 480, aunque seguía

teniendo un resultado negativo con una prueba de antígeno del gusano del corazón, el perro tenía una microfilaremia de 1810 mf/ml.

La sangre se extrajo del perro el día 706 y se aisló ADN de las microfilarias agrupadas.

Tabla 2. Pruebas de diagnóstico y antecedentes de tratamiento para los perros entre 2008 y 2009

Fecha (día)	Nombre de la prueba de antígeno - resultado (+ve o -ve)	Dosificación del adulticida (melarsomina) *	Concentración de microfilarias en la sangre (mf/ml)	Dosificación de fármaco microfilaricida (por VO)	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
2008					
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 mg/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 +ve ^a		
30 de diciembre (208)				ivm, 200 mg/kg	
2009					
2 de febrero (242)	SNAP -ve ^a		Prueba de Knott +ve ^a ≥ 100 ^b		Interpretación: sin 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 ≥ 100 ^b	MO, 0,74 mg/kg	
17 de marzo (285)				MO, 0,74 mg/kg	
30 de marzo (298)			Prueba de Knott +ve ^a ≥ 100 ^b	MO, 1,1 mg/kg	
13 de abril				MO, 1,1 mg/kg	
2009					
27 de abril (326)				MO, 1,1 mg/kg	
28 de abril (327)			Prueba de Knott +ve ^a		
11 de mayo (340)				MO, 1,1 mg/kg	
25 de mayo (354)				MO, 1,1 mg/kg	

(continuación)

Fecha (día)	Nombre de la prueba de antígeno - resultado (+ve o -ve)	Dosificación de adulticida (melarsomina) *	Concentración de microfilarias en la sangre (mf/ml)	Dosificación de fármaco microfilaricida (por VO)	Comentarios
27 de mayo (356)	SNAP -ve ^a		Prueba de Knott +ve ^a		Sin gusano del corazón adulto
8 de junio (368)				MO, 1,1 mg/kg	
15 de junio (375)	DiroChek -ve ^c		Prueba de Knott +ve ^c 6530		Sin gusano del corazón adulto
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 aislamiento de ADN

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

f. Aislado con PDE caso 2. Se obtuvieron aproximadamente 9000 mf agrupadas de un perro de Mechanicsville, Virginia, que se había tratado con Interceptor® desde 2004 hasta 2008. En mayo de 2008, el perro fue positivo para antígeno del gusano del corazón y se le colocó Heartgard Plus (IVM/PIR) para un tratamiento de destrucción lento. En 2008, el perro seguía siendo positivo para antígeno del gusano del corazón y todavía presentaba microfilaremia. Del ensayo *in vitro* del Dr. Blagburn (Auburn University): la concentración de DL₉₅ para mf susceptibles produjo solo una destrucción del 10,5 % y 2x DL₉₅ produjo una destrucción del 13,6 % de mf.

g. Aislado con PDE caso 3. Las mf agrupadas se obtuvieron de mf de baja respuesta de un ensayo de susceptibilidad a ivermectina *in vitro*. El perro era un animal infestado naturalmente propiedad de un cliente, de Monroe, Luisiana, seleccionado debido a que había estado en tratamiento preventivo con LM del gusano del corazón. El veterinario estaba convencido de que el cumplimiento del tratamiento no era un problema. La historia clínica del paciente indicaba que se habían proporcionado al cliente cantidades adecuadas del producto, basándose en el número y el peso de los animales objetivo en el hogar. El perro presentaba microfilaremia a pesar del hecho de que había estado bajo profilaxis con LM del gusano del corazón.

h. Aislado con PDE caso 4. Las mf agrupadas se obtuvieron de un perro que tenía los antecedentes como se describe a continuación. Este perro callejero era originario del condado de Haywood, Tennessee, EE.UU., y se presentó como positivo para antígeno del gusano del corazón para una clínica local el 21 de enero de 2011. El perro fue castrado el 26 de enero de 2011. El 1 de febrero de 2011, se inició la terapia con doxiciclina (200 mg por vía oral dos veces al día) y prednisona (comprimido de 15 mg por vía oral cada dos días) y se continuó durante 30 días. El 2 de febrero, el 3 de marzo y el 4 de marzo de 2011, se administró una inyección de diclorhidrato de melarsomina (immiticida) (2,5 mg/kg). El 2 de febrero, el 3 de marzo y el 1 de abril de 2011, se administró una dosis oral de milbemicina oxima (Interceptor) (11,5 mg/comprimido). El 5 de abril de 2011, se realizó una prueba de Knott y fue positiva; se administró ivermectina por vía subcutánea a una dosis de 0,26 mg/kg. El 11 de abril de 2011, la prueba de Knott fue otra vez positiva; se administró ivermectina por vía subcutánea a una dosis de 0,39 mg/kg. Las pruebas de Knott se realizaron nuevamente el 19 y 26 de abril de 2011 y ambas fueron positivas. El 2 de mayo de 2011, la prueba de Knott fue nuevamente positiva y un frotis de sangre mostró microfilarias; Se administró al perro Advantage Multi® (imidacloprid al 2,5 %, moxidectina al 10 %). El 5 de mayo de 2011, un frotis de sangre fue positivo para microfilarias; en este momento, se recogieron microfilarias. El tratamiento repetido con adulticida llevó a la suposición de que el perro estaba libre de parásitos adultos. El 11 de junio de 2011, se administraron al perro 200 mg de dietilcarbamazina. No se observaron efectos secundarios del tratamiento. Al cabo de 7 días, el frotis de sangre no mostró mf. El perro fue adoptado el 18 de agosto de 2011 y se trasladó a Massachusetts.

i. Aislado con PDE caso 5. Se obtuvieron mf agrupadas de un perro originario de West Monroe, Luisiana, EE.UU. Se trataba del perro de un veterinario. Los antecedentes implicaban el uso apropiado de milbemicina oxima y hubo varias pruebas negativas de antígeno del gusano del corazón en las revisiones anuales, hasta que una prueba fue positiva para antígeno del gusano del corazón y hubo presencia de mf en la sangre el 25 de septiembre de 2008. Se

realizó un ensayo de sensibilidad de microfilaria *in vitro* (laboratorio de B. Blagburn, Auburn University, Alabama) el 19 de noviembre de 2008. Los resultados del ensayo indicaron organismos resistentes a los fármacos. Se alimentaron mosquitos con muestras de sangre infestada procedentes de este perro original. Se usaron larvas L3 para infestar un segundo perro. En el momento de la infestación, el segundo perro había estado en tratamiento con ivermectina. Posteriormente, el segundo perro recibió cada semana 1 dosis de 3 µg de ivermectina/kg, seguido de 11 dosis de 6 µg de ivermectina/kg, seguido de 4 dosis de 12 µg de ivermectina/kg, seguido de 8 dosis de 24 µg de ivermectina/kg (interrumpido por durante una semana después de la 4ª dosis). Durante todo el período de dosificación semanal con ivermectina, el perro se mantuvo positivo para mf. Se recogieron microfilarias en las semanas 1 y 2 después de usar el último tratamiento en el análisis.

j. Aislado con PDE caso 6. Las muestras corresponden al segundo pase de parásito que proviene de un perro originario de Earle, Arkansas, EE.UU. El perro del aislado PDE-6 original recibió milbemicina oxima en 2004 y 2005, ivermectina/pirantel en 2006 y 2007, e ivermectina/praziquantel/pirantel (Iverhart Max™) en enero de 2008 y a principios de julio de 2008. El dueño manifestó que había sido constante con la profilaxis. Este perro dio negativo para antígeno del gusano del corazón en las revisiones anuales en 2005, 2006 y 2007. Este perro fue positivo para antígeno del gusano del corazón y presentó microfilaremia en el examen anual del 4 de noviembre de 2008. Los resultados del ensayo de microfilaria *in vitro* (laboratorio de B. Blagburn, Auburn University, AL) en este perro sugirieron resistencia. El perro de PDE-6 se infestó de forma experimental el 16 de noviembre de 2009 con larvas L3 obtenidas de mosquitos alimentados con sangre del primer pase. El perro del primer pase se infestó de forma experimental el 24 de febrero de 2009 con larvas L3 obtenidas de mosquitos alimentados con sangre de un perro infestado de forma natural (el perro del aislado LOE-6 original).

Ejemplo 2 - Aislamiento de ADN de los parásitos utilizados en los estudios

El ADN genómico de los gusanos adultos individuales se extrajo con el kit DNeasy™ de Qiagen (Qiagen Inc, Mississauga, Canadá). La extracción de ADN genómico de mf individuales se extrajo utilizando el kit QIAamp® DNA Micro de Qiagen. Para obtener suficiente ADN para el análisis, el ADN de mf se amplificó utilizando un kit Repli-g® de Qiagen, que permite amplificar el genoma completo a partir de una cantidad muy pequeña de ADN. Las Mf se aislaron por filtración a través de filtros con membrana de policarbonato a partir de sangre recién extraída.

Ejemplo 3 - Secuenciación de ADN, análisis e identificación de los SNP

El objetivo fue identificar los cambios genéticos (por ejemplo, variaciones de nucleótidos) presentes en las poblaciones de gusano del corazón con PDE que no estuvieran presentes en las poblaciones susceptibles de gusano del corazón. Las variaciones de nucleótidos en cualquiera de las poblaciones con PDE, en comparación con un genoma de referencia obtenido de los aislados susceptibles, indicarían posibles marcadores de SNP.

Inicialmente, los genomas de las poblaciones de gusano del corazón identificadas en los párrafos con las letras a-h del Ejemplo 2 anterior (aislados susceptibles de Misuri, Isla de Gran Canaria, Granada e Italia; aislados con PDE casos 1-4) se secuenciaron utilizando el sistema HiSeq2000 de Illumina®. La Tabla 3 muestra el número de lecturas y el número de bases que se secuenciaron para cada población. No se incluye en la Tabla 3 la información de las poblaciones de gusanos del corazón identificadas en los párrafos i y j (aislados resistentes de los casos con PDE 5 y 6).

Tabla 3. La información de las lecturas sobre los aislados utilizados para la secuenciación del genoma completo

Aislados	Número de lecturas	Número de bases
1 - susceptible	85.097.000	17.019.400.000
2 - susceptible	78.242.862	15.648.572.400
3 - susceptible	80.687.895	16.137.579.000
4 - susceptible	75.515.617	15.103.123.400
5 - PDE-1	82.417.743	16.483.548.600
6 - PDE-2	74.261.369	14.852.273.800
7 - PDE-3	79.894.844	15.978.968.800
8 - PDE-4	75.477.318	15.095.463.600

Los datos generados a partir de las muestras susceptibles a LM (aislados susceptibles de Misuri, Isla de Gran Canaria, Granada e Italia) se utilizaron para ensamblar el genoma, que después se usó como el genoma de referencia para el proyecto. Se agruparon todos los fragmentos individuales de las 4 poblaciones susceptibles. Para ensamblar el genoma se utilizó el programa informático Velvet aligner (<http://www.molecularrevolution.org/software/genomics/velvet>). Las lecturas se filtraron eliminando/recortando las secuencias del adaptador, si se encontraban. Las lecturas se ordenaron a una longitud de Q30 de 32 pares de

bases. El valor predeterminado de inicio de Aligner es una longitud de 32 pares de bases y el número de lecturas fue concordante con el valor predeterminado. La Tabla 4 describe el ensamblaje del genoma de referencia utilizado para el estudio.

Tabla 4. Información sobre el ensamblaje del genoma de *D. immitis*

Número de cóntigos	22 966
el 50 % de los cóntigos son más largos que	28 928 pb
Longitud del cóntigo más largo	250 211 pb
Bases totales en los cóntigos	94 611 006 (94 Mb)
Número de cóntigos > 1 kb	6654
Bases totales en los cóntigos > 1 kb	90 045 376 pb (90 Mb)

Una vez obtenido el genoma de referencia del gusano del corazón a partir de las secuencias de los aislados/poblaciones susceptibles, se compararon los genomas de las poblaciones con PDE con el genoma de referencia, para identificar las diferencias y los posibles SNP. Como parte de este análisis, se demostró que los locus genéticos que contenían los posibles SNP no eran significativamente distintos entre las poblaciones susceptibles individuales (es decir, entre los aislados susceptibles de Misuri, Isla de Gran Canaria, Granada e Italia), además de no ser significativamente distintos entre las poblaciones con PDE individuales (PDE 1-4), pero fueron significativamente distintos entre las poblaciones susceptibles y las poblaciones con PDE. Para realizar este análisis, se utilizó el programa informático llamado PoPoolation2 (Kofler y col. Bioinformatics 27:3435-3436, 2011; <http://bioinformatics.oxford-journals.org/content/27/24/3435>). El programa precisa el uso de otros programas, tales como Perl (<http://www.perl.org/>), R (<http://www.r-project.org/>), bwa y Samtools. En primer lugar, se generó un archivo sincronizado, que contenía las frecuencias de nucleótidos para cada población en cada base en el genoma de referencia, después de filtrar en cuanto a la calidad de la bases, en un formato conciso. El archivo sincronizado generado con el programa PoPoolation2 contenía información detallada sobre el recuento de nucleótidos en los locus para cada una de las poblaciones. Los valores P se generaron con la prueba exacta de Fisher para todas las posibles comparaciones entre poblaciones. Para identificar los locus asociados con la resistencia a LM, los valores de p debían ser no estadísticamente significativos de forma simultánea ($> 0,05$) dentro de todas las muestras susceptibles y dentro de todas las muestras con PDE, y estadísticamente significativos ($< 0,05$) entre todas las muestras susceptibles frente a todas las muestras con PDE. Trescientos treinta y ocho locus cumplieron con estos criterios, incluyendo 12 que tenían un valor de p de 10^{-5} . Se analizaron mediante Blast (BlastN y BlastX) en el NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y en la base de datos del genoma de filaria del Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/filarial_worms/Blast.html) las regiones flanqueantes de 1000 pb que incluían cada locus que era estadísticamente distinto entre las muestras susceptibles y las muestras con PDE, para eliminar los locus ubicados en el ADN mitocondrial de *Wolbachia* o *C. lupus familiaris*. Los locus ubicados en lecturas con un polimorfismo muy alto (> 2 nucleótidos y/o índices) o baja cobertura ($< 10X$) se eliminaron de un análisis adicional. Los recuentos de nucleótidos para cada locus de interés se analizaron individualmente para las poblaciones agrupadas, para garantizar que el aumento o la disminución en la frecuencia de nucleótidos fuera en la misma dirección para todas las muestras susceptibles o para todas las muestras con PDE. Los locus que mejor cumplieran con los criterios se conservaron para un análisis de genotipo adicional en parásitos individuales, para evaluar las frecuencias alélicas reales en poblaciones que se habían caracterizado en términos de respuesta a la LM.

A partir de estos análisis, se encontró que 186 locus eran significativamente distintos entre las muestras susceptibles y las muestras con PDE. Como este enfoque estaba basado en lecturas y frecuencias de nucleótidos de muestras agrupadas, estos locus se estudiaron adicionalmente (genotipado de SNP) utilizando poblaciones individuales (no agrupadas). A tal fin, se utilizó el análisis de frecuencia de SNP Sequenom®. Tabla 5, a continuación, muestra los orígenes del ADN utilizado en este análisis.

Tabla 5. Descripción de los aislados utilizados para el análisis por Sequenom

Muestras susceptibles = 181 aislados	Estado y/o país de origen	n.º de gusanos adultos individuales	n.º de microfilarias individuales	de los perros n.º
Sus1-Misuri	aislado de Misuri, EE.UU.		49	1
Sus2-Misuri	aislado de Misuri, EE.UU.		45	1
Gran Canaria	Gran Canaria, España	71		11
Granada	Granada, IO	10		2
Italia	Italia del Norte	6		

(continuación)

Muestras susceptibles = 181 aislados	Estado y/o país de origen	n.º de gusanos adultos individuales	n.º de microfilarias individuales	de los perros n.º
Muestras de baja respuesta = 244 aislados				
PDE-1	Nueva Orleans, LA, EE.UU., se trasladó a Ontario, Canadá		56	1
LOE-2	Mechanicsville, VA, EE.UU.		35	1
LOE-3	Monroe, LA, EE.UU.		51	1
LOE-5	West Monroe, LA, EE.UU.		54	1
PDE-6	Earle, AR, EE.UU.		48	1

El análisis por Sequenom® está basado en PCR múltiple y en espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis por Sequenom® se utilizó para evaluar los 186 locus utilizando 425 muestras individuales (5 paneles con 36-38 SNP en cada panel). El diseño de cebadores para cada marcador de SNP se basó en el requisito de que los cebadores de elongación estén ubicados en una región no polimórfica de 15 pares de bases antes o después del SNP de interés. Todas las consultas al genoma se realizaron a ciegas (es decir, el origen de la muestra y los antecedentes de tratamiento del perro no se conocían durante el análisis). Se analizaron un total de 79050 genotipos. De los 186 posibles locus, se observó que 109 tenían ventajas técnicas para predecir la pérdida de eficacia de la LM. La población susceptible portaba más del 90 % del genotipo de tipo silvestre, mientras que la población con PDE tenía una frecuencia de genotipo del genotipo de tipo salvaje significativamente más baja. Estos 109 locus se desvelan en el presente documento como las SEQ ID NO: 1-109.

Ejemplo 4 - SNP adicionales de organismos resistentes confirmados

Las muestras con PDE, como se describe en el Ejemplo 1, se presume que son resistentes a las LM debido a los antecedentes de tratamiento con las LM de los perros y la presencia continua de organismos de gusano del corazón. Sin embargo, a pesar de los antecedentes de tratamiento, una explicación alternativa a la verdadera resistencia de los parásitos a la LM es el incumplimiento por parte del propietario del tratamiento con LM. Por lo tanto, se realizó un estudio en condiciones controladas de tratamiento con LM, para eliminar la posibilidad de incumplimiento del propietario en el tratamiento con LM, como una posible razón de la presencia de organismos de gusano del corazón en los perros.

Los organismos de gusano del corazón utilizados en los estudios de eficacia se obtuvieron de uno identificado como Jd2009 de Earle, Arkansas, EE.UU. Jd2009 recibió MO de forma mensual en 2004 y 2005, IVM/pirantel en 2006 y 2007, e IVM/praziquantel/pirantel en enero de 2008 hasta principios de julio de 2008. Jd2009 dio negativo para antígeno de GC en 2005, 2006 y 2007. Este perro fue positivo para antígeno del gusano del corazón y presentaba microfilaremia el 11 de abril de 2008, a pesar de un historial de cumplimiento de los tratamientos preventivos para el GC. En este momento se obtuvieron mf del perro con el consentimiento del propietario y se enviaron a la Auburn University, donde se examinaron las mf en cuanto a la sensibilidad a IVM en un ensayo de respuesta a la concentración *in vitro*, que mide la migración (Blagburn, B., American Heartworm Society-13th Triennial State of the Heartworm Symposium, 2010). Estas mf fueron significativamente menos sensibles a IVM que las obtenidas de un perro infestado con una cepa de laboratorio de *D. immitis* que era completamente susceptible al fármaco. Las mf se utilizaron en la Auburn University para infestar mosquitos y producir L3 que se usaron para infestar al perro Jd2009-1, que desarrolló una infestación manifiesta. En el ensayo de migración *in vitro* se demostró que las mf de este perro eran tan resistentes a LM como las mf de Jd2009.

Las L3 obtenidas de las mf recogidas de Jd2009-1 se usaron en la Auburn University para infectar a un segundo perro, Jd2009-2, y el perro se trató de forma mensual con Heartgard Plus® (IVM 0,006 - 0,013 mg/kg), 9 veces consecutivas. Se recuperaron gusanos adultos, lo que indica que el aislado de Jd2009-2 era resistente a la profilaxis con IVM. En un segundo estudio, los perros se expusieron a L3 de Jd2009-2 en el día 0 y se trataron de forma mensual durante 5 meses consecutivos con Heartgard Plus® (IVM 0,007 - 0,009 mg/kg; Estudio 1b). En la necropsia en el día 188, la eficacia fue del 71,3 %, lo que confirma la resistencia a la profilaxis con IVM en el aislado de Jd2009-2.

En otro estudio, los perros se expusieron a L3 el día 180, después de la inyección de ProHeart6®. En la necropsia en el día 150 después de la infestación, la eficacia fue del 21,6 %, lo que indica que el Jd2009-2 también era resistente a la formulación de MOX de acción prolongada ProHeart 6®, de la que se afirma que tiene una protección del 100 % durante 180 días después del tratamiento.

En otro estudio, el aislado de Jd2009-2 resistente a IVM confirmado se usó para determinar si la resistencia se extendía a otros tratamientos preventivos con LM del gusano del corazón. Ninguno de los otros tratamientos preventivos con LM para el gusano del corazón (MOX, MO y SEL), administrados como quimioprofilaxis de forma mensual según lo recomendado, fue completamente eficaz, es decir, después del tratamiento con cada una de estas LM utilizadas según lo recomendado, se infestó con *D. immitis* al menos un perro en los grupos de cuatro a seis

perros con estos tratamientos preventivos para el gusano del corazón.

Se usó ADN de organismos individuales procedente de dos aislados de Jd2009. El ADN de individuos de un grupo, llamado RES-1, provino de 4 perros del estudio con ProHeart6®, descrito anteriormente. El ADN de individuos de otro grupo, llamado RES-2, provino de 6 perros del estudio con Heartgard Plus®, descrito anteriormente.

- 5 El ADN se aisló de 115 gusanos adultos y 79 mf de las poblaciones RES-1 y RES-2, como se describe en el Ejemplo 2, y se analizó utilizando el análisis de frecuencia de SNP por Sequenom®, como se describe en el Ejemplo 3. De este análisis, 18 locus adicionales (de los 186 locus iniciales) fueron significativamente distintos entre las muestras susceptibles y las RES. Estos locus se desvelan en el presente documento como las SEQ ID NO: 110-127.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> McGill University Novartis Animal Health US, Inc.
- <120> Marcadores para predecir la resistencia a fármacos de lactona macrocíclica en *Dirofilaria immitis*, el agente causal de la enfermedad del gusano del corazón
- <130> PAT055806-WO-PCT
- 15 <150> US 61/839.545
- <151> 2013-06-26
- <160> 127
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 300
- <212> ADN
- <213> *Dirofilaria immitis*
- <400> 1
- | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| aacataaaca | tattgaactg | aatcctgcaa | acagttctct | tataacgtga | accataacta | 60 |
| aatttagaga | aaatatgaaa | aagaaaaata | agttgctttt | gctcgtgcac | caactctaata | 120 |
| accaggaaa | tcaagaagtg | ataatgagta | atgtcatcat | tagattcagt | aattggtgac | 180 |
| actatcaata | ttattattat | tatacttaaa | aatacgacga | ccacttatcg | taacttaaaag | 240 |
| catgcataat | acgactgtca | tcatattaca | tttcttcaag | ttcgtattgg | acaagtgatt | 300 |
- 25 <210> 2
- <211> 300
- <212> ADN
- <213> *Dirofilaria immitis*
- <400> 2
- | | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| gacaagcgtt | gacgggagag | acgatataat | aataaagaag | gcattgggta | tcagaaggca | 60 |
| caatccaatt | ataaatgcca | aggcaaaatg | aataaaattt | atgctgacga | tttgatcaat | 120 |
| tacgaagaat | ttccgatcgg | ctcgaatctt | tgtttgatatg | tgcactactg | tttaacttaat | 180 |
| ctttgtttta | tatacttttg | cgtgtcatat | ataatatatt | catgtcaact | gatacgttat | 240 |
| gatgtttttt | tgtaaattaa | gttgatcgga | aacctgaagt | ctattttcaa | tttaagaaat | 300 |
- 30 <210> 3
- <211> 300
- <212> ADN
- <213> *Dirofilaria immitis*
- <400> 3

	ttttaggaaa atggtgactg tagagagata ttatcggaac gacaaggtcc acttogaacg	60
	ggtcttttat tgtcgacgga ttgtgaacca agttttggca ttcataatga caggtagcta	120
	tttttccatc atcccatttt tgtattagtg caagcaagtc atgagtcgaa agaaaatctc	180
	aaaagaaaaa aatgaaattt caggttcaaa ggactgcgtc cattattcgc actggttgat	240
	gagaacgtac agattccaga gcggaatgc tgcacagtat cttttgtttc acttctgaat	300
5	<210> 4 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 4	
	tcgattaaaa attatcatcg ataaaaattct aaaatttatt ttagtaaaat tattattatt	60
	ttgatgaata agttaacaaa aaaattttta taactttttg attcgccaaa aatctaattc	120
	gttaaaaagt cgttccaaac agatatcgct tgttcgatga aaatgtccgg ttgttagaaa	180
	atcataaatt ggttcaaata attttccaga acgttcgaaa aaatattccc ttgtatcgga	240
	taaataacca ttacaatttt ccactcgtgt tgcattgtgt tctcgacaaa aatcagctaa	300
10	<210> 5 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 5	
	tcaacagaaa tcgagattcc aaaaagtttc ctacaaatac ttaattatca atggatattt	60
	agttttgtta tctgttatca taagttctgc ttcttacacg attaaaaatg tccaagaatt	120
	ttttactatt caaatgaggg aaataaaaaa ccaatgccaa taatatccag aaactacata	180
	catctttctt ttttcgaagc tcatctattc cggccgaaaa caatgaagaa cattaaaaatt	240
	cttaaaagat agtcttagcc ttttccttga ccactatctt aactgtcagc gctaaaatgt	300
15	<210> 6 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 6	
	aatagtcgtc tcattacttt ttgactttta taattcgaga atcttatgta gtccttcaact	60
	ttacccttct tctgtcgaac taagaattac agcattattt tgaatttaa tgtgtaaaaag	120
	acaatagcag attttgtaat tttgtgttaa cctcacttta tatttcgctt catatcgtga	180
	cagagaatta ctatttcaga gagtattact tgtcaccaga gaatctccag aaagattttt	240
	atttacgtcg gaaaatggac aaaaatggtt tcttatcatt agcactgata gctagtttcc	300
20	<210> 7	

<211> 300
 <212> ADN
 <213> *Dirofilaria immitis*
 <400> 7

5 tatctcttgt tgtgtgttct gcattgtatc aaagtgggta aatttttgctt tagacgttga 60
 cttattgtct tttttaagtt atattctagt ccatgttttt ctctttgcaa atattttttt 120
 ccgccgccta tgattcattg ttttgtttgt aactctctat taagttgctt ttagtttgaa 180
 ttgtatcaaa atttcaaaca tttaaaatac gcactagcac tatttttttct tatctcaatt 240
 aagcgaatcc cggaacaaga tttaatcgat ttccgaatca caattaaatc actggaaaac 300

<210>8
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Dirofilaria immitis*

10 <400> 8
 attttcctta acaaatcatt ttcaaacgaa aaaacattaa aaagtgttaa aataaaatgg 60
 tgatattgat aagaaattaa ttcaacctgc atatcaattc ttgtagcggc catttttctta 120
 gcaagttcta tagcagctcg atccatatca ccttcttgct ctaatgtcaa ttccggttcc 180
 ggaatttttt ttattttgcc attcttcacg ttttttttat tttttactga tatagctata 240
 gaccctttct cccgtgcatg cctgtaggcc tgttctgata tacaggcttg tgaaccactg 300

<210>9
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Dirofilaria immitis*

15 <400> 9
 ttctggggta gttatacgga aaattagaca atgaagagaa tcaaaaaaca tgcgattttc 60
 aaacagagga actttggtac ttttgccctg acttacttta ttttaaaacc catacaaaat 120
 aaatgtttca tttgattgat attgtcgtac taataattag agcttcaaca ttaggatttt 180
 aataaccttc aatttatctc agaatttaag aaacttacgt atggatggag aaaatataaa 240
 gaatggcgat gacaaataag atttgctatg aaaaaactaa tgccacaaga tccgaatgca 300

<210> 10
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Dirofilaria immitis*

20 <400> 10

	tttatgaaca aaaataataa aaattaggat aacagatatc aatttctttt agctataaat	60
	atacgcttcg attgaaaaaa gctttcaa at tataattaag gcatacgta cgatatagac	120
	aattaagtcg acattaatta ttgaaatat tttaaatttt tttctctttc tttttttcta	180
	ttctcttcca aagtgtcaaa tagttatgaa attgtcagaa gctaaaatga taatattatt	240
	caagtttatt acctaatctt ttatcacctc atttcttattc atttatctga aaatctaatac	300
	<210> 11	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 11	
	atggtgaatt tttaatgaaa ctttttcggt gcataagcat tacagatctg taagctgtgc	60
	aaaccctgtt tctttgtaaa ttgaaacaaa gatcatttat tgtttccagc gtcgatttga	120
	cctggataaa tgtggtacca aaagtagatg acgagaggta agtgcaaaca aaatgcacaa	180
	aaatgatttt gatgcactca aatcattttt aagttttgtg caattttcca ttttatagtt	240
	tcgtgatcgg ttgttattca tcaacttgat tttgtttgtt tttgtgact tatatttcat	300
	<210> 12	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 12	
	tttgacactt tcagatacct tacaaactca tctccagcac ccaatttaca atatcgctgc	60
	ctaaataaag aatttattcg gatatgagac tgtagttttc attccgtacc aatcatagta	120
	gaacagatct atagcatggt gtcctactaa agttgtgact ggctattaag tatgtgggtg	180
	tttttacgtg tgcgtgggtg tttgtgcgtg tgtgcgtgtg cgtttctgca catattttcg	240
	tgcgcggtgt ctgtgtgtgt ccgtttgtat atgccgagtg tagctgtgtg tatgttcttg	300
	<210> 13	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 13	
	cactcataat atacctgtca acaaactcag aaatctgaat aaaatgacgc aaaaatgaca	60
	aaaacatttt atcaaccttt tcttcatcac tccccgcgat ttccaatttt cttccaaact	120
	gtttttgtcg tgctacaaag tcatcagcca cttcattttc ttcaagatgg ttcgagacgc	180
	cattcttgga ttcacccctt atttcaactg tttccgaagt cccagcagtt gaagctgaac	240
	ctagcattta tatcaccacc cgatgtcaaa aaatgacagc ggtcagagaa tacgacttcc	300
	<210> 14	
	<211> 300	
20	<212> ADN	

	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 14	
	gctaggtcaa cagttgggtt atttggactt atacgatatt aaacataata tcgcctcata	60
	tacacagaaa tatcaaaaaa acgaacacag ctaaatacgaa gaatacgaac aaatgtttta	120
	aaaattatat taaatctttt aatgctctct acaatgtcgt atcttccctt ttgtctgtat	180
	ttctcctttc gttccaccac tgctatttct catgcctttg aactatgggt ctcgttgcgt	240
	cgaattgtcc tcgaaactgt tgtttctgtc gaattacgtc gaactgctgg actttgtcgg	300
5	<210> 15 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 15	
	atatctcact tctgacataa attgaagtgg cactgatttg aatgaaatga taaataaaat	60
	aaagacgaca aggtagtgga aaaaaaaga ggagaaaaca ccgtttagtt ttggatgcaa	120
	gctcgaatct gagttttctt gcaaaccgta cactgatcaa ttttcttaca caaacataag	180
	aaaaaaagaa gtgattttac tgtagctgta tcgtataatt caaatcatat atatatatgt	240
10	ttcaataatc tatacattta tgtatatatt tttttgaatg gaacagtga tgattttaaa	300
	<210> 16 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
15	<400> 16	
	acaaatgcca tcgggagaga aatatcgttg gcgtactgat cacattggcg gtatcacttc	60
	tttgaaaact ccagctggta ttgtgtatca tttcatgcaa tacgctatct ttgatcgaat	120
	atgtcgacgg cgtagtggtt ctttttccaa cgcattctac gttgcgtgta tggatgatga	180
	cggacaatta ttggaatatt aaacaccgga tcgattgcat tccgtaacct tgaaacgtga	240
	catatatggg agagtagtgc aaataacttc agatggcgaa aatattttct tcgaatatgg	300
	<210> 17 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
20	<400> 17	

ataatatata tttccattga taatatTTTT catattatgt gatgtttgaa attttctgca 60
attgctacat tccgattaaa aacttttatt atccgtactg gagaattttg cttttttttg 120
acggtttgtt caataagttg tcaatatatt gtctgcctta gtaaaacctt tctaattctat 180
ccgttcgaat tggaagttga aagttcagca tcattctttt agtgagggtgt ttaagttgtt 240
caatagatat tatttagaac gatctcaatt aaaatcttct gaattgatttt atgtttttat 300

<210> 18
<211> 300
<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*
<400> 18

5

gcagcacatt gcacacagta aactgcaaac tgaattaaga gatattgggt tgaattattt 60
ctaattttaa aggatataat aaatgacttt gatgattgtt gattttaagg tatctcggaa 120
gactccatca gtctcagtc tctagcaatc gctataggta ctaaaagaaa agaaaagatg 180
tctcgttatt cactttgaaa tgtacatatc aaatcatttt gtcgtatgaa attaagtata 240
ttatgtctaa tcgtatcatt cgaaatgaat ttactgtcac tgtagaact atttaggcag 300

<210> 19
<211> 300
<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*
<400> 19

10

agagttcaat cgccaagttg ttctttttct cgctcgcaga gatcaaaacg gtgttggtca 60
tacactcatt catcaggctg tgatagacat ctcttagaat ttcagtgttt ttctggatga 120
aacattatt tctcaaacat gacacttaag gacaatagtg cgtgacttct ttgttaacgt 180
acacgagaaa acaaaacaga tgatgcttgt tatcttggtg ataaatgtgt attcagaata 240
atgttatata tctttgcgtg acaaatatca tttcgttata cttcggatac gcctttttat 300

<210> 20
<211> 300
<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*
<400> 20

15

aactttactt gaactttttt ggtgttcaat tttgaatatt ataccaacca ttcagaagac 60
tgtatataga aatgaacctt caagaattaa tcgaaatttt tattaataatc ttttatttga 120
atatttcatt atttaaacctc attactattt gcagtatatt attagatcta atgtagaaaa 180
aaaaatcaga tggcaaaaat aatatcatag gtttggtttt aaaattcatt gcaaaattca 240
gtgcgccgtt ccagtcgctc gtaattacc tatccctgag ctttacaaaa agaattgttt 300

	<210>21	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
5	<400> 21	
	aggtatctag atagcataat aaattactac acaaaccgat ggaaacgcaa gtttggcggtt	60
	gcgtgttgat acaaaatatt agagccaagg atggtatcac atgtaaaact gcaattttgc	120
	tatttgttta aagcaaataa gaaataaata tttcgttcctt attctttaat ttatttcac	180
	agatggcttt gttataccat aattgtaaat ctgtcatatc ttaattgcgc aatagcccaa	240
	gattcttgta tattcttaca tttcacaatt tattttctta tttctagttt tagaattata	300
	<210> 22	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 22	
	aatagctact cacagcttaa gttaactaat ggattcttga atttatttaa gcgtgtagtt	60
	aagcgattaa tatgatggat gcccagaatc gctttgtcctt atagttttgt ctcgacagaa	120
	aggatgcatt gttgtcctga atttgttcaa gggaaaatta aataggtttc tttcaatgac	180
	tcctattaaa tttttttgaa tttaggcttg cattgcgtgt tctgatccac tattagcacg	240
	tacgggtatc gcagtgccat gtgatgcagc actatgcaaa aaccacctcc atgtcacttg	300
	<210> 23	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 23	
	tctgttgtaa gtttcacaat ccagttaatt taagctcagc ttatttgaaa ttttcaacaa	60
	aattacgaaa attactttct cggttcattt ttttcaacca ccaaataatt agcataattg	120
	gcctgaaatc gtcaaagttt acaaactttt gttcagcaat cttctcttac tcttacaata	180
	aacatgatta acttgtcgtc ataccaatct cgtttatagc aaattctttt caaaaaaaca	240
	ttgctacaaa ttttatatcg catcatttca acacgcataa ttatttttca tatatgaaaa	300
	<210> 24	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 24	

	ttcacaaatcc agttaattta agctcagctt atttgaaatt ttcaacaaaa ttacgaaaat	60
	tactttctcg gttcattttt ttcaaccacc aaatatattag cataattggc ctgaaatcgt	120
	caaagttttac aaactttttat tcagcaatct cctcttactc ttacaataaa catgattaac	180
	ttgtcgtcat accaatctcg tttatagcaa attcttttca aaaaaacatt gctacaaatt	240
	ttatatcgca tcattttcaac acgcataatt atttttcata tatgaaaaac catattataa	300
	<210> 25	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 25	
	attaactctg aacccaaaga ctggttggtta aaataaagat ctatttttagt tatacatcta	60
	acattaaagg ttttcgtacg gaaacaagta ggtttgataa ttttcatgta actgtaaaga	120
	acacctgtga aagggatcag taaaatttgg gggatgtagc acggaaatat gaagctgagt	180
	gttttgtacc caaaagtttt tcaaactctgc gaaataacga gagtgtaat gatcgttttt	240
	aaccaaattt tttgattcta atccttccca cagttttgaa attcagtaag catttctttt	300
	<210> 26	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 26	
	ttgcaacaaa tcaataataa aagacttgcg gctaacaata tatttgattc ttttttaccg	60
	ttattattat gacaggtaat aatagtatta caagcatatt tgtaggtgtc aattttttca	120
	attcaaattt tcttaattca ttatttcttc ctttccttaa taaatagtct ttccatttaa	180
	gaattaactt tttgaaatct ttaatgagaa gacacaaaag attccggata attttgcac	240
	atcttttcta tttcgcgtta gtattttatg ttttcaacag atttttatga ttttaactata	300
	<210> 27	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 27	
	gataaaatgg gttcttgtca agctcatttg gcataatctc gtcttctata tttatatcct	60
	ttaatatctt ctcttttttc aaattttcct tcccgacgtt ttccatatcg acctctttct	120
	tcataaattt atcttcctca tttgcctcat tttttgactt ttcatccgtt tcatccttat	180
	ttttcttttt ttcatctcct attttacott ttcoctttatc aacttctatc ttaactttct	240
	caatggtttt tttattttct ttcatctttt tgttttcttc tattgacata ctataacaaa	300
	<210> 28	
	<211> 300	
20	<212> ADN	

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 28

ttttacgaac aattattttca taaaagattc gtatTTTTga ttagttttta agaatttttt	60
tttatttttt ttagccaaca aatatatttt tcaaaattgt taaatttgaa attataaatt	120
tcaactaaaa aaaagcaaaa agctaagcca atagaaataa catacatgtg taatataaaa	180
tataaagtat tcgaaatgaa aatcaaagtt tcataacaaa aaacaaaaaa tattctaacc	240
tttttagattt catcaaaaact tcactaaaaa gttaaattta aattttcaaa ttgttataca	300

<210> 29

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 29

cgaacaatta tttcataaaa gattcgtatt tttgattagt ttttaagaat ttttttttat	60
tatttttagc caacaaatat atttttcaaa attgttaaatt ttgaaattat aaatttcaac	120
taaaaaaaaag caaaaagcta agccattaga gataacatac atgtgtaata taaaatataa	180
agtattcgaa atgaaaatca aagtttcata acaaaaaaca aaaaatattc taacctttta	240
gatttcatca aaacttcact aaaaagttaa atttaaattt tcaaattgtt atacaatgat	300

<210> 30

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 30

tcaaagacaa aatgaagaac ttaacaaaaa aaaggccaat aaataaaggc tatttcgtga	60
aaaatctaaa aaaaaaaga tctgttcctt tcgaatcaag tgattcttcc tactacattc	120
gtgttgtaat tcttacttgt atacagtccc cagtttttcg acgataaaaa acatttcgat	180
aagtgagttt gaattaattg aatttttaaaa gatcataaaa ataaaatcaa aataaaaaaga	240
ccaaaattaa gtctgataat tccagaaaac acaataataa atatacaaat aataaaaaact	300

<210>31

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 31

aaataattca ctaatttctc atcatcaaatt tatttcgtac aatcgataaa tcaacgatta	60
taatagcgaa gagaatgaaa attaatgtgg tgcacagtat acggacccca tatacaatgt	120
tcaacagaga tgaacatttt ttttctatta aagttttctg ttcggcgaaa gaaagacact	180
ttctaacgat gctttcctcc caactcccct tgcaatgata gaggatgcag ccaagattcg	240
tcgactcaag cagcatcact caaccggcca tcacttcggg acctttttcc ctgcctttta	300

	<210> 32	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
5	<400> 32	
	cattgcgaat gaccgctatg gaatatcaat tagcagatat taatcgtgaa ttaagcacat	60
	tggtggaatt tttagacca aatcgaattt caaaaaatgc tacacttgca acatcagcaa	120
	ccattgcaac atataacagt acttcgatgc gtaatgtaaa aaagaaatgt aatgcatctg	180
	aaagctgaaa attcatctga tatattgaag caaaaggtaa gattatTTTT aagatatcat	240
	tcttgatgct ctcataattt ctacatcaaa tttaatcaaa cgattcattt atgttcattt	300
	<210> 33	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 33	
	ttcttgttgt acctatcata gatgataact taagtaccaa tagcaatagt gcaacgatgc	60
	aaggattctg attaatgatt ataaaagttt aaccaatctt cttcattcct tctaataag	120
	agaaaaaaaa atgagaacat ttttatgaca tttgaagaaa ggcaatttat cgctgaaaat	180
	tctactgcga tatggaagta tcagatagag aaaataaata ttaaaatatg gatttcatac	240
	gaaaaatgat aaaagataat aatttacatt ttggtgcttt actgatatga ttggagtatt	300
	<210> 34	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 34	
	cgatatTTTT ttgacgaatc aaacctTTTT gggaaatcat ttgatgtcac aagcatggtt	60
	tgagaaattt ttttccgaat tagttctgct aaaaatactc caaatgagtc tagtggaatt	120
	aagctaagca ccttaagtaa gttgagaaaa acgtttccat ttgactaaca aggctagtat	180
	atcgacatga gacagaaatg gttattactt cactcacttc atgaagcgaa tacgaaatat	240
	ctgttcactt tagtttcaat ctactatTTT accaataaac gtgttctTTT ccggataaat	300
	<210> 35	
20	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 35	

	tcttaattga ttttcttaac tcgaaacact tgtcttgatt actgtgctgt actttatctt	60
	attaaattaa ataatttcca tgaccacttc ataccattga ccatcaaact ttgatgaagt	120
	ttatgtgtga agtgccaaac aatcattcat cccttcagtt taacttattg ctgggtcaaat	180
	tcataaaaaat gcaaattatc aagcagatag taattcagtg aacgtagcgt attctcgaaa	240
	tttctttcct tgtatttacc ttatatagaa caacgtatat ttgtagcata tattcaatat	300
	<210> 36	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 36	
	tttctgagtt tgcgttacag cgccaaatct tcacggagat agataaaata cttatcgtga	60
	aattttggcg ccatgattta aaaaacacgg agataaaaaat aaaatgctta tcgggtgataa	120
	tttagcgcca taatatgaat gaattgaaaa aacaatttga gtagaaacat gacatagagt	180
	tttcgttttc tggctacgaa aatggatgaa tttttctgga atcgaattca gtcaaagaaa	240
	taggaacggt gttactaaat gatcgaaaag ctttctaaaa tttaaatttat gacgtctaag	300
	<210> 37	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 37	
	atctaaatct tcgtttttata gtggtaagac ttccatttgc tgcattcttg caaattaagc	60
	tgttgaaaaat actttttttt ttgatagatt tccaatttaa tcatattata agaagaatta	120
	atttcgaata gaatttttaa atcattttaa ctttaagttt taaaactaat ataagttatg	180
	cagatttcgc gaaaaagtct catttggttaa ttcaattatt ccaaaatgta ataattttat	240
	aaattcaaat ttaaaactact actaacttct gaagtcagga gccagtagca acaacgtaat	300
	<210> 38	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 38	
	aactttacat ttatattcaa ttttttttta ttttgtttgt ttttagaaat ttgaaaatgg	60
	gtactaatca gtgtcatttg cagcctctta gaccctcttt ataacgaccg attcgatgaa	120
	atacgatcat aatatgccag tttattgttc ggggtggagaa tgttttcaaa agttgctgaa	180
	gtgatgaagt atagtgagaa tgcaccttat tcagcaccat taagaagtaa atttttgctt	240
	tggaaattga caaagacaaa gcaggaagtt gacaacgatg ttctgatgaa acggtttcga	300
	<210> 39	
	<211> 300	
20	<212> ADN	

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 39

gtctat	ttttg	gctgtc	ttct	aataatt	cat	ttt	gtaacct	ttt	gaaatat	gataaat	gta	60
gaaat	ttttt	cttcct	gggc	tataat	agtt	taataat	gtg	ttg	tagtaat	agtttt	gggtg	120
ccgtt	gaaat	attt	caatga	tatg	ctatcg	caaaatt	agg	aatt	caaatac	aagg	ttacaa	180
gataatt	caa	aaacaa	acaa	cgtaaaa	aatg	aaataatt	ttc	ttctt	cttac	ttacca	acag	240
gcatat	catc	atcatc	ctca	aatt	catgac	tataatt	taac	attg	tcatat	ttgaata	aatc	300

<210> 40

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 40

cgacg	caaaa	atcttt	caaa	ttgtc	accca	gttct	ctaag	tgatt	ccaat	gatgt	tggtg	60
aacatt	ctgc	atgat	gtacc	gggta	atgaa	ctacca	agtt	gttttt	tgct	tttaata	acaa	120
ctcg	caaaga	ttctg	aaaac	catga	aatta	agaa	agatta	aaataat	ctg	aactc	ttttt	180
ttcatt	ttttc	cttga	actta	gcaat	tatact	gagtt	ggata	aaattt	tagaa	acgaa	atttc	240
gcaaatt	ttat	tcagt	aaatt	cagg	aaaact	cggtt	tcggt	attct	aaata	taaat	agata	300

<210> 41

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 41

gtttc	tttgg	tttat	ctcag	taagatt	ttgg	gcgga	aat	ttt	cagtt	tatact	tttcatt	ttcc	60
atgtg	ctggt	ttaaa	tttct	tccat	attag	tataa	ttttc	aaata	attgt	agcgt	cactg	120	
gtttat	tttaa	ggata	acagg	ttgg	actgca	gtgg	ctgaga	agtgt	cttgc	cgg	tcaattg	180	
tttg	ttgg	tg	atca	actt	gt	acgag	ttact	gat	atcg	aca	tata	aat	240
ccatt	cg	ttt	tcag	tact	gc	atcaaaa	acg	ggatt	atcg	g	tact	ttg	300

<210> 42

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 42

	gacccctgct cacaaggcag ttcccacaga caatcacaca tctaatacaca cacatcaact	60
	catccgacgt aggctatcaa taaggaaaat tgcattgctt tatcgtctaa ctgtaataaa	120
	catctacata atgaaattat ttcgccacta tgacaactaa tatcgcccaa tgcaaataatt	180
	tgtctcagag ttattccctt ttaacagctg ttgaacgaat agataggacg tcatgtggat	240
	gatctacttg tttcaaaggt tgaggtaaca catgaaacac atgaaaacgg taatttaaaa	300
	<210> 43	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 43	
	aaagaatggt cagcaagatg tggaaaatcg attactatag ttgaagtatg aatcgaagag	60
	gttttttttaa attctaagag aacgaataat cggcaaagag aaagttgagt aaccttattt	120
	tgccttggtt tcagtcaatt tataatatgc ggttaattgt gttaaagaaa gtacaaggta	180
	tgaaatctaa gccaaagaaat aagagaaaac agctaattgat tatttctgca ttttttcttt	240
	ttcgacacaa acttggaacc agaatacaatt gaactagtaa tcagattttg attattgctt	300
	<210> 44	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 44	
	ttagattttg ctgaagcatt gttggttaga tcgatgaaaa tataattatg agagattttg	60
	ttgaaattca gcaacaaaat tattattcat gtcttcatgc tgtcagtttt gtttttattt	120
	cttctttgac atcgggttata tttttgtctt ccaacaatat aaaaaaaaaa ttataatcaa	180
	ttggtaatca aattaaaact ctaattgtta gctccctaaa tcagctttta aaaaataatt	240
	gcttaattgg tatttgctac tattagcaaa ctgaaactat ccttttctcg aatggtgaac	300
	<210> 45	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 45	
	atgagctgat atttgatatg catattaaaa atagggtaaa ttacattaag ttagatatcg	60
	ttcggataaa ttaattagaa aaaatgttta ccaattagat cgcaatgatg taaaatttca	120
	cgtattttta ttcttaagat ttatttgcaa aattcaaaaa tatgtcttat gaaaaataat	180
	atttctgtgt aagaacaagg gaccgattca cttgattttat tcgcaaacaa tcgaaattca	240
	aaattagtaa ttttaaatat tgctttattc aaaccatacc aataataatt tgagagattt	300
	<210> 46	
	<211> 300	
20	<212> ADN	

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 46

attgattgat tcaaataaga aattttaaatt atttcccctt tttttcaaaa gatttaacaa	60
atattatttta tttgatctcc tcgttcgttc ttatcttttt gattatcaat ccatcctcct	120
ccatcatata gctaatttat tttttgcatc gtaaatacaat tgatgtatga ttgatttctt	180
gattataaaa agttagaaga attgaattgc ttaaatttaa ttattgataa tgaaatatta	240
ttatatttca aaatgatacg aagaaatatg acgatgataa gagaaaatat gatatttatc	300

<210> 47

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 47

tacgataagt tattttatatt tacacatctc catccttgac tagtgtccgt gccgactgtc	60
ggacttgaac cgacaacctta ctaattacaa gtcagttgct ctaccaatt gagctaagcc	120
ggccatctag aatgtgcgac cccgtcgtgg tacatcttct ataatcgttt ggtattcagg	180
actctcttct ttcgtgggtg gaggatcttg atacagttga ctattaaaaa tagggccttt	240
gttagtctgt tacaactcat agacaaaggc gacaatttta gcttacatct tacgttatgc	300

<210> 48

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 48

atggtagaaa attatatgaa aaaatatcat actaaaaata taacagattg ttataaggta	60
tggtttaaga atttacaaca attgattatt tatgataaaa aaaaaaaaaag taaatcagtg	120
aatcattaag atagttatga taagcagttt gtattcggta aagcgaatga ttagaggaat	180
tatgggacga aacgtctata acctattctc aaacttttaa tgagtatgac gtgtcttgct	240
tgcttaaaat tatttcaatg atcatttcac tttaccagta tgatcatgat tagacttgaa	300

<210> 49

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 49

ttagtatcga tattatcaca aatgatatca ctttcatcaa tactggatac gattttatta	60
gtatcataat tttgtggctc gcattccgaa agttttacac gtagaagatt aacctgcaat	120
atgatttatt ttatcatttt cgaatatcca actttgaaat aattcgaaaa tgttgaaaaa	180
ttttgaaaaa ttgttaacaa aatattacaa aaatatcaaa tgaaattaaa taactgtcca	240
tttcaaaaaa agaagaaaaa ttatgaaatt accaattaaa aacaggactt attaattaaa	300

<210> 50

	<211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 50	
	tgtggaaata aagtacaatt aattgctggt cgottaataa tattatatttc attcttggct	60
	tttttttttct ttccccgtga tattataaaa tatagttttt taattttaac aaatcgtcat	120
	aattatttaa aaaatactga ggtgagtaaa tgtaattggt tgctggaaaa aaagtgggtg	180
	atgagaggtg aatgaaagca gaatagttaa tgattgcac aaatttcctc cttaatctgt	240
5	gattaaaatc aaacaaaacc cgaaaagttt cttcttcgcc tttttcttct ctttgtttca	300
	<210>51 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
10	<400> 51	
	cgaaatccgc cgcgtgcatt actttgcgt tggtgattac gacgcatttg ttcgtcgttg	60
	ataaccttat caatcatcat acgtccgtta cgtatgcaat caacatcgcc agttaggctg	120
	aatcaaatg gatggcgatg atatcaaaaa caaaaataag gagtatttgc tgaatcattt	180
	ctttttctgt attattatca aaattttctc ctttccattg tttccttctt aatcaagtga	240
	atgctcattt cattttgaaa taatccaacg taataattcc ccatattccc aattactttc	300
	<210> 52 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
15	<400> 52	
	agaaatatta aactttgaaa agatgtgaca tgttctgtaa caaaagccca aaatttcgac	60
	tgctgcggct tgaagtaaaa ttttggaata tgctacatca gtagtgcaac agatggttcg	120
	ataaatagtg gtaagtgatg ggaatcctag gaatagatgg gaattgtatt tcagatataa	180
	atttgatgca tattttcata gttgattata tctacgatca cacgttgaat attctaaaag	240
	caaaactgtaa ttaactaatt gaatttgaaa atttccaaga attaaaattg gtaacaaaaa	300
	<210> 53 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
20	<400> 53	

	attgtcagga atgagaagca agttttggat acttaaggga tgaatggaac acatacatgg	60
	cagaaaatgt tagtaatcaa accattttaa ttacttagcc actatgctaa actttctaga	120
	agtatggttg aacgttttaa aaccttcgca aaaattgtat tagattatct taatcttccc	180
	tacatcaaaa cagagaatth ttgttctacg acgtgagtct gcatgtatta aggaagttcg	240
	tatcatgacg taaatatcct gagtgattat tgaattcaga aaatgagctt tttcatttgg	300
	<210> 54	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 54	
	atatgagtgt tacatgtgta cgttacatgt aaatattata tggtatatgt aaaaatgtca	60
	tgtatagcat ctattcacgt gtacgtacac gtgtatatac atatacattg atacttaata	120
	cgtatacgca tgaatgaaca gatattatat atttacgtac actagactca catgtacctc	180
	tgtatacgca tacatgtaca gatatatgtt tgacatacgt aaattcatat atgcttttat	240
	ttatgcttat attaattgtc acatacatgc cttatatttt cgttggtata aacacataaa	300
	<210> 55	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 55	
	gaaaataaaa ttagctgaaa atatatgcca ggtaaagcac acagaagaat taacttaagg	60
	taatataattg taagaatttt tatattcggc gcacctaata attttttagac cgcataatgcc	120
	cagtatttga aactggtagc gctgttcgta cttgctgttg tccatgttat gtatatgata	180
	ccattcctaa atacttttgc ggctgtggtt tccagtgttg atgtgactgg tatgatgcct	240
	aacactggat ctttccatct gcggcatttt gttgaaattc ttattgatgt gagctgttta	300
	<210> 56	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 56	
	caactgtgaa tcataaacat tacttaaatt aatgaagcta gttaacgaca aatatatttt	60
	tttatgtatc agtgctatca tataacataa aaacttactt tcattaataa atgagctcaa	120
	atattgactt ttgtccaaaa tgctcaaaat gtcgtcataa tatttgaaat gaagataatt	180
	tcacgctttt cgaagcctcc tctcacgtct tttaatcttc ttttcttctt cttgctctaa	240
	tggttctgcg aaaaaccacg gtgcaataat cactttccat aatttatata gtacataagc	300

	<210> 57	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
5	<400> 57	
	ctgcttaact cttttcattt ttcagagaat cttctctaaa attgtgaatt gatccaaacc	60
	aaagaatatg gataatgtga ttcgaattcc tggaatttag attttgagag ttttgaagtt	120
	tttaaagaga ttgaatttct gtgaccttct ggtatatttg atgtcatttc gggatgcgta	180
	tttttgccga aaatTTTTtg cctcactgca atcttggtta aagtcaaaaa aattcaatcg	240
	tagaatttcg ggtttacctg atattactgg aaatctctga tctttgttct agattgctgt	300
	<210> 58	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 58	
	ataaagaatt tgcaactctg tatacctttt tgcagtgcaa aagcggatga attcttcact	60
	gcagtgtgac agattccttt gataaaattg cttcgttctt atgtaaactt ggaaattctc	120
	ggtagttatg cttttgctag ttgaaaatgt tctgctcttg taaaacatgc aaaaagagat	180
	tatctttgtt ctattatgga aagattcttt tgaaattttg acgactgaga agacaaaattt	240
	tatcccaact tgtcatctgc aataaaaaatt tttcctgacc tgtttcttaa ccttccaagt	300
	<210> 59	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 59	
	aaaatcaa at caatatgatc agataactca tacttatctt actgaaaatt cctcattcaa	60
	gggaaataaa taattgcaat tcttgattcc gatcatggat gattttcaag caaattacca	120
	atgatatcta tcgataacga ttacagcata cagctataac ttattattga ttgaattgat	180
	gaaaataatt ttaccagaaa tttatcaatg tttatctcat tgcagtatac gatgtttagt	240
	gtgacaacac tttttcttgg aataattgtg cataaatcat tgattgcatt tagtattgga	300
	<210> 60	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 60	

	tcctgccac attctttcta ctttagataa tcaacaggag ttagttgaaa gagaagacta	60
	ggaacagttg caacttctga atctttctga ctttctttcg ttttgtaaatt tattttatttg	120
	tataaattta aaattcgaag agaaataatc caaggtccaa cttcttttttc tgtagtttct	180
	tgcgaaatgct ccatcaaaat gcaaaaatat gattagaatt ctgatggaaa ttaacaaaat	240
	cgattagata agaaaagtac aaaacagaaa ctaacttttt ctcccatttt catattatag	300
5	<210>61 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 61	
	tcattgcttt aatacttttt aacgagaatt ttctcgatca aaataagatc tgcaattgat	60
	atacgtcaat aagcgaacat tagctgtatt acacgctaatt attcacatat gatgaacgtt	120
	gtaagcgtca tacatcaaca tatatccatc cgataaataa tgaccactac acattgctac	180
	caaccatcct atcccgcac tatttgaaat gaactgagaa ggagttatcg acacaggctt	240
	cctagcaacc aaacaaaaga cgagacagat gaatagatag acagacagac gaacatacaa	300
10	<210> 62 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 62	
	agattctggt tattattgta tttctgattt atttaatccc aacttaaaga ttcattggct	60
	attgttttagc atctatatca attttataaa taaatagtaa tacctgatga aaagcaataa	120
	ataattagat gcaaatttta attagataca gtttgatgga aaacattgaa gccatgtaca	180
	actaatttat gcatgttgaa ttatgcatgc ataattaatt tatgcatgac agcaagtttg	240
	gtataaaatt aattttgtat gaagataaaa ttttataaat aatgataata atgctggtaa	300
15	<210> 63 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i> <400> 63	
	attattgaaa agaataatgt agctaattag ttgaagctgt taaaagtaaa gctaaaaaga	60
	tgatggaaat tattcgtata aacattcttt gtaaacaac agtcatttct gtgaataaac	120
	aattataatt ataaacaata cttttcaaga caataaaaaa attaggaagc attgttgtga	180
	taatcaatag ttgatagact gtcaatgtat ttttatcagt cgtgctgctt tttttccctt	240
	tcttgactca tttattttat tattttattga tagaatgtca atattctagt catttggtat	300
20	<210> 64 <211> 300 <212> ADN <213> <i>Dirofilaria immitis</i>	

	<400> 64	
	atcttaactt gctttaaaca aataaattaa aacagcccaa tgttccaaga aaaaaagata	60
	agttaaaagt ggggtgtcca aaaatttatg aattgaattg gacagttatt cagatcctga	120
	aaatacgctt ctctgatcac tgcaaatatt cccgataaat aagtgaacat taggttaatc	180
	ttaattttcc cttaactttc cttagccttt tttaaatttt tggattattc aagcattttt	240
	attgcggtat cgtttttgta aaaaaaaaaag tataattcaa cattcaggct cgacgttatg	300
	<210> 65	
	<211> 300	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 65	
	aattaataaa aagaaaggaa tacgataaaa tatctatttt ttgaaactaa tcaaacatat	60
	tcctcactgc tcaccggata gttgctttct aattttacat taagaaatat attttttttt	120
	ttcaataagg aaagttatgc agactaggag aattctactc tgaagaagag ataagcatgt	180
	tagaattatt aaaatctatg gaaatatcct taaaagaatg cctatagtag ctctgatttc	240
	gaaaaaaaaa gcaaaaaaca aaataacaaa ttctgctcaa ttgaaataaa aaactttcct	300
	<210> 66	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 66	
	taaaatatct attttttgaa actaatcaaa catattcctc actgctcacc ggatagttgc	60
	tttctaattt tacattaaga aatatatttt tttttttcaa taaggaaagt tatgcagact	120
	aggagcattc tactctgaag aagagataag tatgttagaa ttattaaaat ctatggaaat	180
	atccttaaaa gaatgcctat agtagctctg atttcgaaaa aaaaagcaaa aaacaaaata	240
15	acaaattctg ctcaattgaa ataaaaaact ttccttcaac ttccagcatc actgctgtga	300
	<210> 67	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
20	<400> 67	
	aactgctaaa aaattgaaac tagtgttaga ttgataagtg ggcagattaa aaccaattgt	60
	gttattggcc cgttaattag tgactctgaa tagctatggc gaatcgtata gtgtgtgacc	120
	gacgacgtat ctatcaaag tctgccttgt taaatttcga tgatagttta tgtgcctatt	180
	atagttgtaa cgagtaacgg agaataaggt ttcgactccg gagagggagc ctgagttgcc	240
	acattcaagg aaggaagcag tcgcgaagat taccactct tagaatgagg aaagagtgac	300
	<210> 68	
	<211> 300	

	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 68	
	gaaaactaag aagtaagtga aattttctaag ttcttttccca gaaagggttag atccaatatt	60
	tgtttttcatt ttagcatttt tatccaatga aaaatgtgcc caataaatac ttgtatatag	120
	tattgcatttt aaaaacttca gaaagcacia tgagatctaa gctcagaaat atgacgaata	180
	ccaatccttt tcctagtctt accgcttctt aacttttgtg tcgctttata aaaattaaaa	240
	ataaaaagtt gaacaatggg aattacatca ttttcatctg aatgggttat ttcctattct	300
5	<210> 69	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (36)..(45)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<400> 69	
	cttccttagc tatgcctttt cgtcacttaa gcttcnnnnn nnnntctag ctacgtatcg	60
	ttatcattta tgcttcttta gctacgtttc tccatcattt atgcttccta agctacgtat	120
	cttcatcact tacgcttccc tagctatgtc ctttcgtcac ttaagcttct ttggctgcgt	180
	gtcttcatca ttaatcttct ttagctacgt atcggttatca tttacgcttc cttagctacg	240
	tctttccatc atttatgctt cccaagctac gtattttcat catttatgct tccttagata	300
15	<210> 70	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 70	
	gatcttaaaa ttctatgaaa cttctttctgc atgggtattgt ttccaacaga atataatgac	60
	aatagcaaca gtattgggta tataaaaata ttgactgcag caggattata tttcaagttc	120
	ttttaatttc atttatttat tctttcattt acttttactg tttttatggt tttcttcttt	180
	aaaaaatatg atttctctca ctggtctctt tcatctatct atatttatat gataattgct	240
20	tatatgataa ctagctaaag ggaaataaac tttcagtcac catagcttca ttttagtaaa	300
	<210> 71	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
25	<400> 71	

	ctataactaat cagtccacta tccatTTTTtA ggttgcaaaa gttgcaatga cggtttgatt	60
	tcatacctcca atgcaatTTTT gagtctcaat ctcgagagat agatcgatcg ctttttagctt	120
	gatttagctt ggttaatggt gtgagggata ttgggcagaa attctgtcaa gcgttactta	180
	atgaaatagt aaatgatcac tgatatttat tgtaaatgat acttgagctc tctagattat	240
	gaactggaag gttttcgata gaaataatcg atacatatat tagaatcgac ttcttttttc	300
	<210> 72	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 72	
	tcatacttttt cacatttcat ttaatcatca ttttatcaat tcctatTTTT aaacaaattc	60
	ttttcaaata ttctctcttt ccttctcttt ttgttttccg cttattcatt ctaatgatga	120
	acagatgtag aaaatttgca ttctattgct cactacaatt ttgagtagaa tatatttaat	180
	tatttgattc gagacagatg gttatagcct ttagcttcag cttctcgttc aaattaagta	240
	cttgtgacct ttccaagtac cattaaagct ttctgcggtt tcctaattag aaaaaaaagg	300
	<210> 73	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 73	
	gcattttaag ttaaaagtat cacgctgcat gacacctcac gtttgctatc tcaaattgag	60
	taggttagaa tctttttttg gctactattc aaatattaat aataaattgc tgcaaacaga	120
	tttcacaccg gaaaaaaatt aaatttttct agcaatgttt taactccctt attaaatatt	180
	tatagaaaat cgactactta aaaagaattg actaacattt ctgaatctct gcagagattt	240
	atagatggat tagcatccta caagttttta tctttttgct atatttccat tattttttta	300
	<210> 74	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 74	
	gataagacgt cttattttgt aataattcaa aaattaatta atatagaagt aagatcttga	60
	taataattaa tatgctcaaa tttcttaatg agaatatggt caggatgaag atgaagtga	120
	agaaattgat agattgagga agcaattgct aattgaaaca gaacagctcg ttccaattc	180
	tcttaaagat ttactgaaga aaatttatta tccacttgaa gaagctattg atctcaaaat	240
	tcatacagaaa ttaattcaac aaattgctgc cttgttgaag tgtattagta tcttgataa	300
20	<210> 75	

	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 75	
	accgcaaaat acctaaaaat ttctataaca acgattaaca cggcctcgaa ctggaagcat	60
	attaatccat gcgtggctca aacttcaatc ataaagacaa gatctagaga tcaacacaaa	120
	atggtgaatt gttaccctat cgttgctaaa gtttgagaga aaaaagtgct aaatcaagta	180
	gtacacccaaa tttagttaat attaagaaat caatttagta ctgaatttaa acaaatgaaa	240
5	ttttacgata aaataaaaaa gtacctgata aaacagcgct cccccgttat tcccattgct	300
	<210> 76	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
10	<400> 76	
	tataagacta gtaaacagat cgtaatataa taaatatcga ttttatttta aattttcgaa	60
	aacttcacaa tctatcgata tgaaattaaa gatcaatttt taatttccat aatataattta	120
	gattctatcc caacatcact catctttatg tcaacttatt taattctctt attaacatta	180
	tatttcttgt ttacaatgat aaattttatc aattttctaa tatgatagaa catcttcac	240
	atctgaagat atgcttttct catctttgta acaattcgta tcgcttctga ttttactttc	300
	<210> 77	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 77	
	gttttattat tgcttattga atagtataa taacactttg atatgatatt gttttgttgc	60
	gatcattgta ttgattataa ccttaattaa acgaggatat tatgggaaat gtatttatta	120
	caaaattaaa tatgaaagggt tgaagtcttg acgaaacttt caaacacatt tctcgaattt	180
	tctctgcaaa aatatcgtaa cgatttttgg aaattatgaa gtccaagaat tcaatcgaga	240
	gttcgccatg tcactttggc tagtttcgtt tgtttttaat atttcaatca aaagtcaatt	300
	<210> 78	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 78	

	ccttggatat tgttcttgac atcgttgac agaaggtcac cgtagtggtc ggtgagcgag	60
	atggaattgg actcagggtt attctccgtt ttttcatgt ttttgaattt tagagagaaa	120
	ataatgtttg tctgaatggt tagcaaacta attagttttt aagttatcag gaactcgaag	180
	tatcttcttt tgcacttctt taacctttt catcaaattt tttaacagta acaagatttt	240
	tttgagaatt ttcaaaatat ttttgacttc tgatgatatt tgatgagaaa accatcactg	300
	<210> 79	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 79	
	agagtattat tatacatgat gatgatgatg atgatgatga tgatgatgat gatgatatga	60
	tgatgatgat gatgatgatg atatgatgat gatgatgata atgataatga tgatgatgat	120
	gattaattgc ttatttttaa tgattgataa ctttaaaaga aatcattgaa atttgatcga	180
	ataaaaattt tcttaaaaaa agcatttgct atttatatag taaacctata aaaaattact	240
	tatttttatt actaatattc atttgattgt atgaaagaga agagaaaaaa aacctttgca	300
	<210> 80	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 80	
	tggtatcaca gactgggtt taatttcaac aatcggttga cgatcttttc gggatatgcc	60
	tataccaga aatgaacgta tgccaaacga tggtatgttt gatgcaacag acgacgtcaa	120
	cttaaaatgt gttttttttt caaaaattca atatttttag tttaaaattg cacgtcagta	180
	aaaattaatt cataataaat ctctttgatt tcttcgttct cttttttttt cagaaaaaat	240
	tgaaatttta catacctgat ttccaagagc atataaagca tcacttaaag cattctgcga	300
	<210>81	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (263)..(272)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<400> 81	
	tccttttcat gatttgtagc taaccaataa gatgtgtata tgttcatata ttactctcc	60
	cctgactctt ttacactctc attctctcat ttgttcattt agataagtaa tatgcgcctt	120
	tctcttcctg attctctcaa tctttcatcc ctctcatctcc tcaatctttc tccattctc	180
	tcaatctttc ctgcattgca ttcatgatg aaacacgata gtattaataa gcataatttg	240
	ataaattgaa ataatttttt ttnnnnnnnn nntcattctc tcaatctttc ctgcattgca	300

	<210> 82	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
5	<400> 82	
	tttgaattaa caaaatatta acaattacaa ctatttcgga atttaattta agaataattt	60
	aattaatcaa tttcctatatt tgtatttttaa aaattaccac aataattatg taatttttgg	120
	gatatttgaa actttgaaaa aagtgggtatt gtatttgaga ataaattaat taatgtaatt	180
	cttgctgctc atcggttccat aacttacaaa tattttctcggt tatttttattt gagataattc	240
	ttatcatttc ttccatagct ttcaatatat ttataactta tttgtaatca ctcttatcac	300
	<210> 83	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 83	
	ttgagatatc aaatcaagcg ttgcatatatt atagtacact ggtgtagctg aaatcgcgaa	60
	gagaacacga aaatcagaga agtcaatggt tcctttgtgt tggatttcac atgaaagcat	120
	ccttatgttg tacatgcgtg attacaatat gatacaagat gtaagctaaa aattgtttta	180
	tctttgtcta tgagatgtag ttcatatctt ataataaagt cccaaccctt aattctcata	240
	ttcacaaccg tatcagaatc caacacccaa ccattataaa gaatgttctt cgtcgaggcg	300
	<210> 84	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 84	
	ccactatcgc ttacactttc tttatcctgt tcttcttcat ctttcgtttt ggactttatt	60
	ttactgtcag gtgacaagca aagtaacgat gttggacttt gcgaagatgt ggatggtacg	120
	ctagaaaaaa aatgaggatt ggttaatatg tctaattatt acatcgcttt tttttaaatc	180
	ttttctaaaa ttaaaactgaa taatcaactt atttgctatt cagtttatct tattttttat	240
	caacaaaatt cgaggaaaca aatcgcttat cagaataatt gttttgatca acaaataaag	300
20	<210> 85	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 85	

	caatcccaca aattcagtgt gtcggcgggt cagcgaaggg aaagtttgaa ccgaggggtat	60
	gtacaaattg tgataatttt gtgatgacgt agtaaatttc atagttttgc atgctttaat	120
	gttgatagtc gcacaatcct acgttgatta aatttagcta ttagatatcc tactaaatta	180
	tgttgttcat aatttttgtt tttaaaatgc tccacttata ttttcagggt gtgcagtgct	240
	acaatagggg ttatgacggc aatgatgtcc aatgggagtg taaagcggaa atgagcaatc	300
	<210> 86	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 86	
	tcagataaat tgtatttgat gttaattcaa agaagaaaa aataatcagt agaatatgaa	60
	tcgaataata ttcatacaac cagtttattc attattattc acttttaacg tctaaatgac	120
	gtagctacgc tttttttctc gctttcaagc ctttactgac caagattaat gtacattctg	180
	ttgaacaaga ttaatcgaca ttctatcgat caagatcaag cttttactga tcaagattaa	240
	taatgacatt cttctgttga tcaagattaa tcgacattcc attgatcaag attaatcgac	300
	<210> 87	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 87	
	ctctctaaaa cctattggtc actaaacttg cactgactaa aaactattgg tcatcagact	60
	tgtgattcat tgaaaagacc gttagccgct aaaattatga ttcactaaaa aaaatctatt	120
	gatcattaaa tctgtaatca ttgagaaact acaatcattg gtcattaagt ttgtgctctc	180
	taaaacctat tggtcattaa actgactaaa aactattggg cactgaacct agagtctatt	240
	aaaaaaaaaa tcattgtatc aataaattta ttgtttacta tcaaattccat tgattactga	300
	<210> 88	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 88	
	tctaaaacct attggtcact aaacttgac tgactaaaa ctattgggtca tcagacttgt	60
	gattcattga aaagaccgtt agccgctaaa attatgattc actaaaaaaaa atctattgat	120
	cattaaatct gtaatcattg agaaactgca ttcattgggtc attagtttg tgctctctaa	180
	aacctattgg tcattaaact gactaaaaac tattgggtcac tgaacctaga gtctattaaa	240
	aaaaaaatca ttgtatcaat aaatttattg tttactatca aatccattga ttactgaata	300
	<210> 89	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	

	<400> 89	
	aaaatgtatc aaattcttcg atgccataaa ttatacagac ttgattggca ttttttctaa	60
	ctttcatcat gaaccattct atttctaaat tgatccatta caaaatcaac tttgtgatat	120
	catcaatctc agtcataacg agaaataatg ataataataa gcgactatca tttgaatttc	180
	ctgaatatcc aagatgtaat tacatctttt ttttaatgta atcaaaattt cttgccatca	240
	ataatttttc aacatatgct ttcatcgact gccttatgca gatcgtaatg atgacagcca	300
	<210> 90	
	<211> 300	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 90	
	attgattaaa aagaatcaac attaaatttt tgatatagtc gagaaatcct tcgtgataat	60
	tcttttagaa caattcttta cactaaactt gtatttactt gcttattatt tgtctaaaga	120
	tactaactat ttgtcagtggt aatttatgat cttggcatta ttgcatataa cgctttccta	180
	aaatctgaaa tttttcagta ttttaaaaaac taagacgatt attaaatatt actcaaagct	240
	tagaactttg attatactaa tcaaatacaa aatttcatca gcgatttttg ttgtgtcatt	300
	<210> 91	
	<211> 300	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 91	
	atTTTTTcca gcagaattgt catcaaaaat cccatttttg atatcctctt catcgaaact	60
	tgctcctgaa tccagagAAC aacgaagaat gtgtaaatct atttcagtag cctgctcatt	120
	gtgcaattca gcgactttat ttctgtgctt caagctaact tcttcattat gccactcctc	180
	ttctctcgct atTTTTTcgc tatctaattc aaaatcttcg tctgaaacgg aatcaactcc	240
	tgacgatgta ctcgacactg ataataattt catgccgatt tttctctcaa acgaatcttt	300
	<210> 92	
	<211> 300	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 92	
	gaatgaagag caaaaaaata gtcacgacca cctgcaataa aaacagcatc tccgtaaaaa	60
	tgattgaatt gattcccgaa atacgagttt atcaaattga gaattatgca aattaattat	120
	cagcatgcag atttactgat tttatatctc tcataccgaa attaaggtga tgttttccat	180
	ttctttgttt ccacaatgtc ttctttgtga atcgtttttg atcaactatt aatccgatcg	240
20	aatcaatcct ccaaatatga gtttattcaa cgtaacaaaa cattgtccga gataatcaaa	300
	<210> 93	
	<211> 300	

<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 93

tggaatttc gaaatcgaaa ggatgaagaa aaaggatcct tgatctatac attaaatatac	60
accatatcaa ctagcatggc aagtcaaagt aatgttatca tttaaataaa aaagatgaat	120
agtaggacta cagggttatat tgttaaaagt cgacaaatct ggagtaattg acagagatca	180
acgattaaat gtaatggatg atcttatctt cttttttcaa ctacgccaaa atgaaaataa	240
caattgaatt tgtcgaataa gaaactaaca ttttgaaaat aagattgaac atttataaat	300

5 <210> 94
<211> 300
<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 94

ggttggatca ttatcgacag aacttttagaa gtttcttgat aaggacgaaa agaagcagca	60
ccattgctga tctaaacaag gaaaaaagac cttttttgga atattgaagt ttttactgat	120
aggtgcgtgc tgtgtactgt gggcataagt acaagcttca tgctccgcag cgtgaatacg	180
tgctgcatgc atactatgca gtaaagggtgc gtgtcgtatt gctcaataag tgtataaatt	240
gctgcttttc ttgcatagtt aaatatcttg ttttcatttt ttccgctatt caaaataaat	300

10 <210> 95
<211> 300
<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 95

gttgggattt cagactctca ctccggtgtcg tttcacagtg atatctgaat cgaagtcaca	60
agcaggtatg aatgcataac aactaatatc cattgcagaa acaaggcaaa actgagaagc	120
tcgagcaata tagctataga agctggtacc acagatgaca ttacatggta tttccatttc	180
agcttcacaa acattgtaaa tagcttgctt cgatgattca atatctcgtt ctacgatatt	240
cttaaagtaa tttttattta tttgaagtat agattacatc catgttctat ctatcatttc	300

15 <210> 96
<211> 300
<212> ADN
<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 96

	tgttctgaac atctcttttt gattatcttt ttttaattcct ccattatttt cgtttttttc	60
	gttgtgaatt aatattgttt gtctttgatt cagatgatat tttcggatcg taaatagatg	120
	gcatcggcat aagcgtattg agaagcattc aatggtgcac tcttgcttct tttttttttg	180
	aaatctttct cgataatcaa ataagtgcag gatgccaatc attaacaatt tcgttccact	240
	ttttcagttc ttattcttat aacaccacat ctcatcttgc attttgtcgc caatgatttt	300
	<210> 97	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 97	
	ttttttcgag gtcactctgg aaaaataaat catattttta aaagacataa aataaaaaat	60
	atgtatatat aagaaaattt ttactctgaa tttcttaaga aaattctcga ttctgttttc	120
	cataaattcc ggaatatgtt gtccctgaat taagaattcg attccttgca caccattatt	180
	tcgtctagtt cctgtgtgaa caatgtaacc tggaaatgaa cacataaact gtaatatattt	240
	gagcttaaaa taattatgag gatgcgaaac tgaagatatt cataaatgtt taaaaaaaaa	300
	<210> 98	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 98	
	gtccatgcat tgcttttcgg aagttagtgt agattcagtg aatatttaat accagtctct	60
	ttctaattca aaagagcctc ccatttcttt tttcagtttc agtctctgaa tcagagcgtg	120
	taatctacca ctccattgcc gaaaacagct cgatgtattt cctgctacgt agtggttaga	180
	attggcgtat gccacttgct cattattcgc gcatgaagtg taactgtgaa tagaatgata	240
	ctactgttag aagagaatgc gttcacttta ttttaacatta tactgattca tttcttcttt	300
	<210> 99	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 99	
	agtgaacgag aaaaaacaga agaagagata gcacatcaag atcgtgagaa attaattaga	60
	caagaaaaag ctctctttac acaaatatat cagggtttct ttttcttgct ttcgaaagt	120
	atttgaatta tctcatttct ttgaatttta taagaaataa ttttaatttt ttttgaaatt	180
	ttgcctattg agctctaaat tttgtaaaaa gttttctagg atgatgtag caaagcaaaa	240
	aagaaatcca aaagtgatgg taacaaacag gaagatttta tagtgaggta cgataatacg	300
	<210> 100	
20	<211> 300	

	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 100	
	tagacaatat catccttcct ttttttttgc tcaattttctc tgctcattgc tttgatgata	60
	atggtaggtg gtataatgaa acgaatagat aattgatggt cgcaaacatt tgctgttaaa	120
	tttcagtaaa gaaattgacc tttttgcttt gtggttgatg tttagcttca ttttcttctt	180
	gttcattgtc atattcattc tctcaaaaact tcttgcttag cgatgctaata ataaatactg	240
	gaagaatgcc tttgctttgt ttttagttgta aatcatcacc aaggtatttt tttgcaaaat	300
5	<210> 101	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 101	
	aagatgaaac taaaaaaaaat tatttcgaaa aaaagaaaat aaaattaatg aaataaaaagc	60
	aaaaatgaac aaaccgtatt aatttttaaac aataaacaat atcgaaatcg aaaaatggac	120
	tattattgat gaactatatt ttcaaaaatgt gaaaggtcaa agtttgtttc aattatgata	180
	aatacaattt aaaataagat taagctaaca aataagttga gcaaattgat gaaacaaaca	240
10	aatcagaata tattacagaa aatgatataa catgaaaata tattagacca attattttta	300
	<210> 102	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
15	<400> 102	
	ttgaagtttt cagataaaact ttgataaaaa attgttctat gaattctcaa atttcaatta	60
	gtgatactta tttcgaaggt aattatgcct gattgaatct tcaatatcaa caaatgaaa	120
	atttttagtat gattgttaac tcatacacct ctaattaaag gtattttctt tatcccatga	180
	aatgaaaatt tattaagaac ttagaaagct acggtatgcc tttgatgcaa aagaaagatt	240
	catttttcatt aaatcatggt taaaaaaaaag agcaaagagc aaaaggtgat gaaagttttt	300
	<210> 103	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 103	
	ttctatacga aatatttgtc tgccataaat ctactcagga actcgataca tcaaaacata	60
	agtacgcttg ctctttatct ttcgtttgaa aaataaatag atcattttcg cacttacatt	120
	tcaatttcaa ttgctttatt catatctttc tgtttttact tactgggtatt taacagtcgt	180
	tgttcacaat ttaatgatct atgaaacacc atttaattgt atttggacta acttttcgac	240
	aagcaaaaga ttaaaattgt cttcagatac agttataaat ttacattgaa gataaatgaa	300

	<210> 104	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
5	<400> 104	
	taacgatctg tatatcaatg gaataatatt cagttcatgt tgtactcgat atgagataga	60
	attacaattt tggaacaaga taatctcaac agctattttc aagaatagtt aaattaggat	120
	accattcaaa gaaactttta aaaatgattt ccatacatta atgctttttg tgttttcgct	180
	ctcgaccaga atccaggaat tgtccattat catcaatttg attaactttt atctttattc	240
	taattcttca acatttctct aattgatatt agtttcaata ttttaataag taaaaattta	300
	<210> 105	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 105	
	ataatgtggt attgatcaaa ggatttttag ttacctacca gatggaaaaa aagcaagttt	60
	acgaaaacag aagttagcat caactttcat ccatgggttac accgtatata atccaatcga	120
	ctcatacttt atgttgatct gattttatag cagataacta gttaccttgc tcagcagcag	180
	ctaaatcctt tctatttgct taataacaga aatatttttc attaacaaag aaattatact	240
	ccgtgtttga catttcattt taatttcggt ccaaaaatga aaaaagcttc gtccggaaat	300
	<210> 106	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 106	
	attattttgt agtttttcat tttttagttc aattttcctt tgcttatttt aaatatgcca	60
	ttctttattc agactcatag cgaatgcata tgttcattaa tttttttagt tacagttaca	120
	aattctcaat ttctctttta tcattttttt ttccaaaaat agtctgagca ctcaaccatt	180
	cattcaacaa ttgcagcttt ttttattgga gccttgtcaa attatcaatt cgtttccatg	240
	tttattattg aaataataaa cggatatttag gataacgaag ttcgcttagc ttctttgact	300
	<210> 107	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 107	

	aaaaattcag gtaatgagat cagtaatfff ttttggtcac tttgctgttt cttatcagct	60
	cattgtttatc catatcaaat gagcgaaagt gtgtatcaca tattggcaga gtgtaatcta	120
	tgaagatfff gcgtatcaaa gtaattatga gagaactgat aatfffatfff taaagtagta	180
	gaaaactcga attaaagctaa taaataatcg gttgatatcc atgaaatgaa ttactaatga	240
	aatggataat tgagtaataa caaatgatat tcatgaagaa aggcaggfff tfffttaatag	300
	<210> 108	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 108	
	tatactttaa acaagaaata caattaatgc caatagcaga gtgaaacttc tgaaaaataa	60
	tgagttgaaa ctggtaaaat taacatfffta ttagaaatff cagaaactta tgactcctca	120
	tggcactatc acaaaatgft tgaaaaaaat tgacagctcg cgtcgattgc aaaaatcatg	180
	attcctgata tttagtatcg aacatgtgac aaataatata aagacctaac cataaagcac	240
	tgaaacaact cgcggaacaa aaaaatftat ttgcataaac acggaatacg atcagaaaaat	300
	<210> 109	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 109	
	gaatffftfff agaaggcttg aagtcgagaa tattagagac tatatcgaag acttaaataa	60
	tcctggtaat cttctgtatg aatcaaaatt acctogaaca gaaccattca gcacatcacg	120
	agataattca tggaatgaaa ctagccaatc agagcgfttg aaaagaagaa agttatgaaa	180
	tgaccttaaa atcaatffta agcatgtcct cgccatataa gcgfttgaaaa gttaggatag	240
	aatcaattat caaaaaaata tgttaactag atcttatcaa tcaaaacatc agaaggaaaa	300
	<210> 110	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 110	
	atatgataat agtgaaacaa ttccatcaca ataaatatta tcgattagga gataaattaa	60
	cattgatgcc tcaatffftgg tcaacaatat atatfftgcta ttagcattff tattaatcgg	120
	ttffftatctg acttgacata aattgaaata gaaaaaattg aatctgttcc ttgfttagatt	180
	ttcttctaaa aattcttgaa atacaaataa tttcttaaat ttcaatatff ctacataatg	240
	tattgcgaca aaaatgctaa tgattggctt attattatff cgaataatff tftaatcaaa	300
	<210> 111	
	<211> 300	
20	<212> ADN	

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 111

agctcgaaga tcggacaaaa tttgttcagc ttgttgcctt gaggccttag tctgaaaaga	60
cacttaaaag tataaacaaa ttatattcaa aaaatcctat tttgcatttg cgtcttaatt	120
tttgcttttt gcaaagtttt ttccgagcaa gtttttctat ctctgaaaag attatatcaa	180
ttaaaatttc aatttaagca atcattgcct ctctgagttt ctgtttcagc aaataaatat	240
caccaccacg acgctgtcgg aagaaagaaa cgcctttccc aatttctcgt ctcaactttt	300

5

<210> 112

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 112

taagaaagct gggagatttt ccaaaaacac tatttcccac gatttgttgt tttctatgat	60
caattcttaa tcaaactctg aaattctcaa attttcgatt tctatccaac ttctacatat	120
tttttttagaa aattcatatt tagcaaagct gagtgtagaa ataattcata cttgcaattc	180
atttttctta aattttcgaa tttcttaaaa agtattttca aattacctac caattttgat	240
tggaaaattc gtggatgcta aaaattcaaa tcaaaatagt taaacagtat tcctaattgt	300

10

<210> 113

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 113

aatttaaaaa acacatcgac attttgcggt acggtaatga ttgtttacag taactaaatg	60
tgtcctacgg tagtaatact cgtgtacgta atgaatgagt atagtgaccg gatatttcct	120
tcactagtag gcaatattaa gaagtatttt cattttcata ttctatctaa aataaaccga	180
taaaatgggt tttgaattat tactttttca ttgttatttt ttgatcctaa attgtaaaat	240
actgtaataa tttagctaatt ttctatgatt ctattcaata tgcttaaatt aaaattctaa	300

15

<210> 114

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(72)

<223> n e s a, c, g o t

<400> 114

	tcgatatttgt tgtatgtaat atagaaatat tgttttaaatt caatatgtag aaaaaatttc	60
	tannnnnnnn nnaattaatt acatattaac tcgatatttgt tgtatgtaat atagaaatat	120
	tgttttaaatt caatatgtag aaaaaatttc cataataaag acgaacagca tttataatta	180
	tcaatgataa gttgaaatta attcatcaat gataagttga aattaattta tttgaaataa	240
	tttctttgaa attcgaatat agacgagaat tttttttttt ttgctaatacg tttatcaaata	300
	<210> 115	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 115	
	tctagcaata taaattacaa gaatatgccg tccaagtatt tcagaattta ttattaattt	60
	ggataataat acattgtaaa tactgcgtat tctggattat tatgcactgc ataataacat	120
	gcaatttcgt ctacatatcg cgaataaacg ccaaaagatt tctcgataaa agaaaatata	180
	agaattcgta aatgaatggt gtgtcagaga tatgtgttaa ttcataagtc aagatgttgt	240
	aaatcgatcc atattagtaa tcatattttac gtgctcgtaa ataaaagcgg tgattcctgt	300
	<210> 116	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 116	
	atcgaaaaaa gatgatctga tgacggaagg cgaaatgtct gcagaagcta agatgacgga	60
	agaaaaaagt gaagaaatga aagaagaagc tggtaaaact cagaaggaat gtaaaactgg	120
	agaatcgaaa aaagatgatc tgatgacgga gggcgaaatg tctaaagaag ctaagatgtc	180
	ggaagaaaaa agtgaagaaa tgaaagaaga agctgataaa actcagaagg aatgtaaaac	240
	ggaagaatcg aaaaaagacg atctgacgac agaaggcgaa aaatctgaag tagatgagcc	300
	<210> 117	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 117	
	actaatgata agaaacggag ccgacgattt taggaaatga ataataacga cattgacaac	60
	cattgttaga aaattgatag tactgataat aaaagctagt tatagaaaat tgataataat	120
	aataaaattg ctggtagcaa atgtctagaa gtgataataa aattaatgat agcaaattgga	180
	ttagcaatga taattaaact gatgatagcg aatggattag taatgataat aaaattgatg	240
	atagcaaattg actaataatg gtaataaaaag ttaatgctag tgataaacttg tattttaagt	300

	<210> 118	
	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
5	<400> 118	
	acagtttata gttacaatat tctccggtga ctaactgtat tttacaactt ataattatag	60
	attacaaaat atattatagt agttttataa ttacagtatt cttaagtga taactatact	120
	ttacagctta cagttacagt agttttctat gtttttgaat attaatttta catgggtttt	180
	cctagtttca gtttcaaaat tttcagatat tttatgtgtt aaagcaaatt atattcgaga	240
	tataaaaagt actgggcata tcttacaatt ctcatccttc tatattggaa agaattgagt	300
	<210> 119	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 119	
	gtattgggac cgcgtatcgg gaaatctgaa agaagtcttt aacagtattt taaatgaata	60
	attcaaactc ttacttctta atatattaat ttatgcgtat atatgcagta catagcattg	120
	cttaaatctt tatttttccg cgggttaaaac cctatgtaag ataagggagg tgattgtatc	180
	tgcgccgtac tccttgtttt aatctacctg cttgttgtat atcctccaca tattgtaact	240
	gcagcttcac atttgcatat atagtaaggg catcgttggtc tccagaagag atatattatc	300
	<210> 120	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 120	
	gctgcccga tgttacaatt aggacgaaag taaaagtagt tgactgtagg tatgacgata	60
	aaggaaaaat ttgtatctta agactttaca atttctaaat attacgtgtt ttatcgtgct	120
	aacatcacga attccatatt cacaaaaaaa attttgtaga actccatctg gtttggatga	180
	atgtgctaca gttgaactgg atgatggaac gaaattgcaa acatctctta ttgttagtat	240
	tttctaaatt ctgtgaaatt ttgcaacggc attcatgttt aattattaat ttggagaaaag	300
	<210> 121	
	<211> 300	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 121	

	aaataagcaa atccgaaagt attacatata cggactaaat attgccattc attcgggagt	60
	ataccattgc aaccattggg atttcatttg atcgagaaaa ctagtttttg tagtttgga	120
	taaagagaaa tggagagagg aactttcatg atcaatttct ttacgtactg aaattcattt	180
	ctatggatgt tctttttcta tttcattctc ctcagcaa at acagtccgaa cagtcacaa	240
	ataagtctaa aaggcatgaa taatataaac atcagcaact ttttaa atga atgcttatta	300
	<210> 122	
	<211> 300	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 122	
	atttctataa acatctcttg cattgattaa tttaacatgt tgcaataaat atttcttact	60
	tttgaatgta tcatttacta gaaaaaactt caatcgagga aataagtttt aaaataaatt	120
	catatttgaa ttcatgtcag ttcaaaaatt ctattactat aatacatgtc tcttggttgt	180
	atcttttttt cttttgaaat aatacaatca aacggtttcc taaattttca tagacatcat	240
	attttaaaaa aaaatgcatt tgaaaatttt cgaaaatcaa tgaactta at tgatgaaaaa	300
	<210> 123	
	<211> 300	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 123	
	gcatgtgtat gtagtatttc tttgtaaaca acatatctaa tctgtctgtc cctttaacat	60
	tatagaatag tcagttagtc cgctatttat tttataaca aaatatctca cttaacttcc	120
	atttctttcc taaataattt tgtttcgcta gatctttcct ataattttca aattttcaaa	180
	aatgaattaa tcttttattt atatatgtgt atgtatgtgt atgtatgtat gtgtacgttg	240
	catatatgta tatgtatgtg tgtatgtgtg tatatgtata tgtatatgtg tgtatgtgtg	300
	<210> 124	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Dirofilaria immitis</i>	
	<400> 124	
	tatgcataat gtgcgaccag ccaataatgt cttcaaacca taattatgca gaaataaatt	60
	ttttccagaa ataatttttt tttttttaca tatacttccg atctgtgaga aaatacattt	120
	gaagtgaagt gtgaagcaat gctacttttt caaacaacat tgtgaaaatg gattaaaacg	180
	caccaatgga gcaagagatc gtaagtttcg ttccgcatgt cctgtggcaa cgtgtaaacc	240
	atccgttaac gatatatgat gtaaaagccg acacacccaa attaaaatcc attataaaca	300
	<210> 125	
	<211> 300	
20	<212> ADN	

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 125

aaatggatcg tattcacttc gtaagaactt agtgaacgaa aaatcaaacc atcacaataa	60
ctttactttt tttctttttt tactaaacac actatcctat gaaaacaaaa tgtccaaata	120
gattcatatg ataatgaact gtgaagttat ccaatctatc agttctcgaa gagggaataa	180
ataaaaacat taagcaaccc accgatcttc gctgaccatc tccttcttca ttagcaagaa	240
gcaaatcttg tggatgatatt tctgcaacca tctgcaaaat aaagcacgaa aaattaagga	300

<210> 126

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 126

tttgatatgc aatcaactaa ccaaatacaga attcaatgca ttctgataaa tttcttcaat	60
atcgtgcatc aattcgacat catattttga cagtgatgct accttttttag ccgtatttcg	120
gaaaaatatg aattcaacca gctgcgtccc aaaatttaag gctgtagcaa gtccagcaac	180
aaccagccct acaactgaaa attctaaaaa ctgggttcacg tgcttatcat taataatttc	240
aacactatca ctatctccac atgaacttga tcgattataa tttagtagaa ctgaaaaaaaa	300

<210> 127

<211> 300

<212> ADN

<213> *Dirofilaria immitis*

<400> 127

acaaattcgt tttaatattg gattacattg aaattgctga aataaagtgg aaatattgaa	60
aagcatttta caatatttgt taacaacatt atattttaaag aatatacacc ttgggtttaa	120
tggtaaaata atctcaagaa ttttcattag gttaattttt ttttatttat ttatattcac	180
aaaaaattgt aaaagaaaac aaaaacaaca ataataacgg tgacaacaac aacaataata	240
ataacaaaac tatttgttgt gattttgcag cattgatgta gtggggatct tttggagcga	300

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación del grado de respuesta de un nematodo de *Dirofilaria spp.* a una lactona macrocíclica, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos que posee al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118 e incluye el sitio polimórfico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos de la SEQ ID NO: 118 e incluye el sitio polimórfico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento que tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos de la SEQ ID NO: 118 e incluye el sitio polimórfico.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 118.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento determinar el genotipo del nematodo en un sitio polimórfico en una molécula de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO: 118.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la presencia de un nucleótido alternativo en el sitio polimórfico indica que es probable que el nematodo sea resistente a la lactona macrocíclica.
8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el nematodo de *Dirofilaria spp.* es *Dirofilaria immitis*.
9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la lactona macrocíclica incluye ivermectina, selamectina, milbemicina oxima o moxidectina.
10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que incluye aislar la molécula de ácido nucleico del nematodo y, opcionalmente, purificar los ácidos nucleicos antes de determinar el genotipo del nematodo.
11. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el genotipo del nematodo se determina por secuenciación de ADN, procedimientos basados en hibridación que incluyen oligonucleótidos específicos de alelo, análisis de micromatriz, procedimientos basados en enzimas, polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), fusión de alta resolución (HRM) o estrategias basadas en PCR, RT-PCR o qRT-PCR.

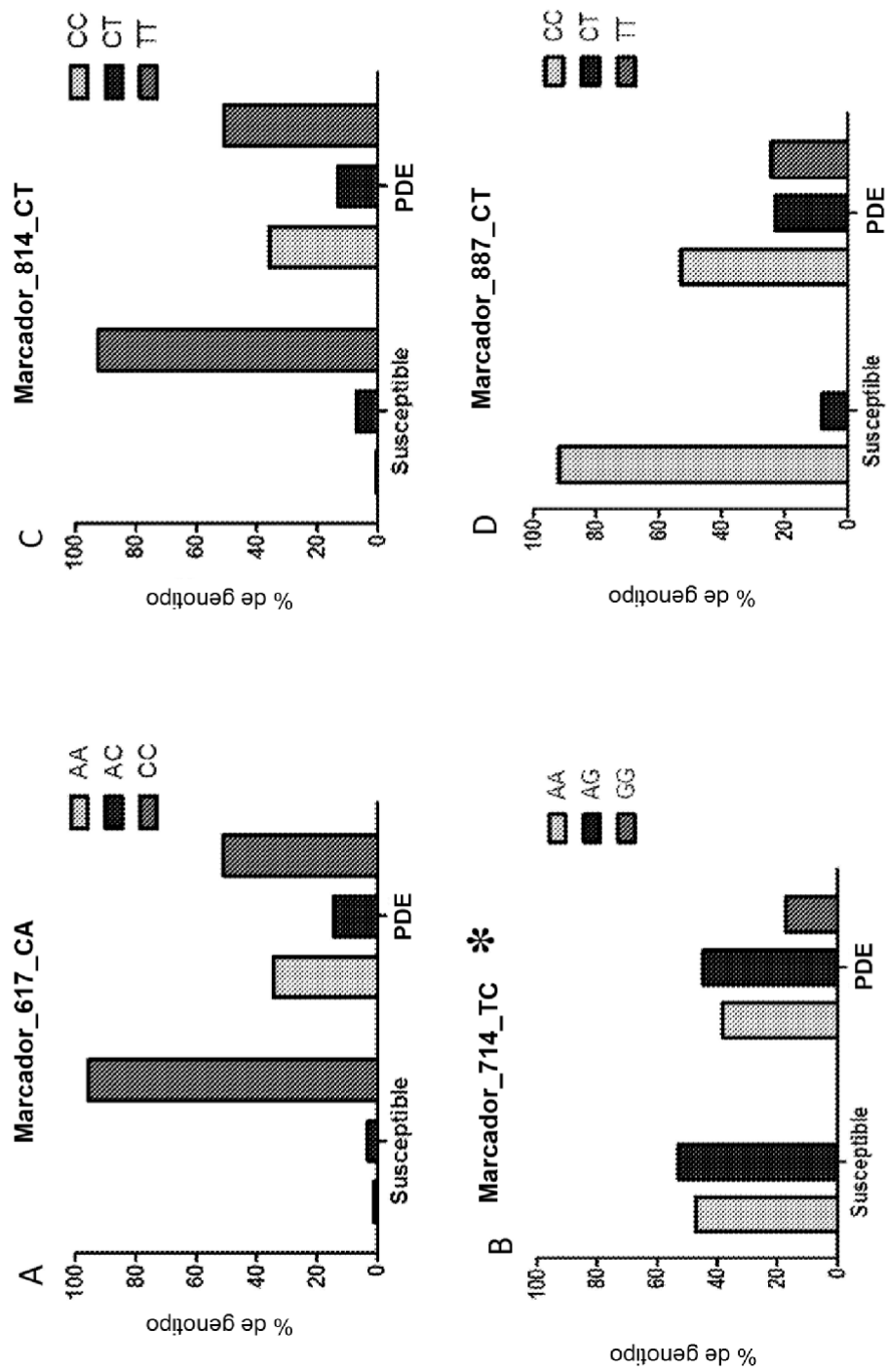


Figura 1A

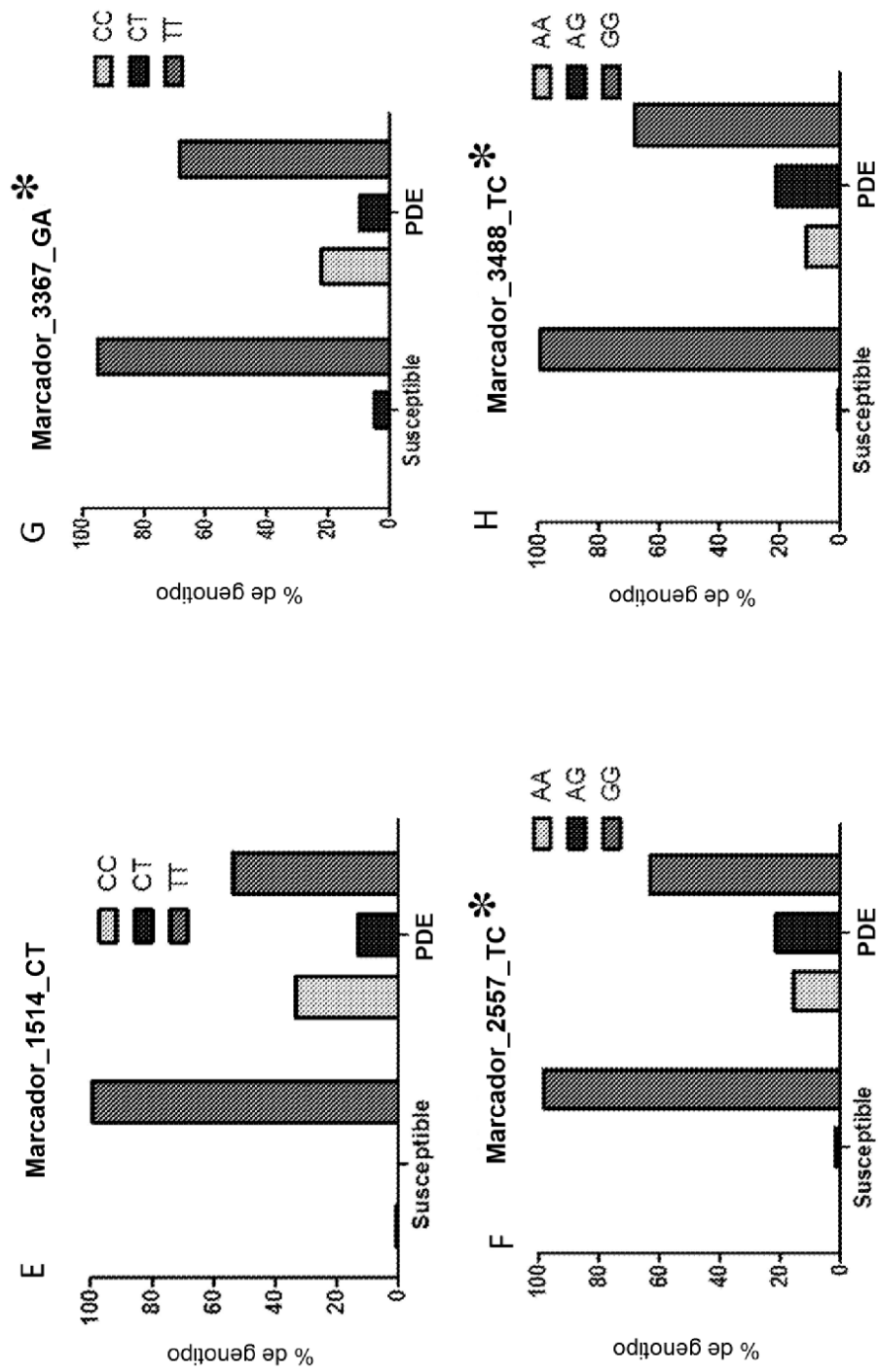


Figura 1B

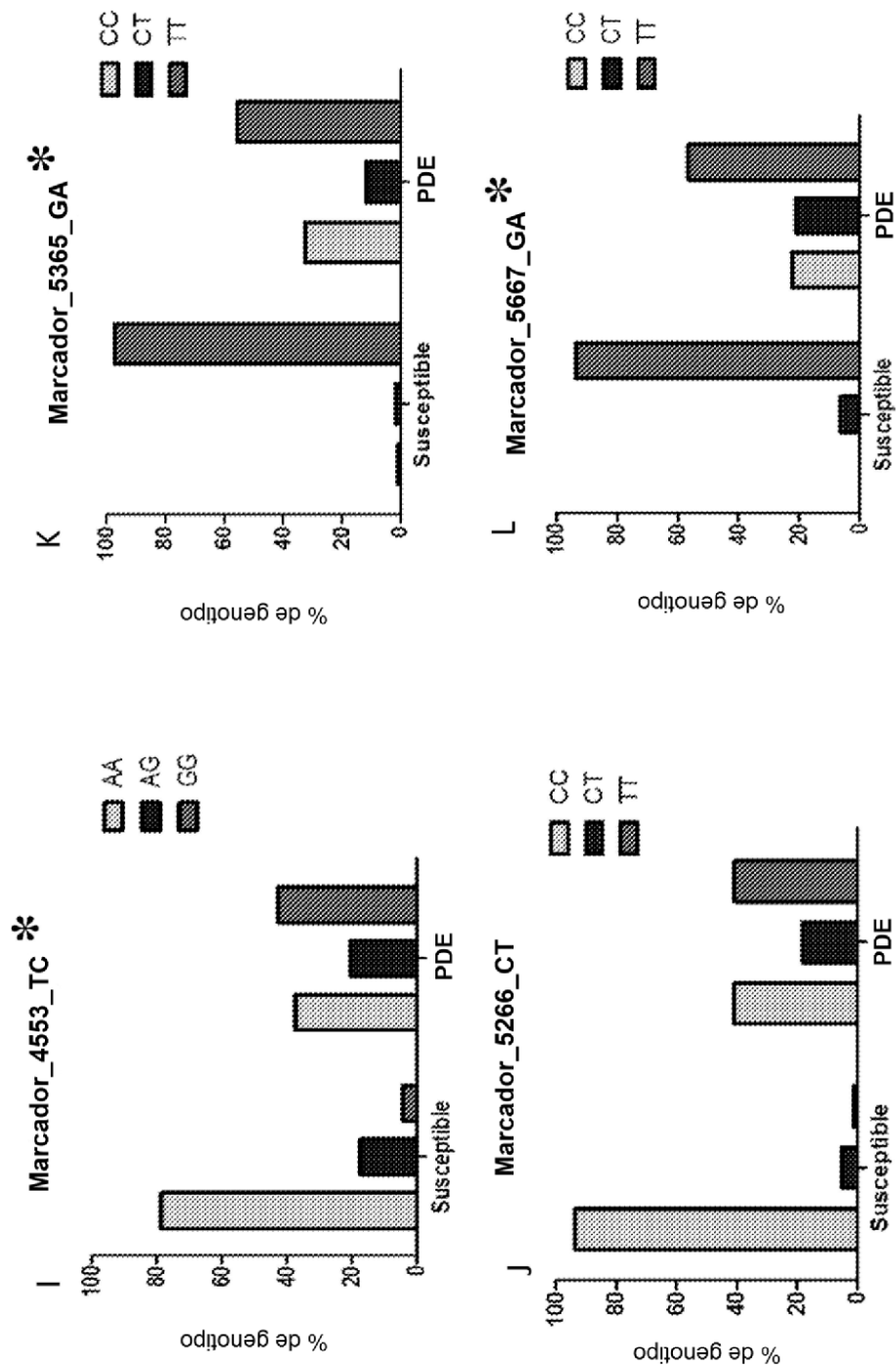


Figura 1C

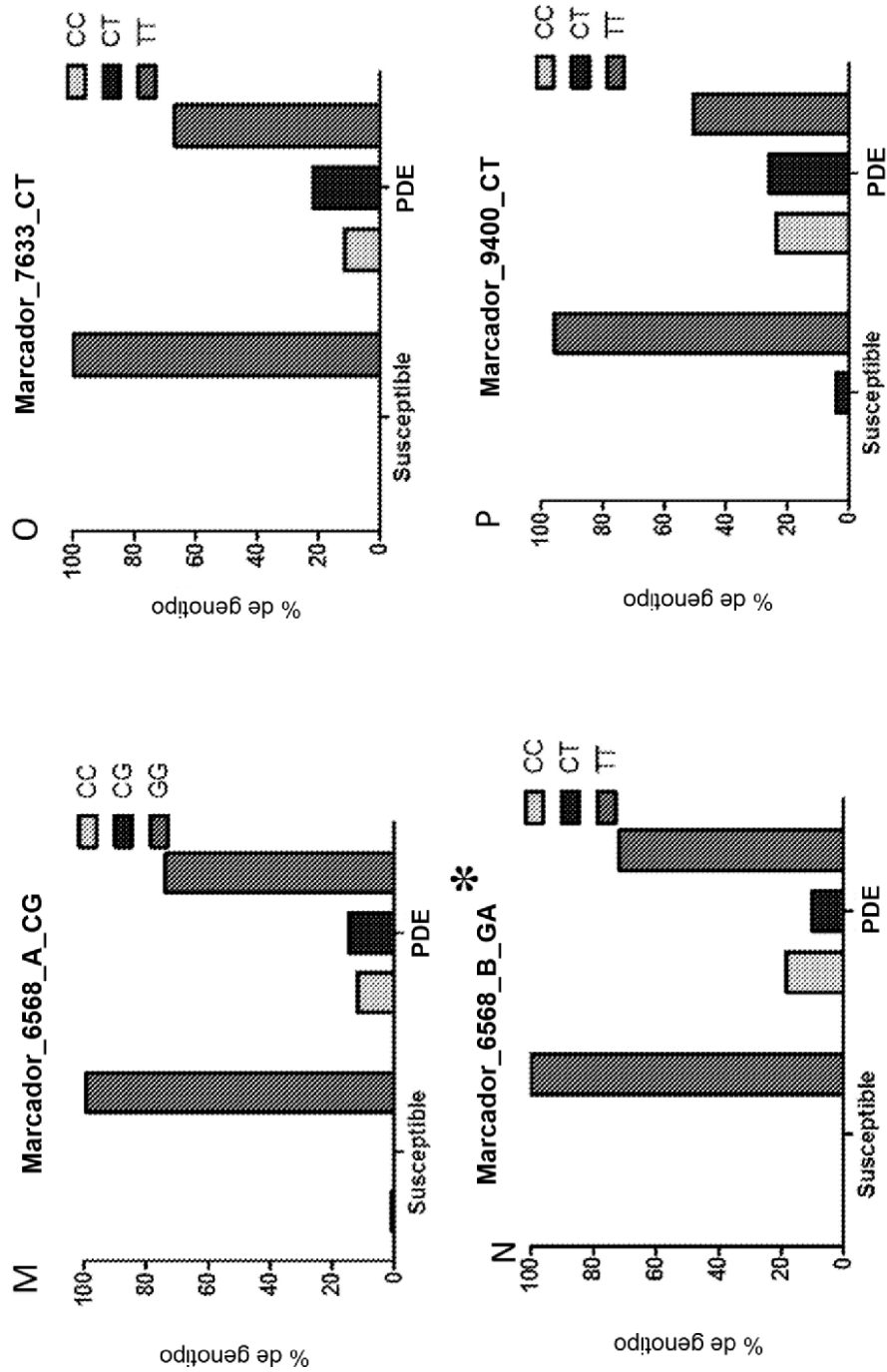


Figura 1D

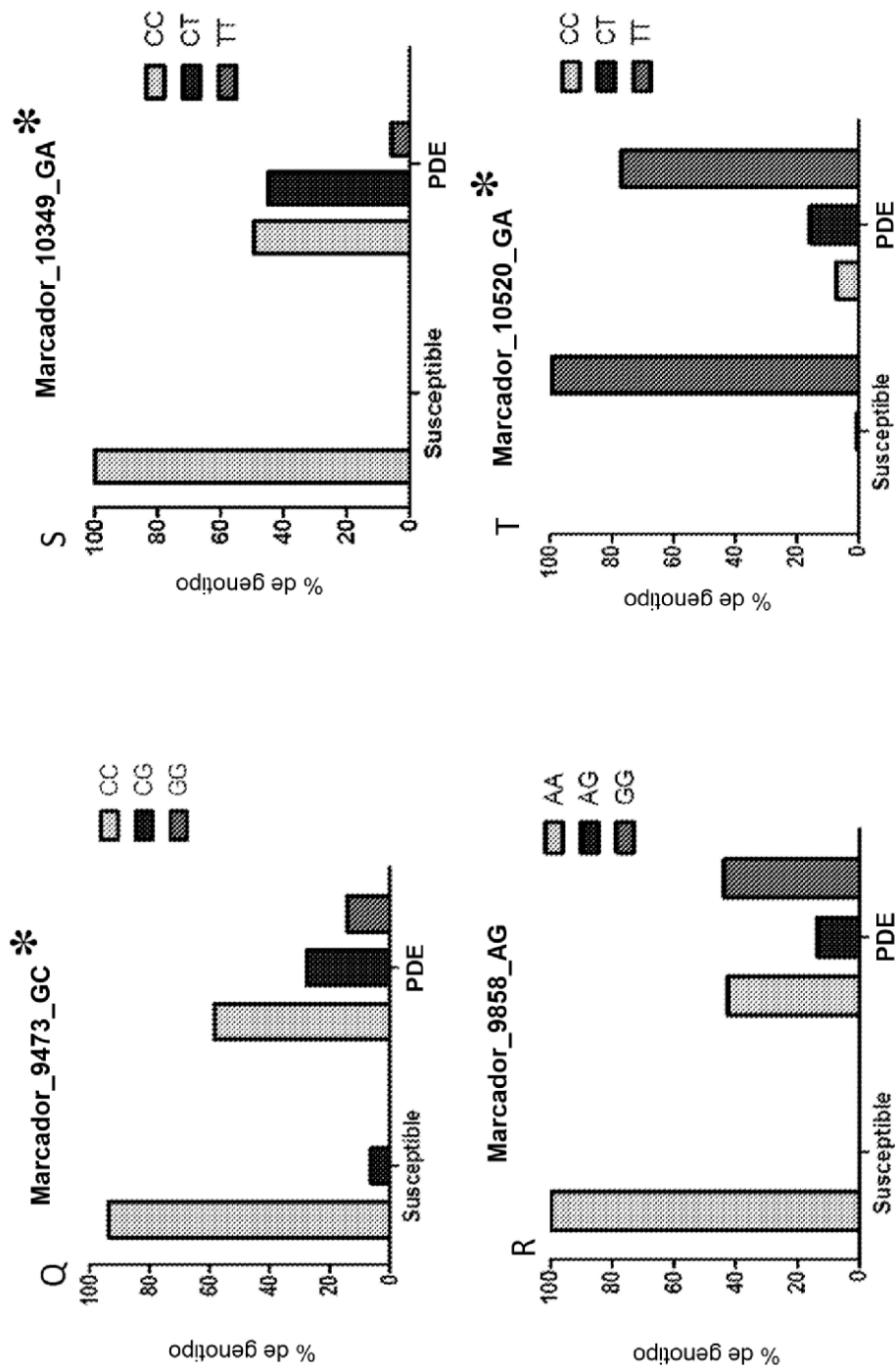


Figura 1E

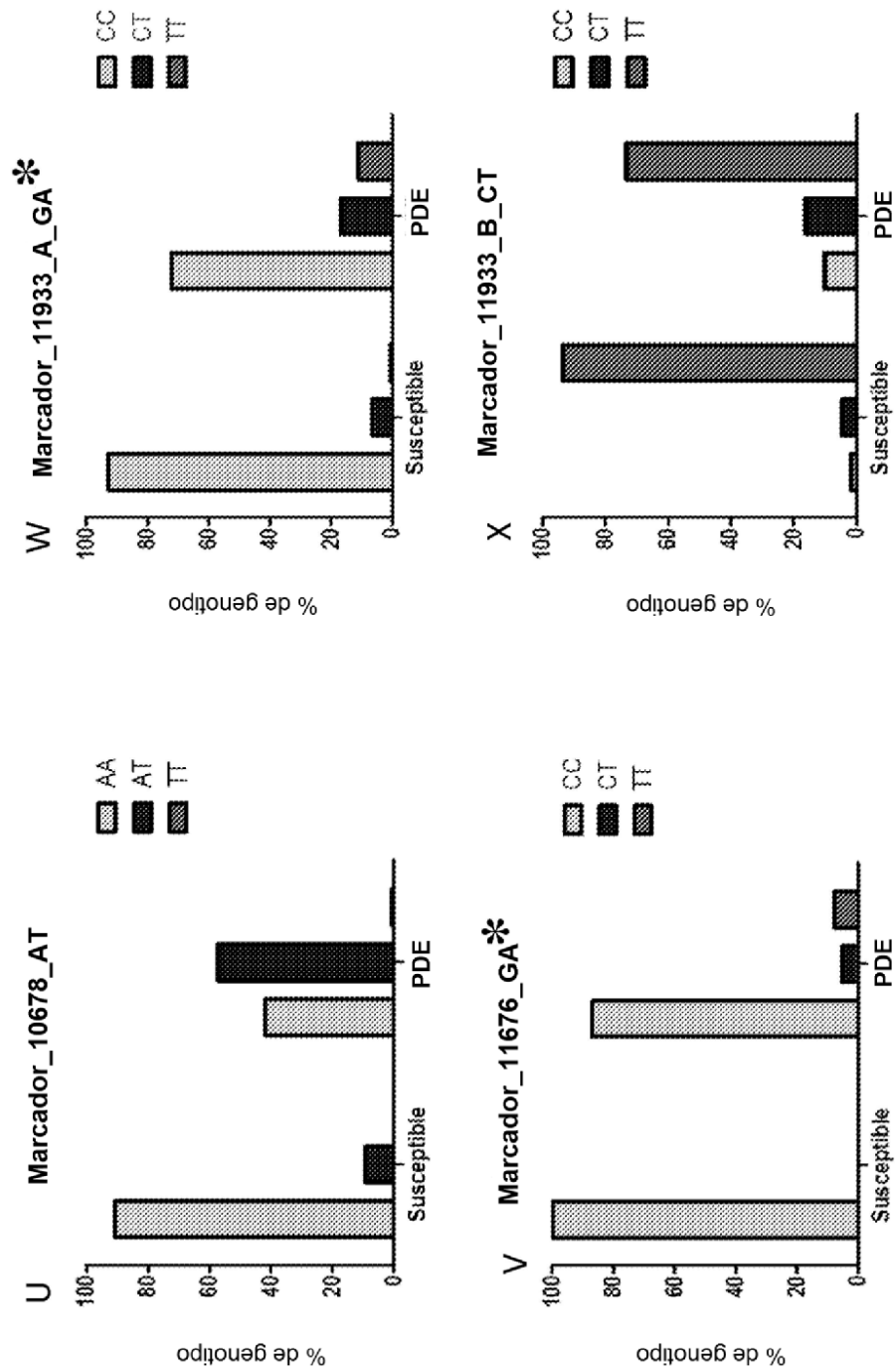


Figura 1F

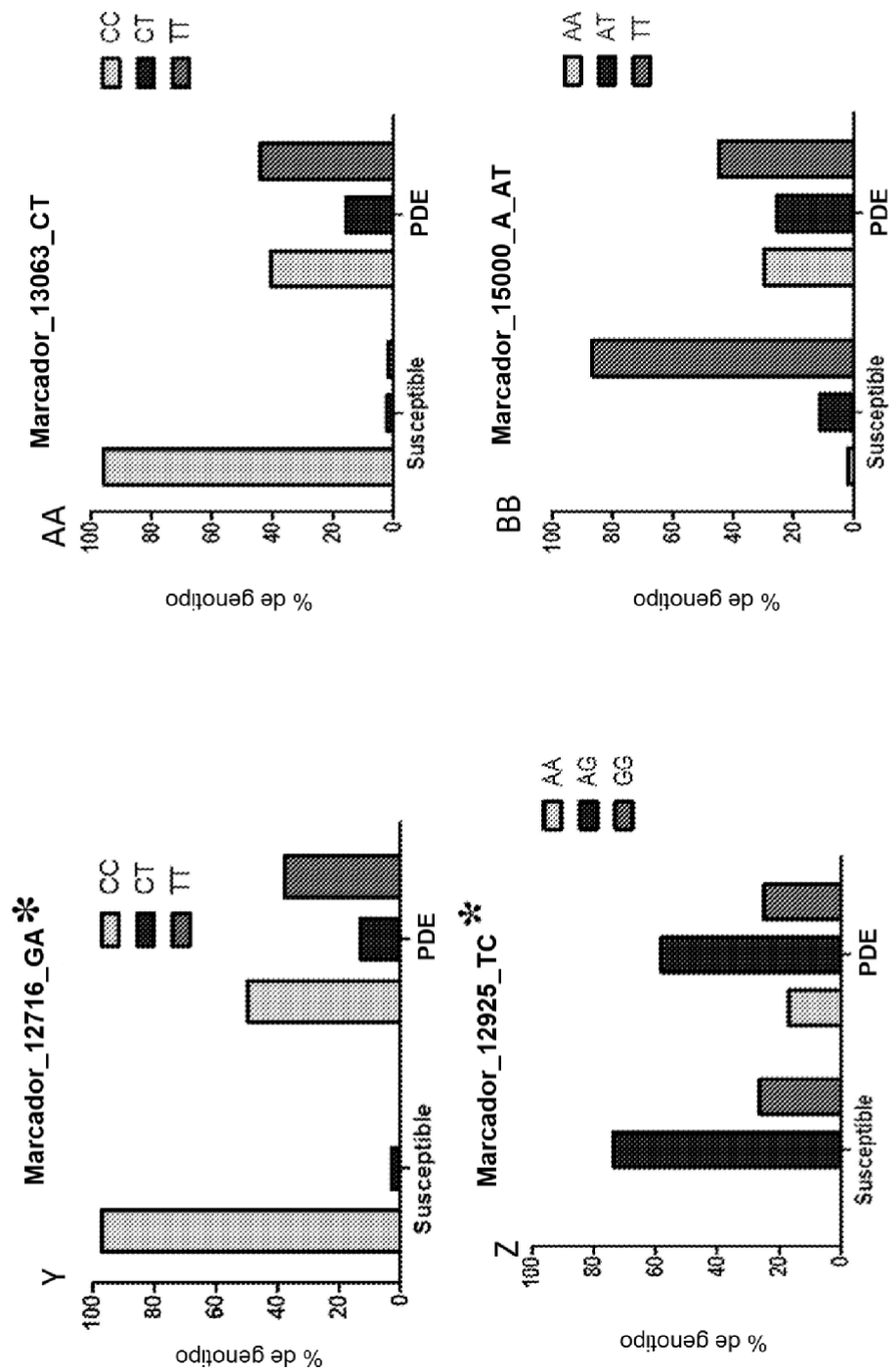


Figura 1G

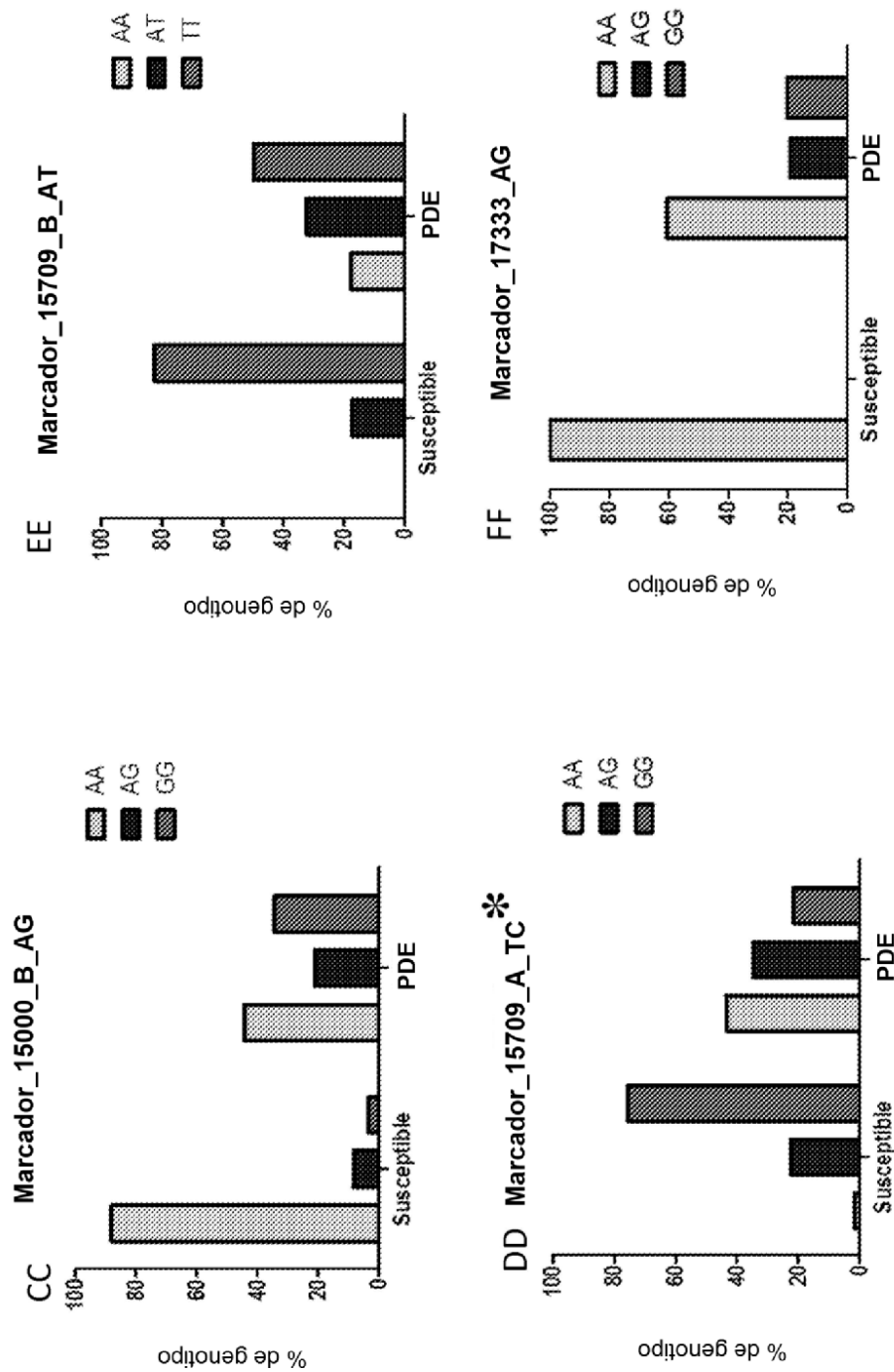


Figura 1H

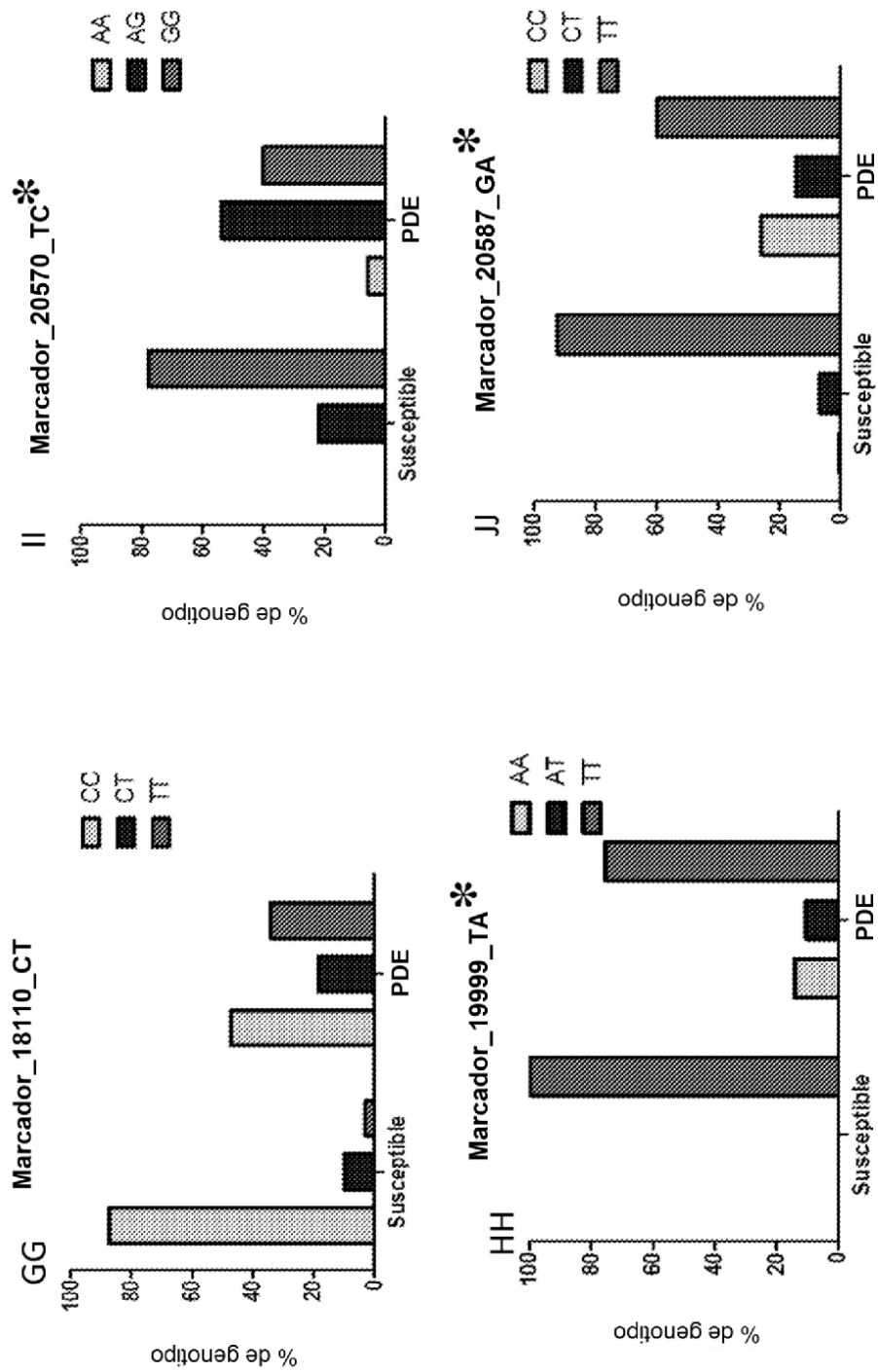


Figura 1I

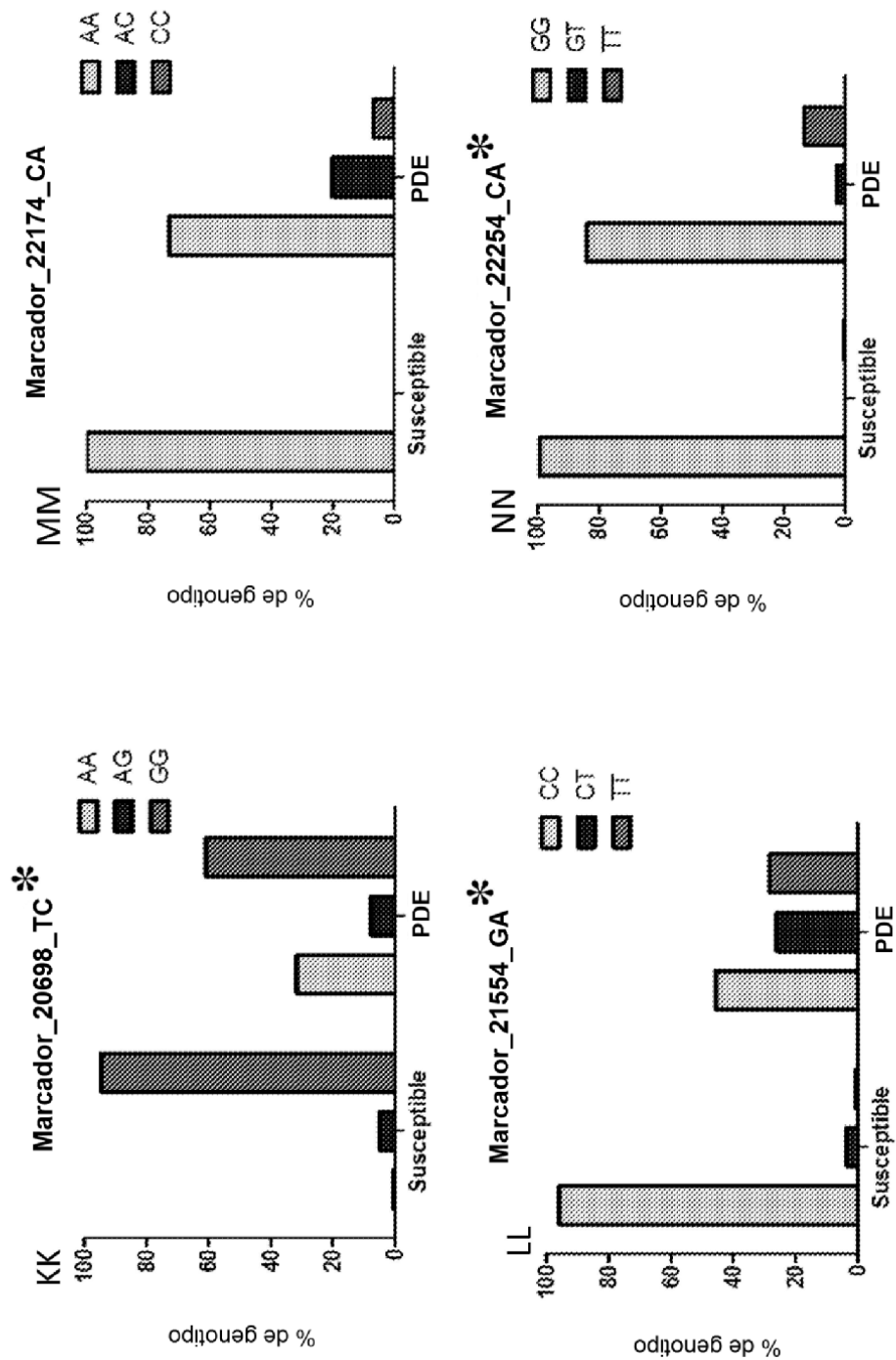


Figura 1J

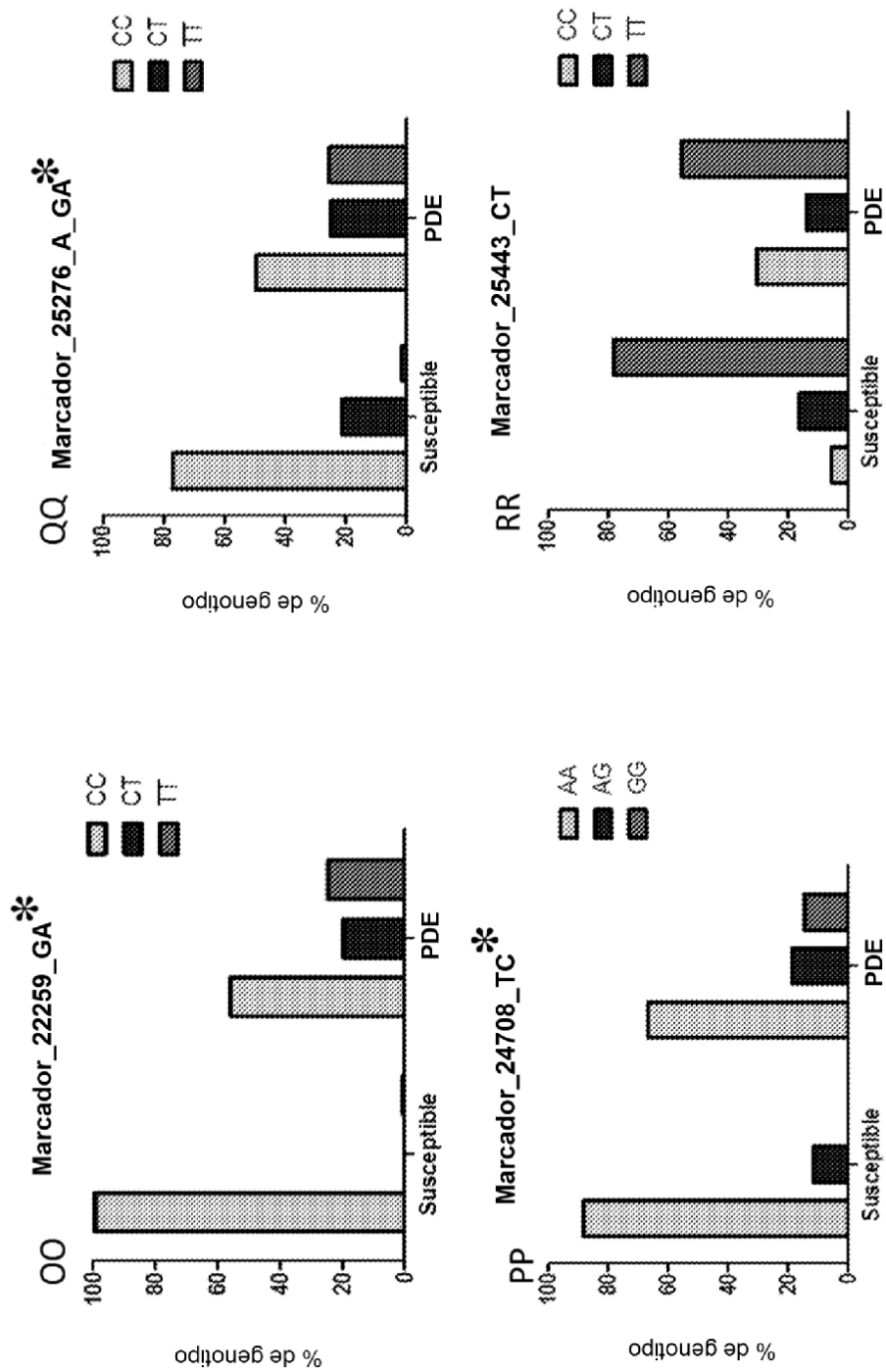


Figura 1K

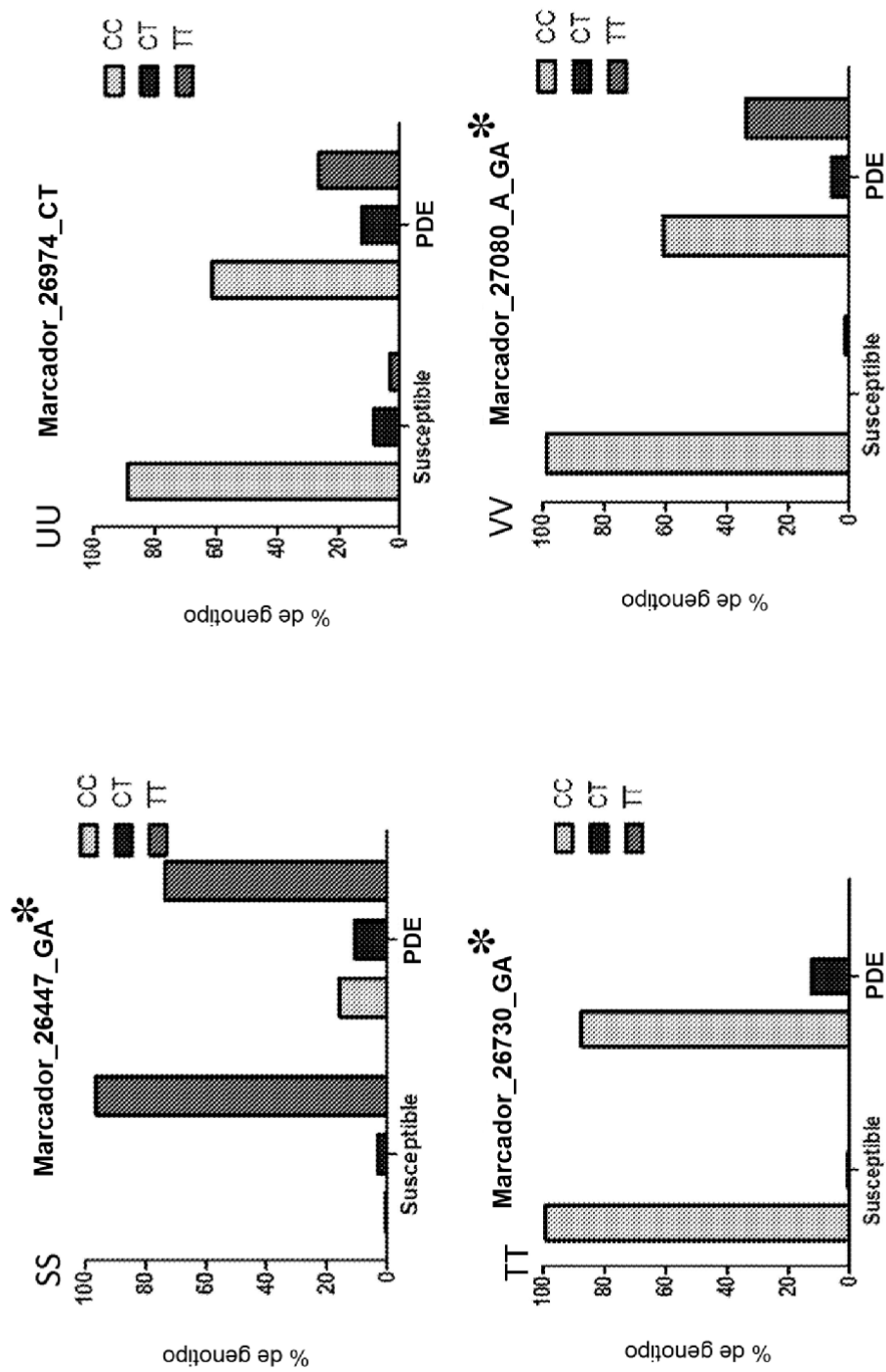


Figura 1L

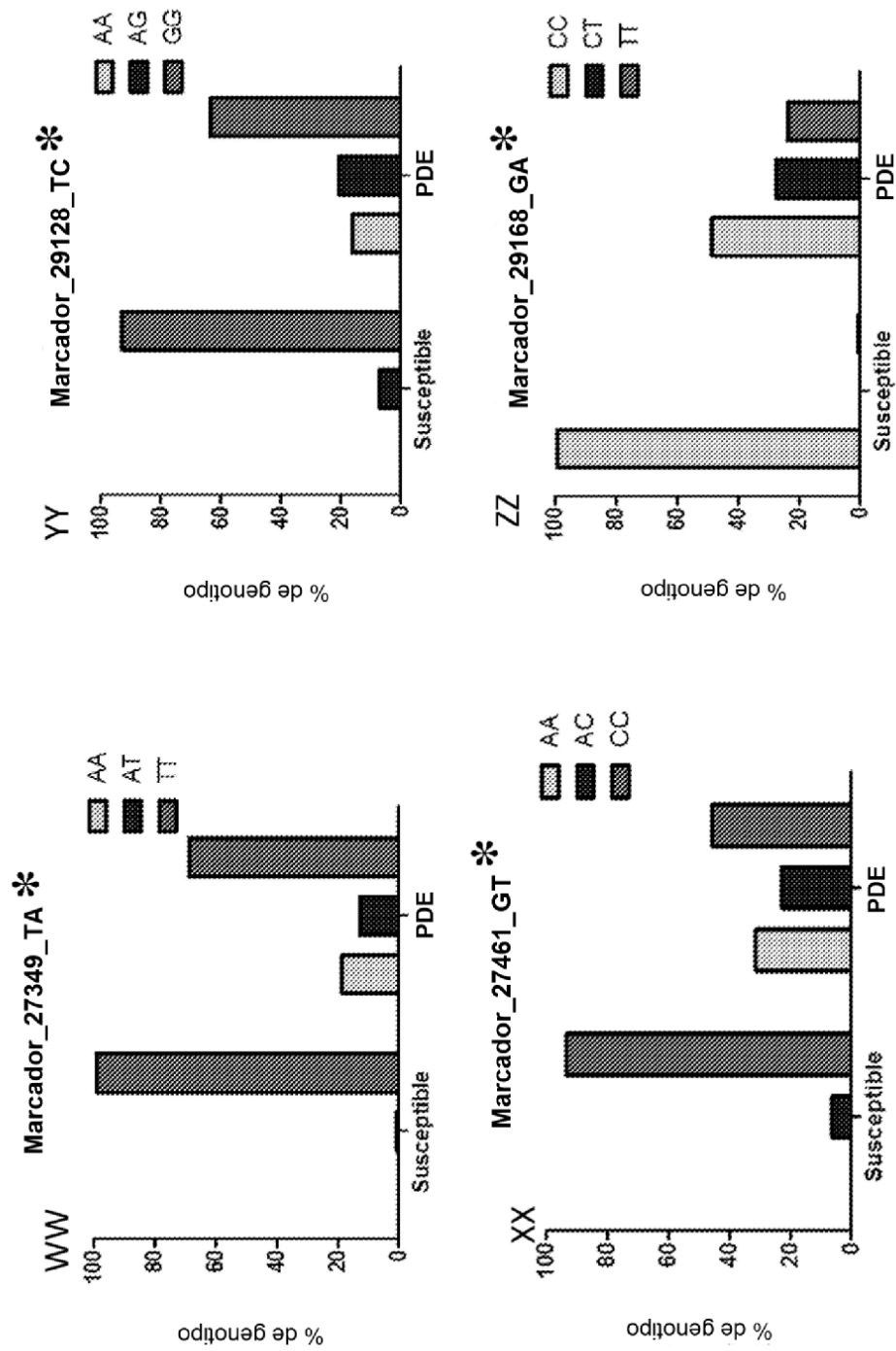


Figura 1M

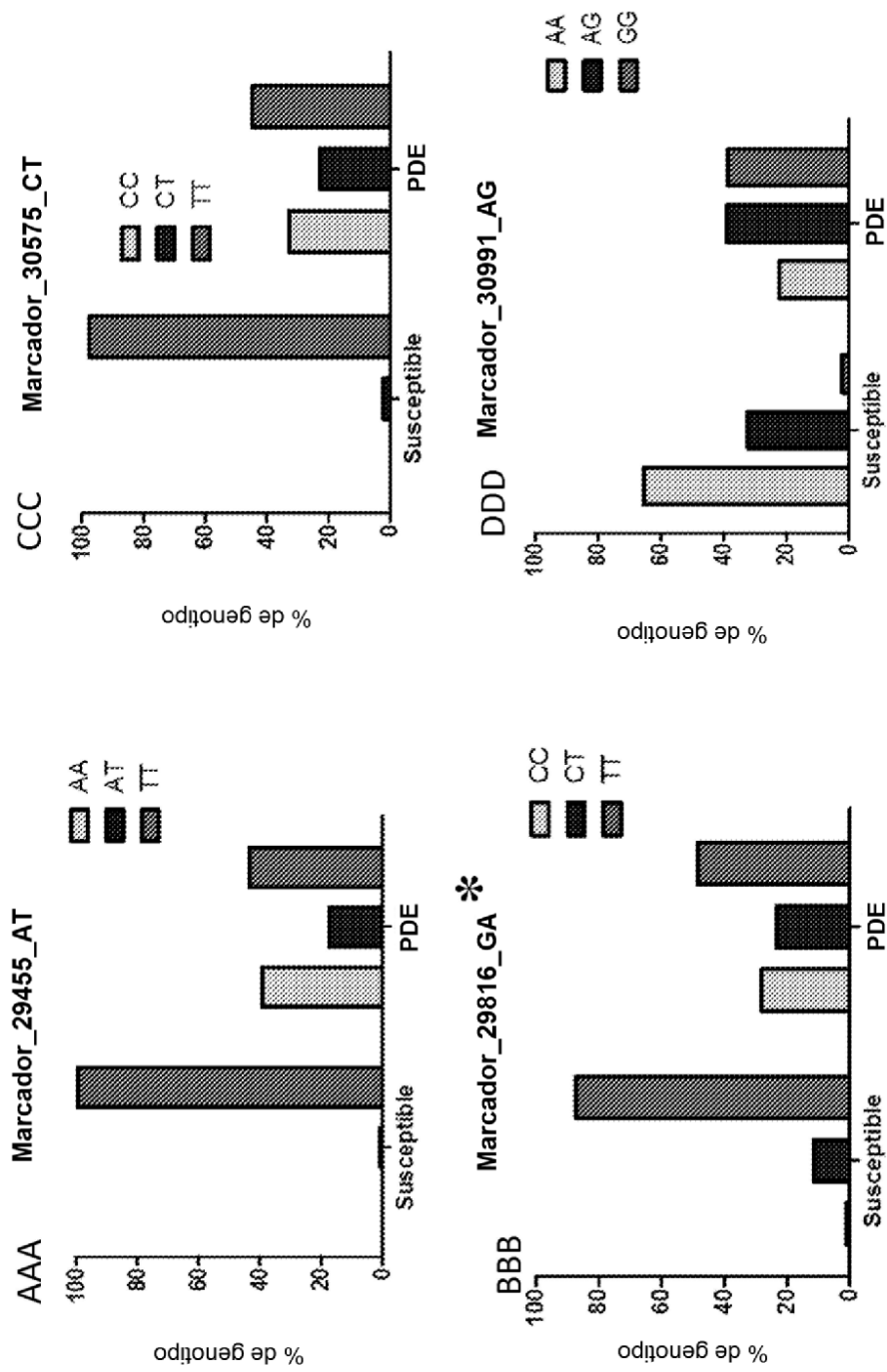


Figura 1N

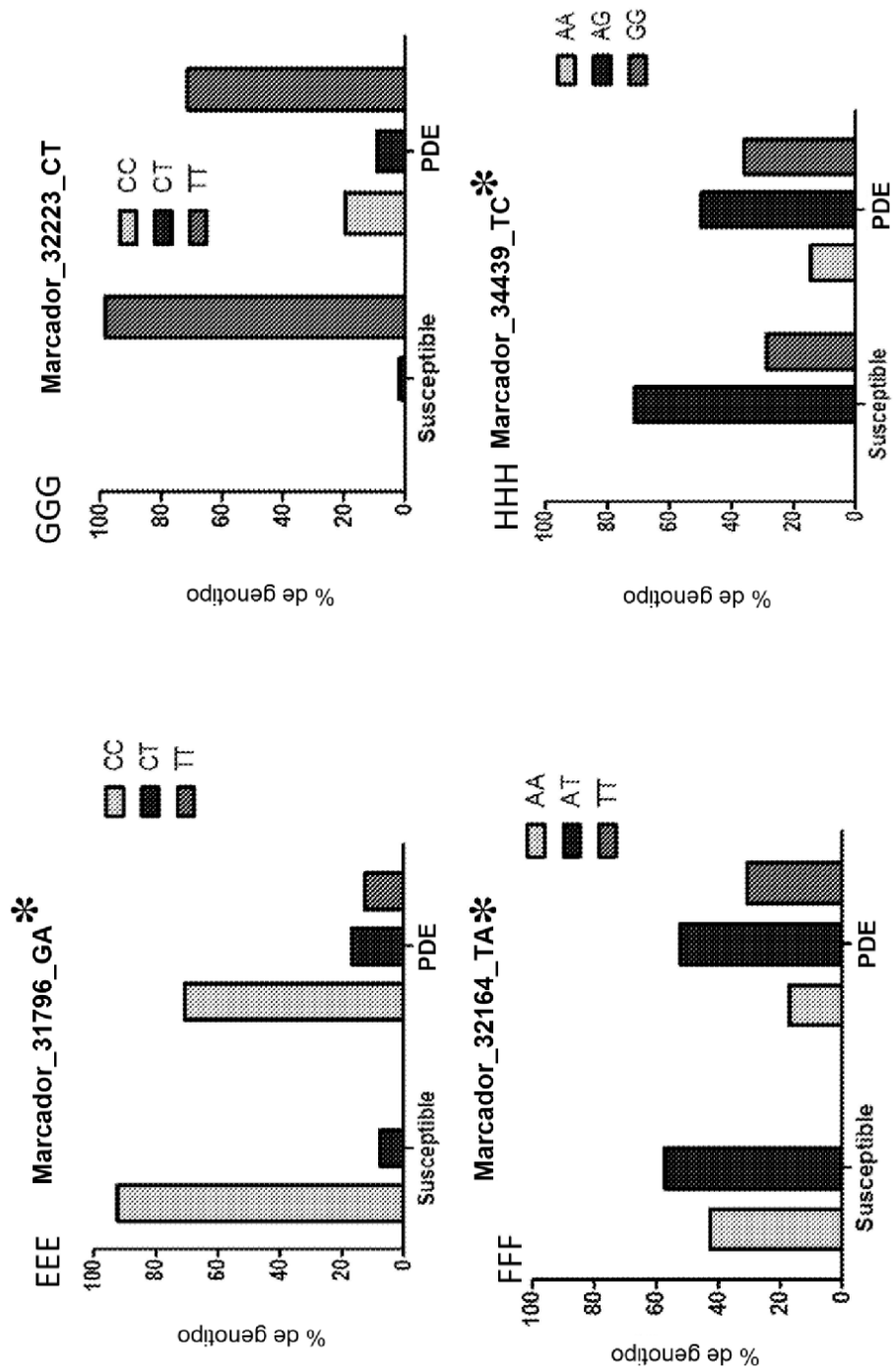


Figura 10

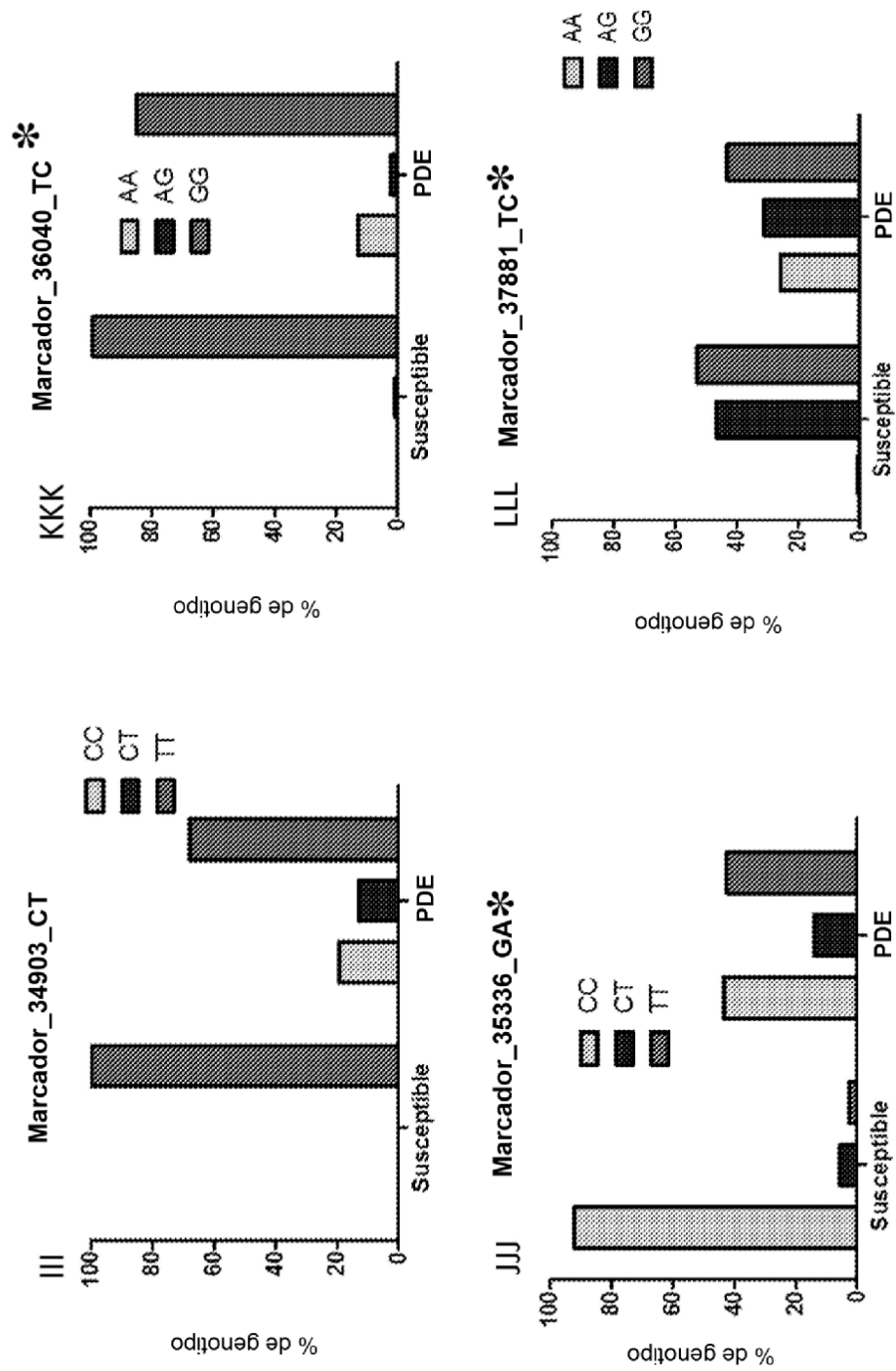


Figura 1P

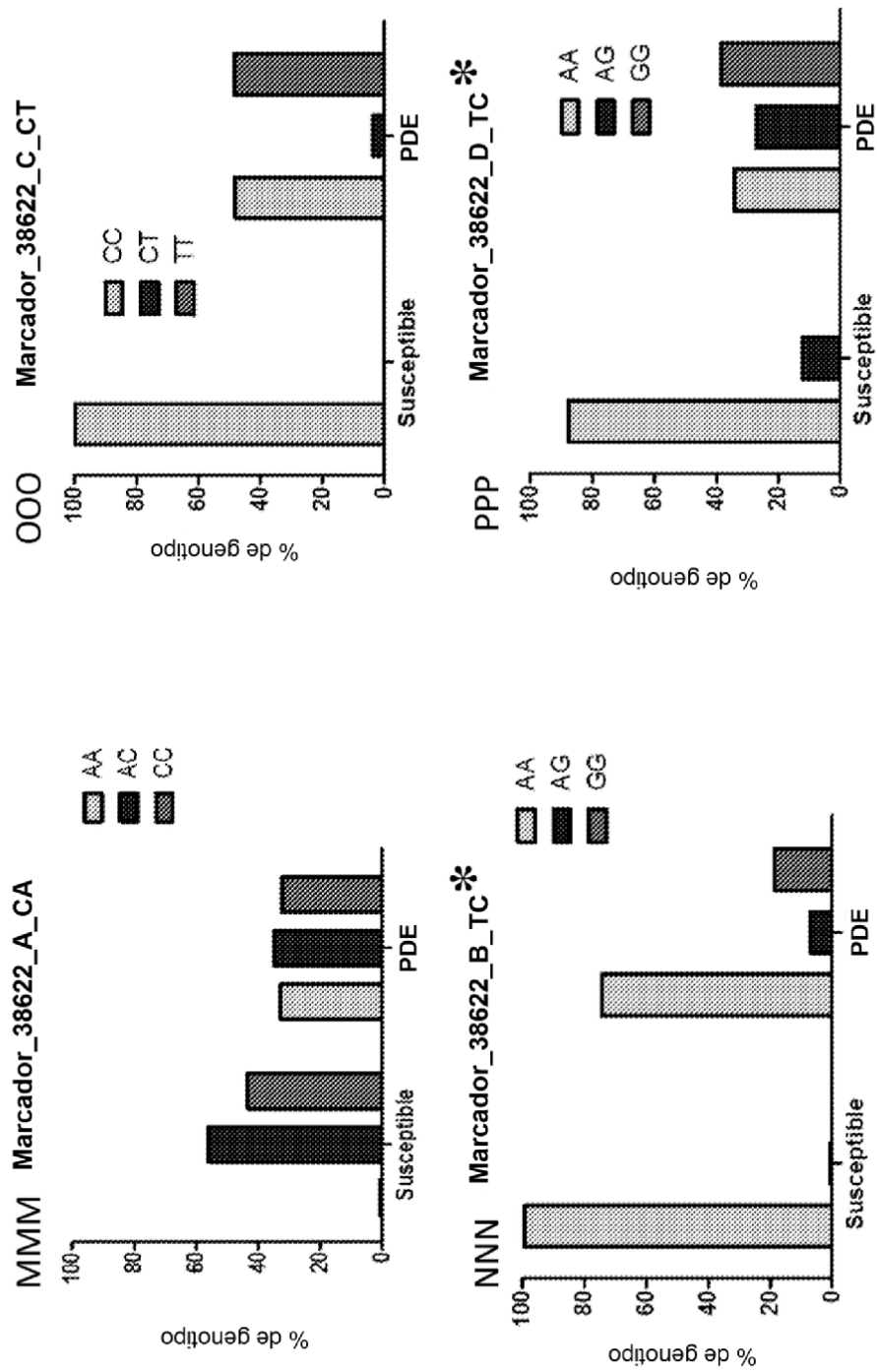


Figura 1Q

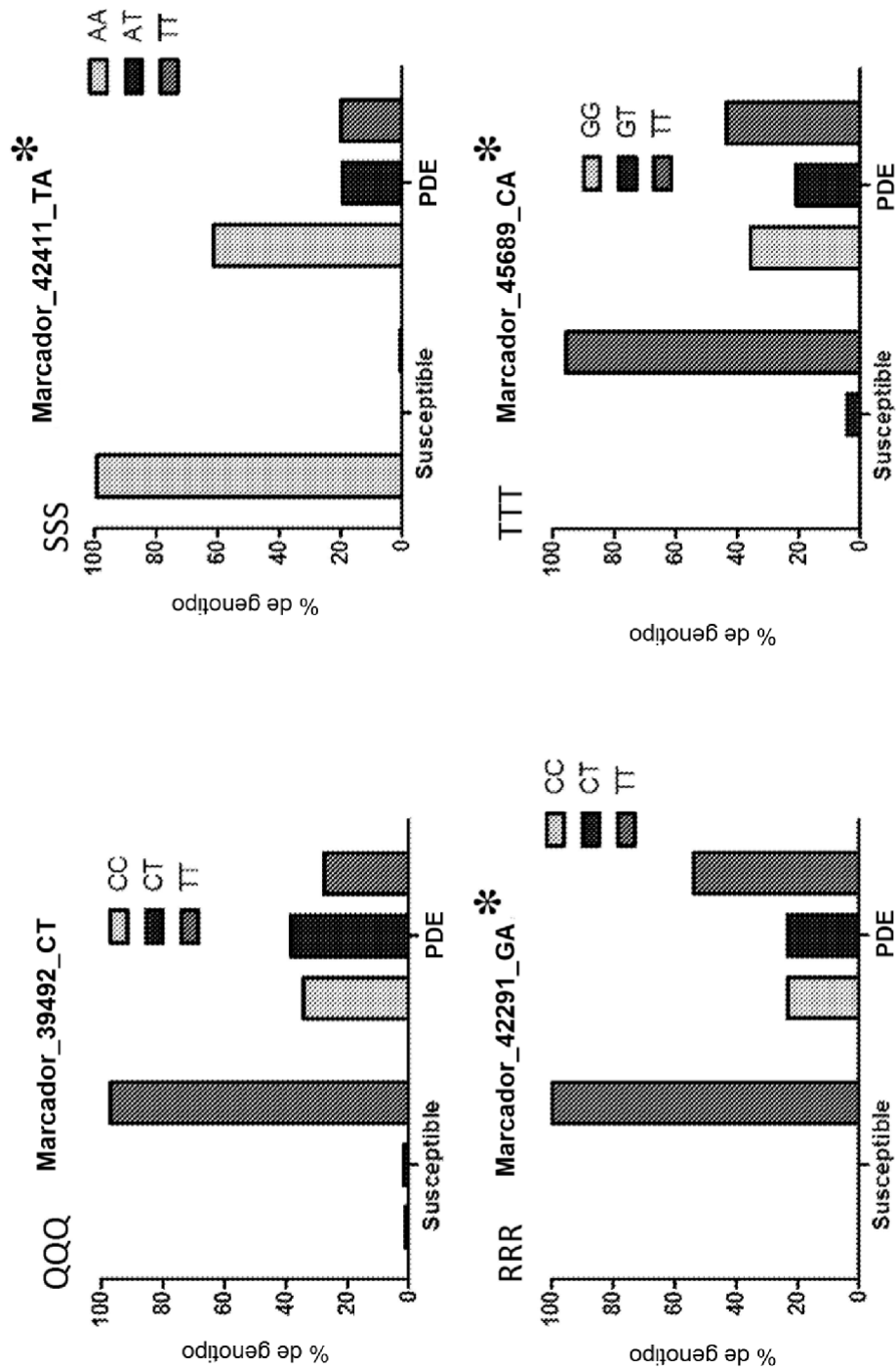


Figura 1R

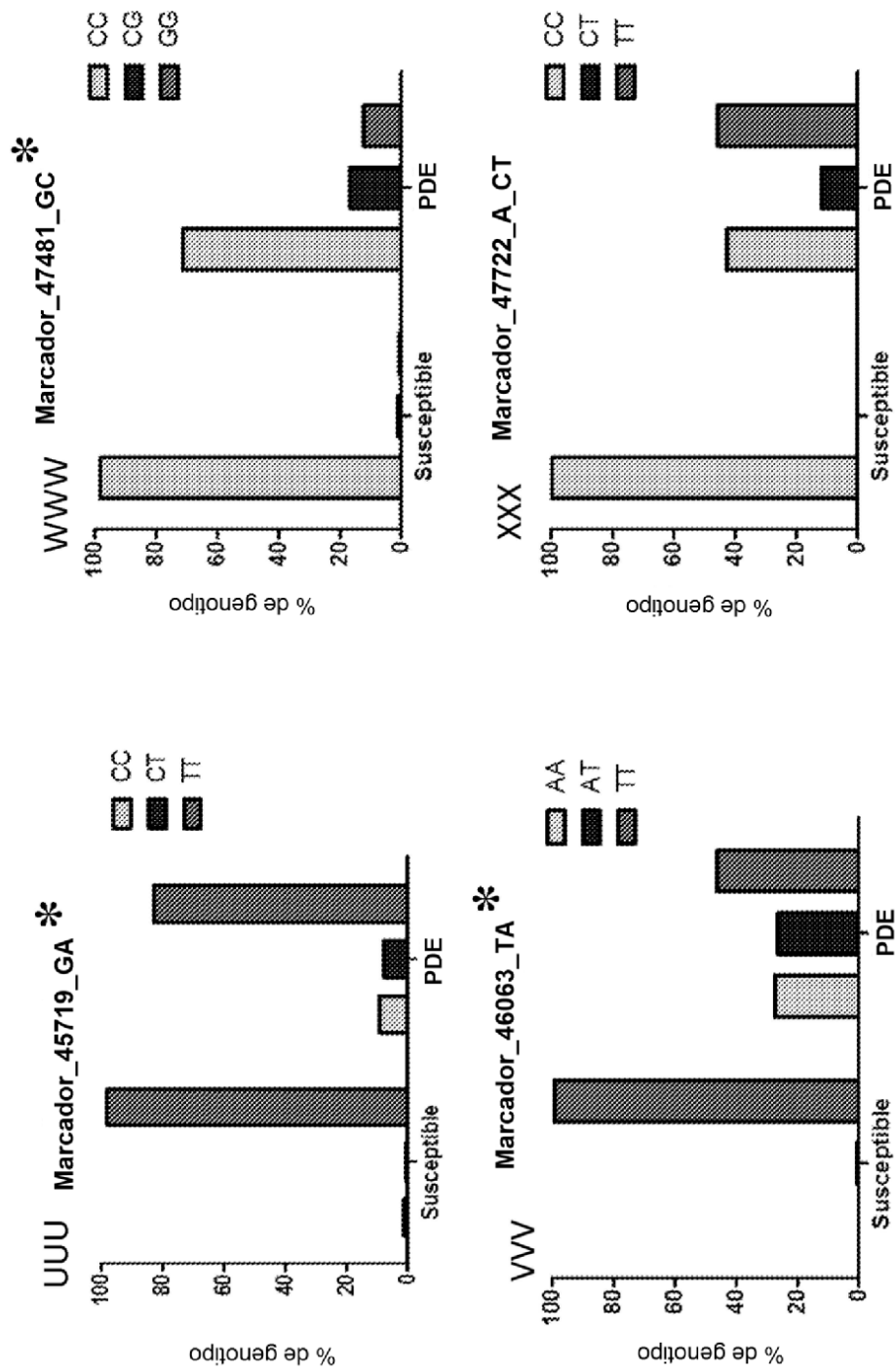


Figura 1S

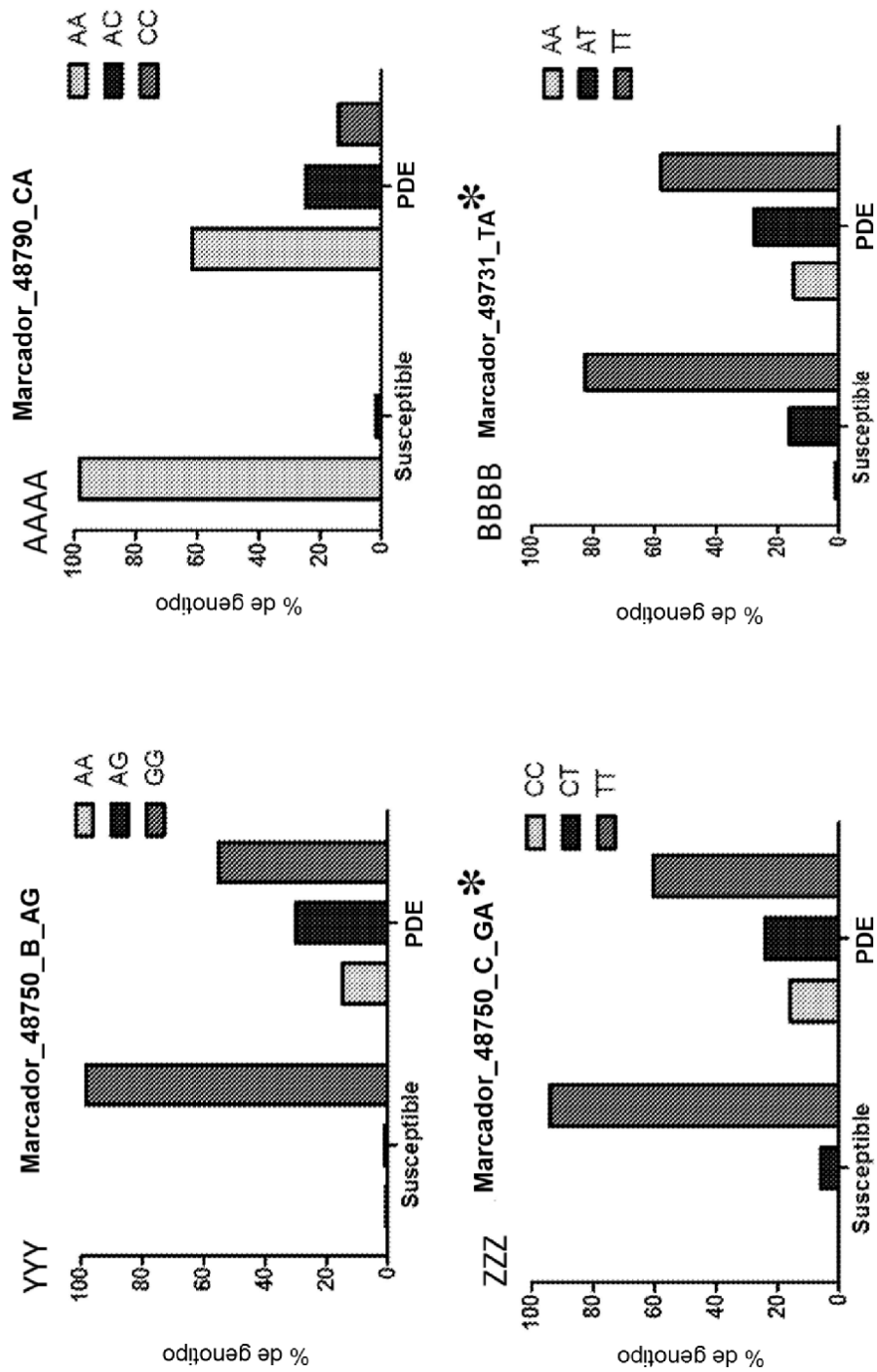


Figura 1T

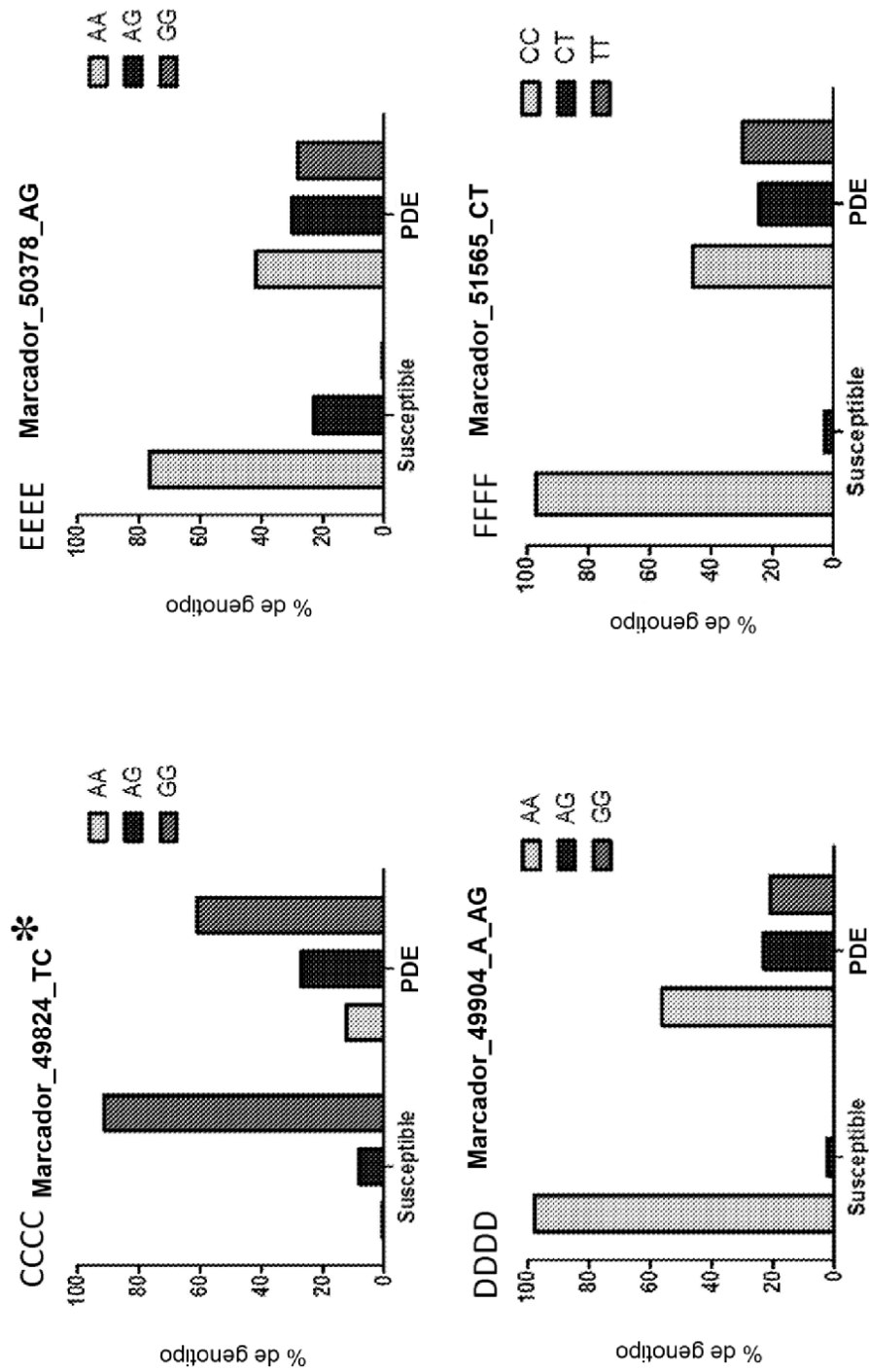


Figura 1U

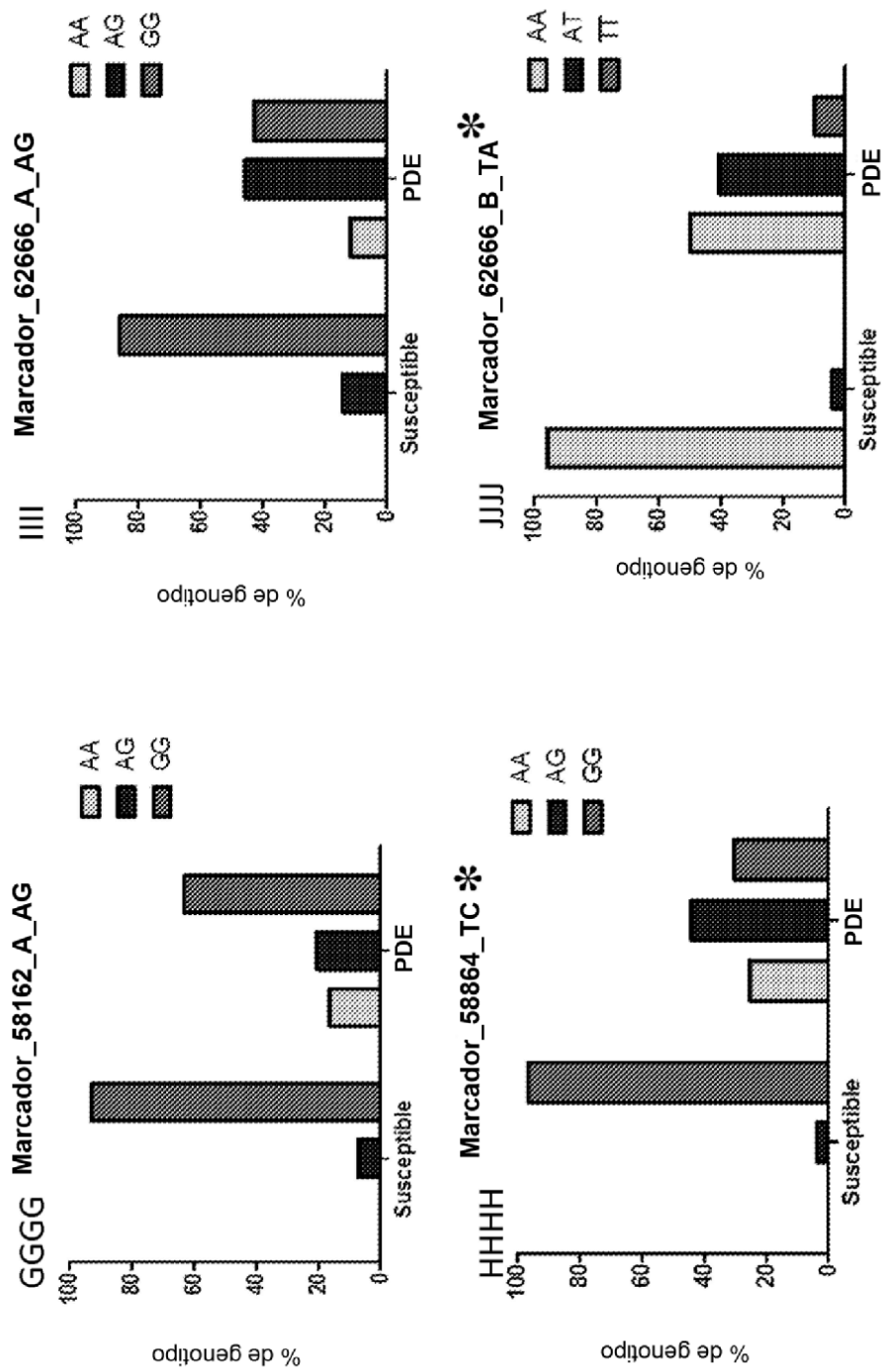


Figura 1V

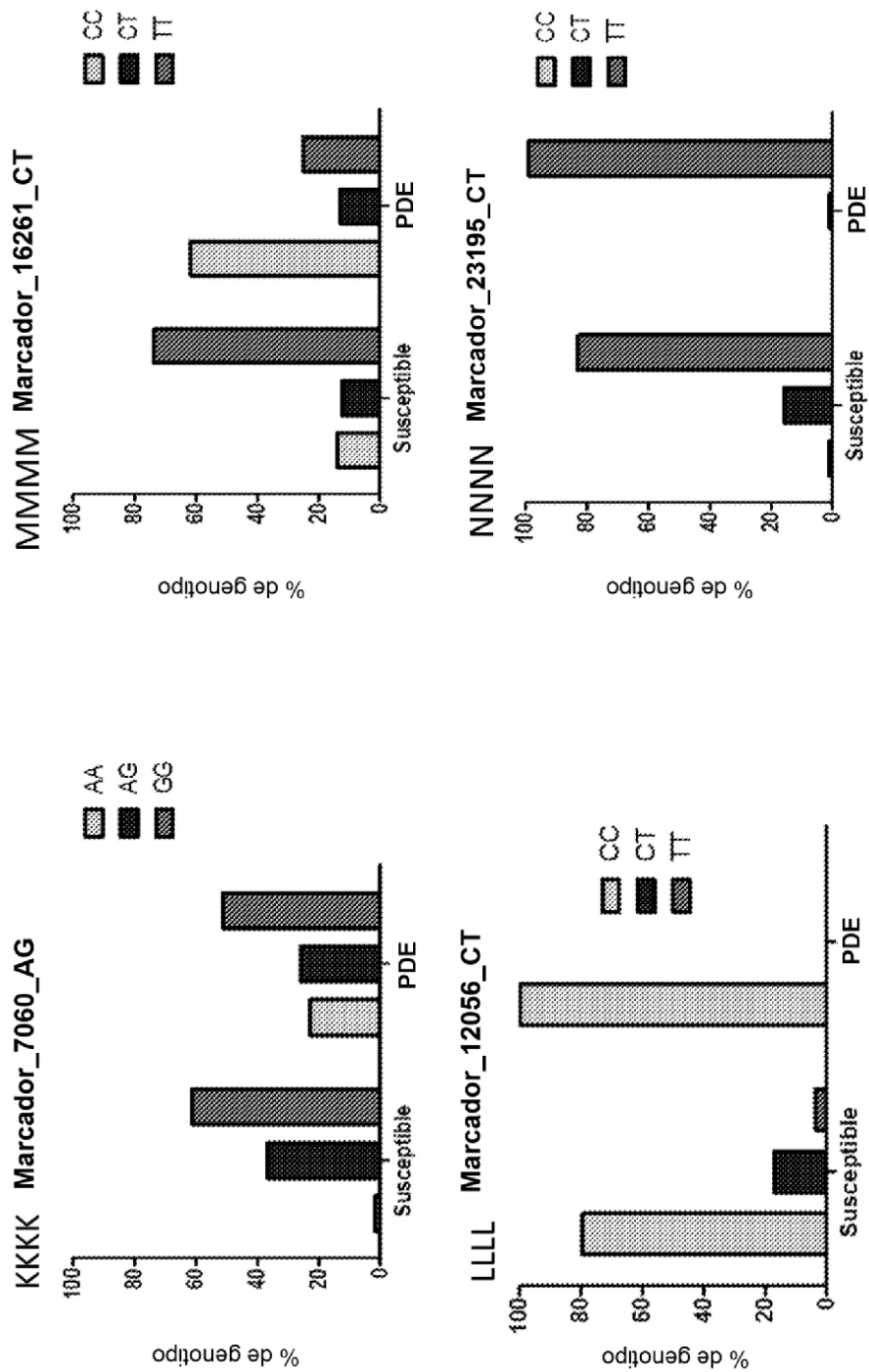


Figura 1W

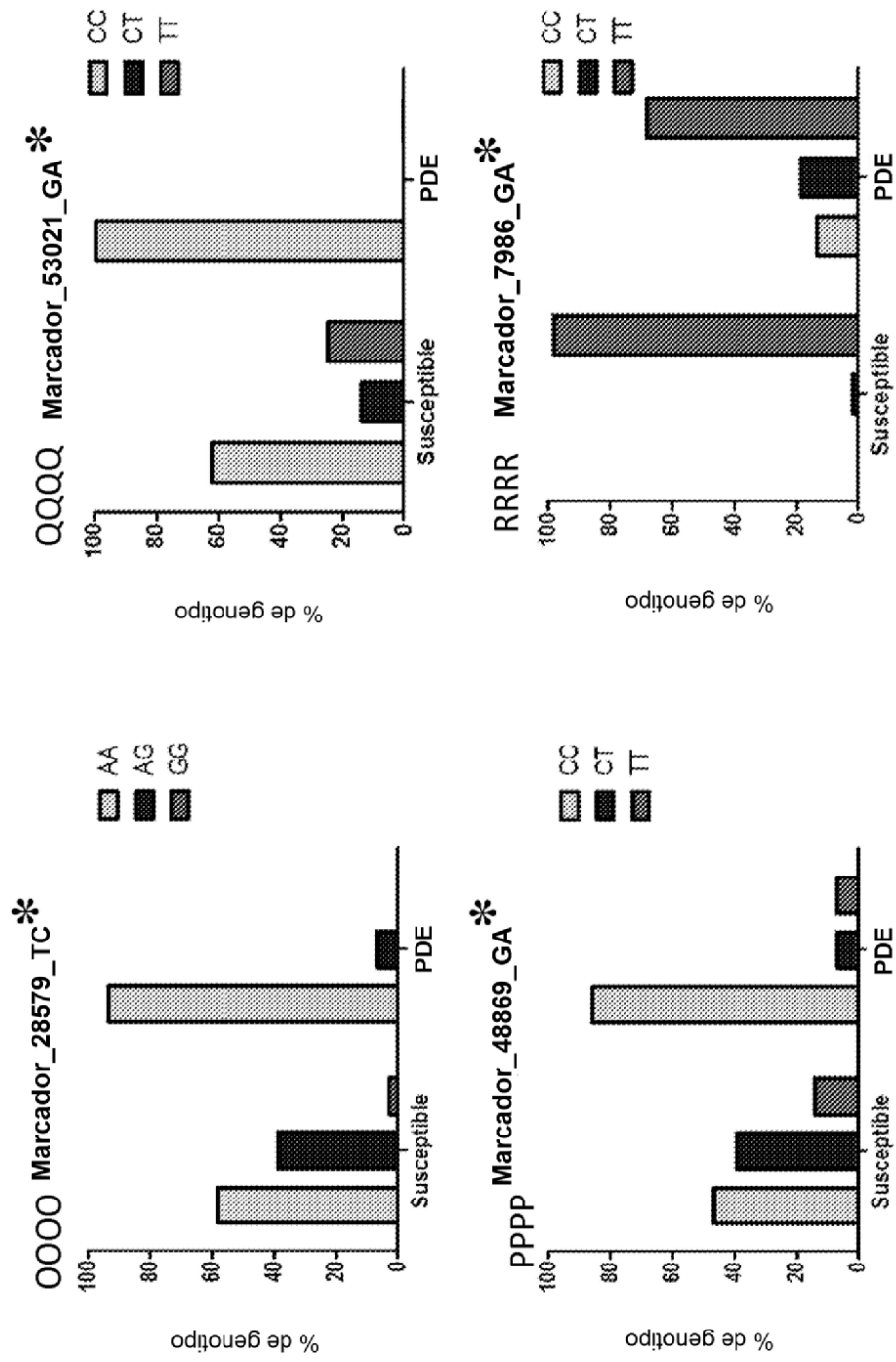


Figura 1X

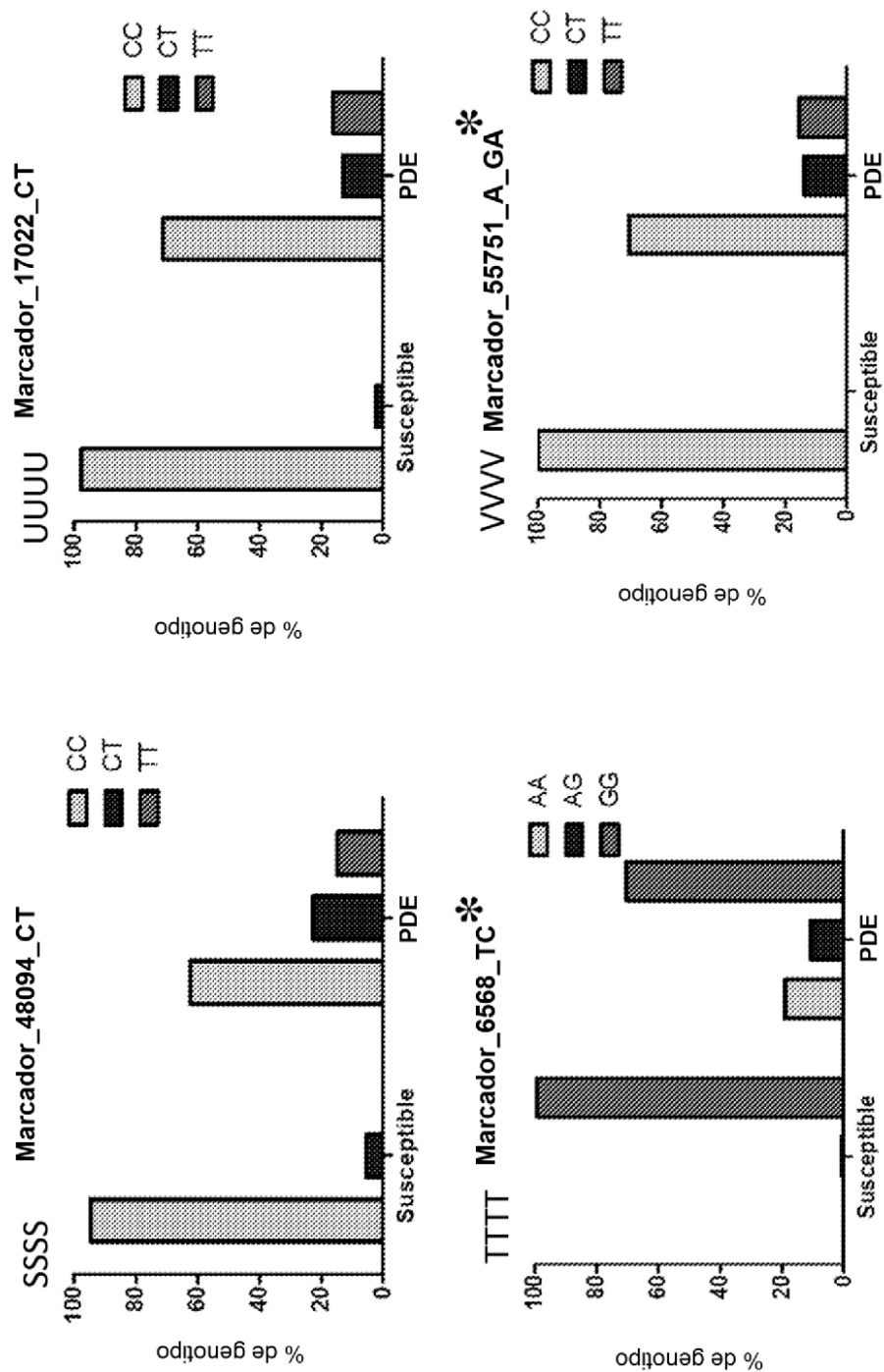


Figura 1Y

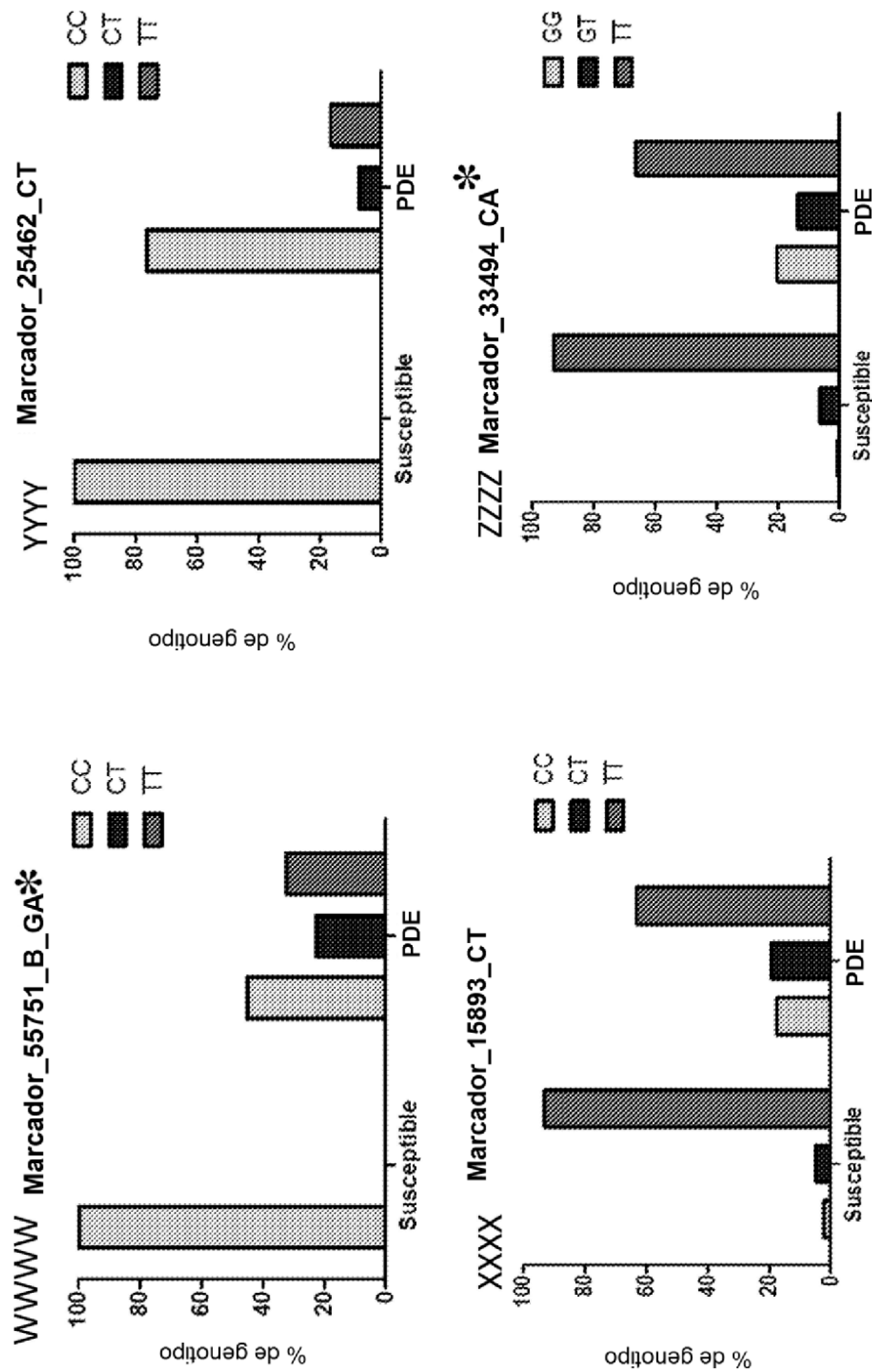


Figura 1Z

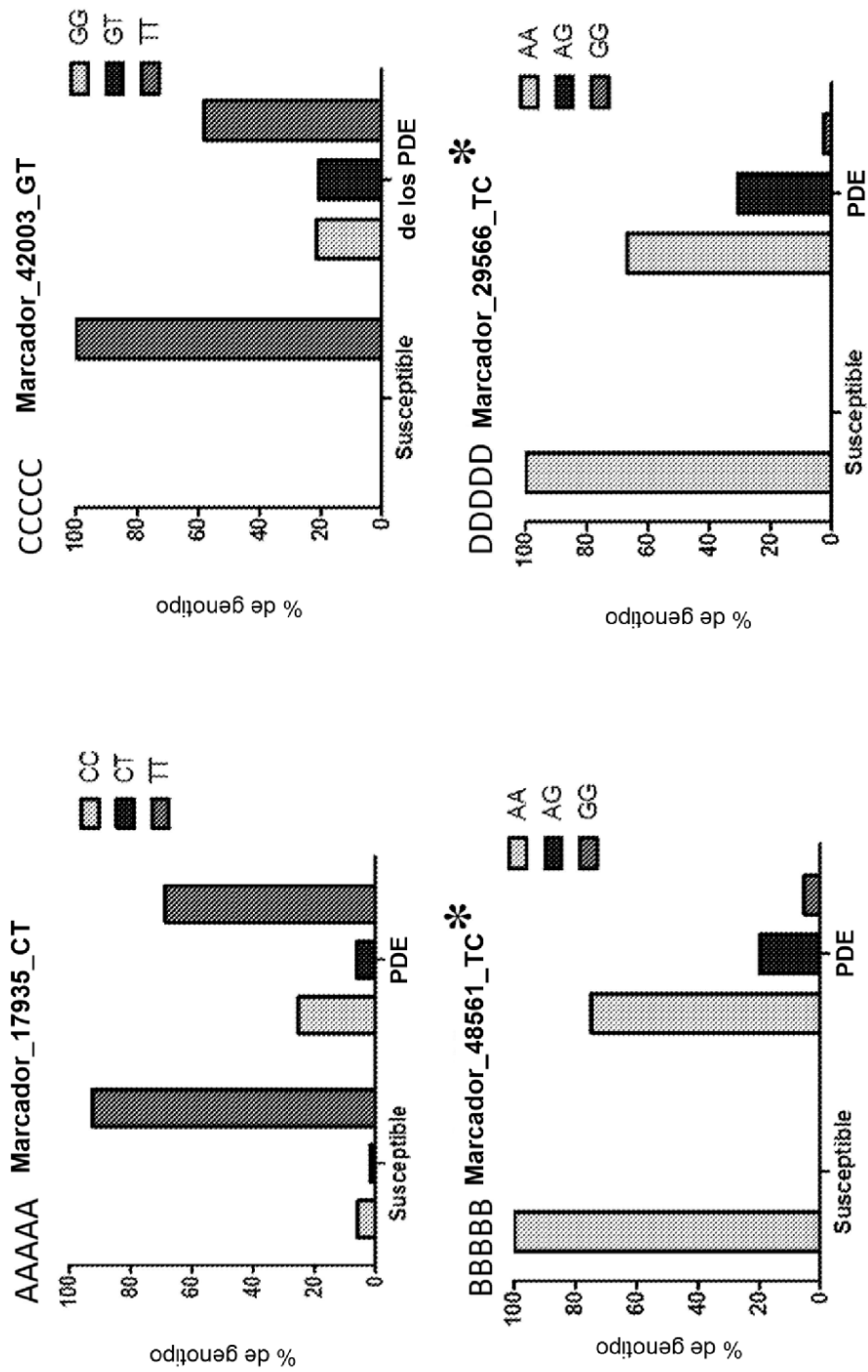


Figura 1AA

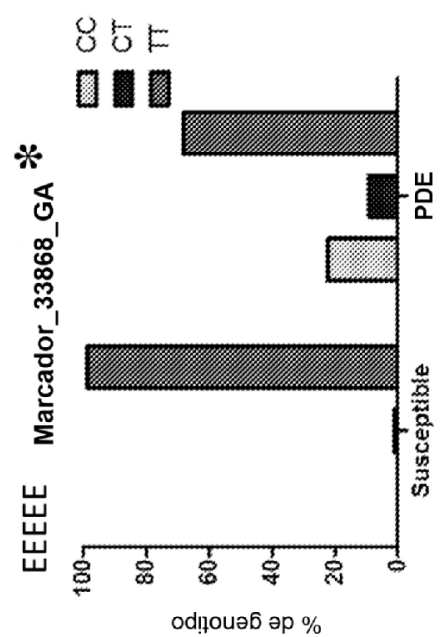


Figura 1BB