

NUEVOS VIRUS DE TILAPIA Y SUS USOS

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reclama prioridad de la
Solicitud Provisional estadounidense No. de serie
62/091,824, presentada el 15 de diciembre de 2014, cuyo
contenido se incorpora en este documento por referencia en
su totalidad.

10

Campo de la invención

La invención está en el campo de los virus y se
relaciona con un nuevo virus encontrado en la tilapia, que
15 se denomina como Virus de la Tilapia del Lago (TiLV). La
invención incluye el TiLV aislado, y las secuencias y
polipéptidos de ácidos nucleicos aislados del mismo. La
invención también se relaciona a cebadores y sondas. La
invención también se relaciona con anticuerpos contra
20 antígenos del TiLV. La invención se relaciona con métodos
para detectar la presencia o ausencia de TiLV en un animal
usando cebadores, sondas y anticuerpos. La invención
también se refiere a ARNs que se dirigen a secuencias de
ácido nucleico de TiLV. La invención también se refiere a
25 composiciones inmunogénicas para inducir una respuesta

inmune contra TiLV en un animal.

Antecedentes de la invención

5 Las tilapias son el segundo grupo más importante de peces cultivados en todo el mundo, con producción de 2.5 millones de toneladas anualmente (Organización para la alimentación y agricultura 2010), y sirven como fuente primaria en el mundo en desarrollo. El mar de Galilea (lago
10 Kineret) en Israel es una fuente importante de la pesca comercial. En los últimos años, las cantidades de pescado de captura han sido sometidas a una declinación persistente.

Aunque el lago alberga unas 27 especies de peces, que
15 comprenden miembros de las familias *Cichlidae*, *Cyprinidae*, *Mugillidae*, y *Claridae*, sólo una disminución en la captura de tilapias (*Cichlidae*) fue evidente. El principal pez comestible del lago, *Sarotherodon* (Tilapia) *galilaeus* (pez de San Pedro), vio los rendimientos anuales disminuidos de
20 316 toneladas en 2005 a 51, 8 y 45 toneladas en 2007, 2009 y 2010, respectivamente.

S. galilaeus contribuye al mantenimiento del equilibrio ecológico de este lago. Por lo tanto, más allá de su impacto económico, la disminución significativa de
25 las poblaciones de peces de San Pedro, así como las otras

tilapias del lago (como *Tilapia zilli* [tilapia común], *Oreochromis aureus* [tilapia de Jordania] *Tristamella simonis intermedia*) representa una amenaza definitiva para todo el ecosistema.

5 Esta disminución en la tilapia del lago en el mar de Galilea fue debido a una grave enfermedad emergente en las poblaciones silvestres de especies de tilapia, incluyendo *S. galilaeus*, *T. zilli*, *O. aureus* y *T. simonis intermedia*, y así como en la tilapia híbrida criado en estanque *O.*
10 *niloticus* x *O. aureus* en Israel. La Asociación de brotes de enfermedades con estacionalidad (mayo a octubre, cuando el agua tiene temperaturas relativamente altas) indicó también la participación de un agente infeccioso, ya que la temperatura del agua afecta a la aparición de una amplia
15 gama de enfermedades parasitarias, bacterianas y virales de los peces. La supervisión rutinaria de parásitos, patógenos virales, bacterianos o toxinas conocidos no reveló ninguna anormalidad, y no se identificó un agente causal.

 También fue encontrado un brote similar de la
20 enfermedad en la tilapia en Ecuador.

 Por lo tanto, había una necesidad de identificar al agente causal de este descenso en las poblaciones de tilapia en las dos ubicaciones geográficas diferentes, así como una necesidad de herramientas y métodos para detectar
25 la presencia del agente causal en las poblaciones de peces

y protección de las poblaciones de peces del agente causal de esta disminución. Esta invención aborda estas necesidades.

5

Breve descripción de la invención

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que el agente causal de la enfermedad de las tilapias es un nuevo virus de ARN de Virus de Tilapia del lago (TiLV). La amplia distribución del virus y la existencia de diferentes características clínicas de su enfermedad asociada, hacen que los resultados descritos en este documento sean de importancia para el cultivo de peces y la conservación de vida silvestre.

En ciertos aspectos, la invención se refiere a herramientas de diagnóstico útiles para la detección de una muestra para TiLV.

En ciertos aspectos, la invención descrita en este documento se refiere a vacunas para la protección de los peces de enfermedades virales. En ciertos aspectos, la invención se relaciona con las composiciones de vacuna para la prevención de la enfermedad inducida por el Virus de la Tilapia del lago (TiLV) en los peces, particularmente las tilapias. En ciertos aspectos la invención se refiere a métodos para usar las vacunas para proteger a las tilapias

de la enfermedad inducida por TiLV.

Los aspectos particulares, la invención está relacionada con las secuencias de ácido nucleico de TiLV aislados (incluyendo secuencias de ADNc correspondientes a las secuencias de ARN de TiLV sentido o antisentido) y péptidos de los mismos. La invención también se relaciona con anticuerpos contra antígenos derivados del TiLV. La invención también se relaciona con ARNs que se dirigen a secuencias de ácido nucleico de TiLV. La invención se relaciona con métodos para detectar la presencia o ausencia de TiLV en un animal (*por ej.* en un pez). La invención también se refiere a composiciones inmunogénicas para inducir una respuesta inmune contra TiLV en un animal (*p. ej., en un pez*).

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a una secuencia de ácidos nucleicos aislados que tienen la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, secuencias complementarias a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, y sus fragmentos y variantes. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es una secuencia de ADN, incluyendo ADNc. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es una secuencia de ARN.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un ácido nucleico sintético que comprende un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de SEQ ID

NOs: 1-10, secuencias complementarias a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus variantes. Estos ácidos nucleicos sintéticos incluyen cebadores y sondas.

5 En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un conjunto de cebador para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica, en donde el conjunto de cebador comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico sintético seleccionada del grupo que consiste de los ácidos nucleicos sintéticos descritos en el presente
10 documento.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un método para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica, el método que comprende: a) poner en contacto el ácido nucleico de una muestra biológica con al
15 menos un cebador que es un ácido nucleico sintético descrito en el presente documento, b) someter el ácido nucleico y el cebador a condiciones de amplificación y, c) determinar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en donde la presencia del producto de
20 amplificación indica la presencia de ARN asociado al TiLV de la muestra.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a sondas de oligonucleótidos para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica.

25 En ciertos aspectos, la invención está dirigida a las

moléculas de ARNi que dirige los ácidos nucleicos de TiLV, por ejemplo, pero no limitado a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus variantes y el silenciar un gen objetivo.

5 En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un método para reducir los niveles de una proteína del TiLV en un animal, el ARNm viral en un título animal o viral en una célula de un animal, el método comprende administrar al animal un ARNi descrito en el presente documento.

10 En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un polipéptido aislado codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, los ácidos nucleicos con las secuencias complementarias a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, y sus fragmentos y variantes.

15 En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12, y sus fragmentos y variantes.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un medio legible por computadora que tiene almacenado en el mismo: (i) una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de: una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, y una variante de la secuencia de una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs; 1-11; o (ii) una secuencia de

25

aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de: una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, y una secuencia variante de una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs; 1-11.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado que específicamente se une a un polipéptido de la invención (*por ejemplo*, un polipéptido de la SEQ ID NO: 12 o un polipéptido codificado por cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11 o secuencias complementarias a la misma o sus fragmentos o variantes).

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un método para determinar si una muestra contiene o no TiLV, el método que comprende: a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo que específicamente se une a un polipéptido de cualquiera de un polipéptido aislado (o no aislado) de la SEQ ID NO: 12 o sus fragmentos o variantes, o un polipéptido codificado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 o secuencias complementarias al mismo o sus fragmentos o variantes y b) determinar si o no el anticuerpo se une a un antígeno en la muestra biológica, en donde el enlace indica que la muestra biológica contiene TiLV. En ciertas modalidades, la determinación comprende el

uso de un ensayo de flujo lateral o ELISA.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un método para determinar si o no una muestra biológica ha sido infectada por TiLV, el método que comprende: a)

5 determinar si o no una muestra biológica contienen anticuerpos que específicamente se unen a un polipéptido de cualquiera de un polipéptido aislado (o no aislado) de la SEQ ID NO: 12 o sus fragmentos o variantes, o un polipéptido codificado por cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11 o

10 secuencias complementarias a la misma o sus fragmentos o variantes.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas capaces de inducir una respuesta inmune contra TiLV incluyendo TiLV de la

15 invención que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus fragmentos o variantes, o que comprende una secuencia de ADNc complementaria a la hebra sentido o anti-sentido de cualquiera de las SEQ ID NOs: -11 o sus fragmentos o variantes, o que comprende un

20 polipéptido codificado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia de ADNc complementaria a la hebra sentido o anti-sentido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o que comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 12 o sus fragmentos o variantes, o que comprende un TiLV

25 muerto o atenuado.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un método para inducir una respuesta inmune en un animal, el método que comprende administrar una composición inmunogénica descrita en el presente documento.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o reducir la infección por TiLV en un animal, el método que comprende administrar una composición inmunogénica de TiLV descrita en el presente documento.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o reducir la infección por TiLV en un animal, el método que comprende administrar un anticuerpo contra TiLV descrito en el presente documento.

En una modalidad, el método de administración es oral, inmersión o inyección.

15 En otro aspecto, la invención proporciona para el uso de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento en la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de la infección por TiLV en un animal.

20 En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un virus aislado que comprende al menos 24 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) complementario
25 a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un

ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos
alrededor del 60% de identidad de secuencia a cualquiera de
las SEQ ID NOs: 1-11; o un ácido nucleico aislado (o no
aislado) que tiene al menos alrededor del 60% de identidad
5 de secuencia a un ácido nucleico complementario a la
secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un
virus aislado que comprende al menos 8 aminoácidos
consecutivos del polipéptido codificado por un ácido
10 nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de
cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico
aislado (o no aislado) complementario a la secuencia de
cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico
aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60%
15 de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOs:
1-11; o un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene
al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia a un
ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera
de las SEQ ID NOs: 1-11.

20 En ciertos aspectos, la invención se relaciona con
una célula aislada que comprende un ácido nucleico aislado
(o no aislado) que tiene la secuencia de cualquiera de las
SEQ ID NOs: 1-11, secuencias complementarias a las SEQ ID
NOs: 1-11, y sus fragmentos y variantes descritos en el
25 presente documento.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un método para cultivar células que comprende: a) infectar yba célula con TiLV, o un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-
5 11, secuencias complementarias a las SEQ ID NOs: 1-11, y sus fragmentos y variantes descritos en el presente documento, y b) cultivar las células.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un método para probar una vacuna contra TiLV, que comprende:
10 a) poner en contacto las células con una vacuna contra TiLV; b) poner en contacto las células con TiLV; y c) medir el número de células infectadas con TiLV.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un método para probar un fármaco contra TiLV, que comprende:
15 a) poner en contacto las células con un fármaco contra TiLV; b) poner en contacto las células con TiLV; y c) medir el número de células infectadas con TiLV.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un método para probar un fármaco contra TiLV, que comprende:
20 a) poner en contacto las células con TiLV; b) poner en contacto las células con un fármaco contra TiLV; y c) medir la replicación de TiLV.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para identificar y/o generar fármacos antivirales. Por
25 ejemplo, en un aspecto la invención proporciona métodos

para identificar fármacos que se unen a y/o inhibir la función de las proteínas codificadas por TiLV de la invención, o que inhiben la replicación o patogenicidad de TiLV de la invención. Los métodos para identificar los fármacos que afectan o inhiben un objetivo de fármaco particular, tal como un alto rendimiento de métodos de selección de fármacos, son bien conocidos en la materia y pueden aplicarse fácilmente a las proteínas y virus de la presente invención.

La presente invención también proporciona métodos y herramientas para el diseño de fármacos, prueba de agentes, y herramientas para la investigación básica sobre las causas y etiología de TiLV.

Breve descripción de los dibujos

Para el propósito de ilustrar la invención, se representa en dibujos ciertas modalidades de la invención. Sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las modalidades representadas en los dibujos.

La figura 1 muestra las características de la enfermedad de la tilapia y hallazgos patológicos en la tilapia híbrida comercial (*O. niloticus* x *O. aureus* híbrido) (Figura 1A y Figura 1C a la Figura 1E) y en la

tilapia silvestre (*S. galilaeus*) del mar de Galilea (Figura 1B y Figura 1F a Figura 1H). La figura 1A es una fotografía que muestra el brote de la enfermedad de la tilapia en un estanque comercial que resulta en mortalidad masiva (agosto de 2013). La figura 1B es una fotografía de una tilapia enfermo que muestra la contracción del ojo y la pérdida del funcionamiento ocular (phthisis bulbi). La figura 1C muestra la patología macroscópica de la piel que incluye úlceras y erosiones dérmicas de multifocales a coalescentes indicado por las flechas. La figura 1D muestra tinción de hematoxilina y eosina de riñón e intersticio. Las flechas marcan una vena dilatada empacada con un gran número de glóbulos rojos (congestión). Tinción de hematoxilina y eosina (H & E) x10. La figura 1E muestra la tinción de hematoxilina y eosina de la corteza y cerebro. Las flechas marcan los vasos sanguíneos dilatados con gran número de glóbulos rojos dentro de los leptomeninges y materia gris y blanca. Se utilizó tinción H & E x 10. La figura 1F muestra la tinción de hematoxilina y eosina de la corteza y cerebro. Manguitos perivasculares de linfocitos están en círculo. Se utilizó tinción H & E x 40. La figura 1Ga muestra la tinción de hematoxilina y eosina del lente. Los cambios de cataratas se caracterizan por la formación de estructuras esféricas eosinófilas (glóbulos de morgagnian) acompañados por la degeneración de las fibras cristalinas

(en círculo). Se utilizó tinción H & E x 10. La figura 1Gb muestra la tinción de hematoxilina y eosina del lente de control de un pez sano. Se utilizó tinción H & E x 10. La figura 1H muestra la tinción de hematoxilina y eosina del ojo y la córnea. La pérdida de la integridad del epitelio escamoso suprayacente con infiltrado inflamatorio (puntas de flecha) y múltiples capilares dentro del estroma (neovascularización; en círculo). Las fibras de colágeno dentro del estroma superficial son manchadas y son eosinófilo pálido teñido (edema corneal). Se utilizó tinción H & E x 10.

La figura 2 muestran el efecto citopatogénico o inducción de CPE en cultivos infectados y los análisis de microscopia electrónica (ME). La figura 2A muestra imágenes de las células infectadas E-11 con CPE en el día 5 después de la inoculación. La formación de placa y las células vacuoladas se muestran en los bordes de las placas. Los centros de las dos placas están marcados con asteriscos. La figura 2B muestra imágenes de las células cerebrales primarias de la tilapia infectadas con CPE en el día 10 después de la inoculación. La conversión de las típicas células alargadas en las células hinchadas, redondas y granuladas está marcada con flechas. La figura 2 y figura 2D son imágenes de controles, E-11 infectadas por prueba o cerebro de la tilapia primario, respectivamente. La figura

2E y la figura 2F son transmisión de ME de secciones delgadas de las células E-11 infectadas con las partículas densas a los electrones (diámetro, 55 a 60 nm) agregadas y encerradas en la membrana intracitoplásmica (Figura 2E, marcado con una flecha) o dentro del citoplasma (figura 2F). Barras de escala, 200 y 500 nm para la Figura 2E y la Figura 2F, respectivamente. La figura 2G es una imagen de ME de viriones negativamente teñidos, granulado de los sobrenadantes de cultivo E11 infectados. Barra de escala, 100 μ m.

La **figura 3** muestran detección por PCR de TiLV. La Figura 3A muestra la detección de TiLV por PCR. El ARN total fue extraído de cerebros de pescados infectados por TiLV (carriles 1 a 7) y un pescado saludable (carril 10), así como de E-11 y cerebro de tilapia primaria de cultivos celulares infectados (carriles 8 y 9, respectivamente) y fue utilizado como una plantilla para la generación de ADNc. Se amplificó un fragmento de 250-bp con ME1 (SEQ ID NO: 23) y cebadores del clon 7450/150R (SEQ ID NO: 16). La figura 3B muestra que la transcripción inversa fue requerida para la amplificación por PCR de TiLV. Se extrajo el ARN total del sobrenadante (carriles 1 y 2) o de extractos celulares (carriles 3 y 4) del cultivo E-11 infectado por TiLV, o del cultivo de E-11 sin tratamiento (carriles 5 y 6). Las muestras no fueron tratadas con DNasa

y la transcripción inversa se realizó (+) o no (-) antes del paso de PCR. También se incluyó un control negativo de "no ARN" (carril 7). Un fragmento de 491-bp fue amplificado con los cebadores anidados ext-1 (SEQ ID NO: 24) y anidados ext-2 (SEQ ID NO: 25). La figura 3C muestra los resultados de ensayos de sensibilidad de nucleasas. Los ácidos nucleicos protegidos por nucleasa fueron extraídos de viriones purificados y fueron tratados (+) o no (-) con la transcriptasa inversa y/o RNasa I antes de la amplificación por PCR con cebadores específicos a TiLV (anidado ext-1 (SEQ ID NO: 24) y anidados ext-2 (SEQ ID NO: 25) dando por resultado un producto amplificado, 491 bp) o cebadores específicos a SnRV (Snakehead gag-pol fw (SEQ ID NO: 26) y Snakehead gag-pol rev (SEQ ID NO: 27), dando por resultado un producto amplificado, 284 bp). M es el marcador del tamaño de ADN.

La figura 4 muestra la cinética de mortalidad inducida por TiLV. Los pescados se dividieron en grupos de 30 pescados específicos libres de patógeno (SPF, por sus siglas en inglés). Los grupos 1 (diamante sólido) y 2 (triángulo sólido) fueron infectados por inyección intraperitoneal (i.p.) o convivencia, respectivamente. El grupo de control (círculo sólido) fue compuesto de un número idéntico de pescado inoculado con los sobrenadantes de los cultivos de E-11 sin tratamiento. La variabilidad

entre los tres grupos experimentales se determinó mediante pruebas de chi-cuadrado, en las que un valor P de 0.05 se consideró significativo. Las barras representan errores estándar.

5 **La figura 5** muestra el análisis del ensayo *Northern* de ácidos nucleicos de la tilapia enferma en Israel y Ecuador. La figura 5A muestra el análisis del ensayo *Northern* del ARN total extraído del hígado de la tilapia ecuatoriana enferma y se analizó con tres mezclas de las
10 sondas que representan los segmentos 1, 4, 7 y 10 (Combo 1); 3, 6 y 9 (Combo 2); o 2, 5 y 8 (Combo 3) para evitar que la señal se superponga de segmentos de tamaño similares (tres paneles de la derecha). El ARN del virus de la influenza A hibridizada con tres sonda que representan las
15 proteínas HA, NA y matriz que sirven como referencia de tamaño (panel izquierdo). La figura 5B muestra el análisis del ensayo *Northern* del ARN total extraído del cultivo de las células infectadas con TiLV derivado del cerebro de la tilapia de Israel o del sobrenadante del cultivo y se
20 analizó con las tres mezclas de sondas. Los carriles 5, 8 y 11 muestran los resultados de los extractos de las células del cultivo infectado (6 dpi); los carriles 6, 9 y 12 muestran los resultados de los extractos del sobrenadante del cultivo infectado; los carriles 4, 7 y 10 muestran los
25 resultados de los extractos de las células del cultivo no

infectado.

La figura 6 muestra los resultados del PCR diagnóstico convencional usando los cebadores diseñados para amplificar el segmento 3 del genoma de TiLV. La figura es una imagen de una electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación obtenidos de extractos de ácidos nucleicos del sobrenadante del cultivo celular infectado con TiLV. El carril 1 y 12 son marcadores de tamaño. Los carriles 2-10 son diluciones en serie de 2 veces del extracto de ácidos nucleicos. El carril 11 es un control negativo del sobrenadante del cultivo celular no infectado.

La figura 7 muestran los resultados de PCR en tiempo real. La figura 7A es una curva de calibración que utiliza los estándares de plásmido cuantitativo que representan la secuencia objetivo del segmento de TiLV, que va desde 1×10^6 a 1×10^1 moléculas por ensayo. La figura 7B es una curva de calibración que utiliza los estándares de plásmido cuantitativo que representan la secuencia objetivo de la actina beta de la tilapia, que va desde 1×10^6 a 1×10^1 moléculas por ensayo. La figura 7C muestra la detección del TiLV auténtico en varias muestras de tejido de la tilapia enferma de Israel usando cebadores diseñados de y específicos para las secuencias de ácido nucleico de TiLV.

Las tilapias son importantes para la sustentabilidad de los sistemas ecológicos y sirve como el segundo grupo más importante de peces cultivados en todo el mundo. La invención descrita en este documento se refiere a la observación de la mortalidad significativa de tilapias silvestres y cultivadas en Israel y Ecuador.

En el presente documento se informa el aislamiento de un virus sin descripción previa, señalado como Virus de la Tilapia del Lago o TiLV, de peces enfermos espontáneamente y la inducción de la enfermedad en la tilapia por este agente. La incubación de los extractos de las tilapias enfermas, pero no sanas, con cultivos de células de pescado (células del cerebro de tilapia primarias y E-11) dio lugar a la aparición del efecto citopatógeno o CPE en cultivos infectados. Por otra parte, la inoculación de sobrenadantes, cosechados de estos cultivos, en tilapias sin tratamiento resultó en la aparición de la enfermedad. El TiLV fue aislado de nuevo en cultivos celulares de peces experimentalmente infectados, y el agente indujo una enfermedad similar después de la inoculación de un nuevo pez sin tratamiento. Además, una enfermedad experimentalmente inducida fue alcanzada con un TiLV purificado obtenido por diluciones de punto final. Cabe señalar, que los signos de la enfermedad de origen natural

(decoloración, parches cutáneos, alteraciones oculares y letargo) fueron observados en la enfermedad experimentalmente inducida. Las secuencias de TiLV fueron amplificadas de peces enfermos y cultivos celulares infectados por TiLV pero no de peces sin tratamiento, cultivos infectados por prueba o cultivos infectados por otro agente (VNN).

Varias líneas de evidencia indican que este agente infeccioso es un virus. En primer lugar, el agente pasó por filtros de 0.2 μ m conservando su infectividad, descartando la posibilidad de infección por microorganismos mayores que este tamaño de filtro (como bacterias y hongos). En segundo lugar, el aspecto de CPE después de pasajes seriados del agente en los cultivos celulares excluye la posibilidad de un CPE inducido por la toxina filtrable. En tercer lugar, las estructuras tipo virion fueron visualizadas por ME en las células infectadas y en los sobrenadantes de los cultivos de estas células. En cuarto lugar, se demostró la actividad de CPE para las fracciones relativamente densas de gradientes de sacarosa, similares a los viriones montados conocidos. En quinto lugar, el genoma de TiLV encapsulado está hecho de ARN, como lo demuestra el hecho de que se amplificó sólo por RT-PCR (y no por PCR) de muestras de peces enfermos y de cultivos celulares que fueron inoculados con extractos de estos peces, así como

por el hecho de que esta amplificación era sensible a la digestión inicial con RNasa I. Los genomas de ARN sólo se conocen por producir virus. El análisis de la ME y la sensibilidad de TiLV a disolventes orgánicos (éter o cloroformo) que indica además que TiLV es un virus envuelto.

La enfermedad inducida por TiLV en las tilapias fue alcanzada por inyecciones intraperitoneales (i.p.) o por convivencia. El modo de convivencia de transmisión demuestra la capacidad de TiLV para esparcirse por medio del agua. Cabe señalar que, en estos experimentos, se observaron las tasas relativamente altas de mortalidad para las vías i.p. y transmitidas por el agua.

La existencia de peces que sobrevivieron a la enfermedad inducida por TiLV fuertemente indica que se puede montar una respuesta inmune efectiva contra este patógeno. Esto tiene importantes aplicaciones para estrategias de contención de futuras enfermedades. Además de la posibilidad del desarrollo de una vacuna, la determinación de la susceptibilidad de las diferentes especies de tilapia a TiLV debe considerarse una medida de contención de la enfermedad. Esta noción se basa en las diferencias bien documentadas en resistencia a las enfermedades entre especies del mismo género.

Este trabajo proporciona también la caracterización

molecular de TiLV aislada de peces enfermos en Israel y Ecuador. Se identificaron diez segmentos del genoma TiLV del virus en los peces de ambos lugares, resultando en las SEQ ID NOs: 1-11. (SEQ ID NO: 1 es una versión más corta de la SEQ ID NO: 9 - ambos son segmento 3 del genoma de TiLV). Las búsquedas de homología en la base de datos NCBI proporcionaron un único éxito para el segmento 1 del genoma (SEQ ID NO: 7) que indica una homología muy diferente a la polimerasa de ARN dependiente de ARN ortomixoviral. Esto además indica que TiLV un nuevo patógeno emergente para la tilapia. A la luz de la amplia producción comercial de la tilapia y el hecho de que la tilapia sirve como una fuente primaria de proteína en el mundo en desarrollo, es muy importante diagnosticar este nuevo patógeno. La amplificación de las secuencias de TiLV de los peces enfermos y los cultivos infectados por TiLV, descrita en este trabajo, proporciona la base para un diagnóstico basado en PCR, que permite la pronta detección, vigilancia, estudios epidemiológicos y contención de la enfermedad. Adicionalmente, las secuencias de TiLV pueden utilizarse para las vacunas, es decir., composiciones inmunológicas, para inducir la respuesta inmune contra TiLV en poblaciones de tilapia.

El TiLV identificado en este documento es un nuevo virus de ARN. Así, las secuencias de ácidos nucleicos de

ADNc no existen en la naturaleza. En otras palabras, las secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1-11 no son composiciones de origen natural que son notablemente diferentes en estructura que las secuencias de ARN de TiLV de origen natural. Adicionalmente cualquiera de las modalidades de la invención como cebadores, sondas, anticuerpos, composiciones inmunogénicas y células y líneas celulares, que comprenden los ácidos nucleicos de la SEQ ID NOs: 1-11 tampoco ocurriría naturalmente.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que el agente etiológico de esta enfermedad es un nuevo virus de ARN. En ciertos aspectos, la invención también se relaciona con los métodos útiles para aislar y detectar el virus. Como se describe además en el presente documento, el virus, denominado Virus de la Tilapia del Lago (TiLV), puede propagarse en las células cerebrales de la tilapia primaria o en una línea celular E-11. En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que el virus puede inducir un efecto citopático en los días 5 a 10 después de la infección. En ciertos aspectos, la invención se relaciona a hallazgos de la microscopía electrónica que muestran la presencia de partículas icosaédricas envueltas de 55 a 75 nm. En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que el TiLV de bajo paso, inyectado por vía intraperitoneal en la tilapia,

indujo una enfermedad similar a la enfermedad natural, que normalmente se presenta con letargo, alteraciones oculares y erosiones de la piel, con más del 80% de mortalidad.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que los cambios histológicos incluyen congestión de los órganos internos (riñones y cerebro) con focos de gliosis y manguitos perivasculares de los linfocitos en la corteza cerebral; la inflamación ocular incluye endoftalmitis y cambios de cataratas del lente. En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que la convivencia de los peces sanos y enfermos demostraron que la enfermedad es contagiosa y que las mortalidades (80 a 100%) ocurren en unos pocos días. En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que los peces que sobreviven la mortalidad inicial eran inmunes a más infecciones de TiLV, indicando el montaje de una respuesta inmune protectora.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con el hallazgo de que la selección de bibliotecas de ADNc identificó una secuencia específica a TiLV, permitiendo el diseño de una prueba de diagnóstico basada en PCR. En ciertos aspectos, la invención se refiere a pruebas que permiten la identificación específica de TiLV en las tilapias. Dicha prueba es útil para controlar la propagación de este virus en todo el mundo.

Definiciones

Los términos usados en esta descripción generalmente tienen sus significados comunes en la materia, dentro del contexto de esta invención y el contexto específico donde cada término es utilizado. Algunos términos se mencionan a continuación, o en otra parte de la descripción, para proporcionar orientación adicional al practicante en la descripción de los métodos de la invención y cómo utilizarlos. Además, se apreciará que lo mismo se puede decir más de una manera. Por lo tanto, se puede utilizar lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos discutidos en este documento, no se coloca un significado especial a menos que el término sea elaborado o mencionado en el presente documento. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Un recital de uno o más sinónimos no excluye el uso de los otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de la descripción, incluyendo ejemplos de cualquiera de los términos discutidos en este documento, es ilustrativo solamente y de ninguna manera limita el alcance y significado de la invención o cualquier término ejemplificado. Asimismo, la invención no se limita a sus modalidades preferidas.

De acuerdo con la presente invención, puede haber numerosas herramientas y técnicas dentro de la materia, tales como las aquellas habitualmente utilizadas en

inmunología molecular, inmunología celular, farmacología y microbiología. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Bonifacino *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coligan *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coico *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coligan *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; and Enna *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.

Las formas singulares "un/una", "uno/una" y "el/la" incluye referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

El término "acerca de" se usa en el presente documento para que signifique aproximadamente, en la región de, aproximadamente, o alrededor. Cuando el término "acerca de" se utiliza en conjunto con un rango numérico, éste modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "acerca de" se utiliza aquí para modificar un

valor numérico por encima y por debajo del valor indicado por una variación del 20%.

5 Como se utiliza en este documento, "TiLV" se refiere a aislados del Virus de la Tilapia del Lago descritos en el presente documento.

Como se utiliza en este documento, un "gen TiLV" se refiere a cualquiera de los genes o segmentos de genes como se describe en la SEQ ID Nos: 1-11, identificados en el genoma de TiLV.

10 Como se utiliza en este documento, el término "animal" se refiere a un vertebrado, incluyendo, pero no limitado a, peces, (p. ej. tilapia).

"Substancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más
15 secuencias o subsecuencias que tienen al menos un 98%, al menos 99% o más de una identidad de residuo de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia, según lo medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por
20 inspección visual.

"Porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos que dos o más secuencias o subsecuencias contienen como iguales. Un
25 porcentaje específico de nucleótidos puede denominarse

como: identidad del 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más identidad sobre una región determinada, cuando se compara y se alinea para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región señalado según lo medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual y alineación manual.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en este documento, incluye la referencia a un segmento de cualquier número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de 20 a 600, generalmente acerca de 50 a acerca de 200, más generalmente de 100 a cerca de 150 en la que una secuencia puede compararse a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean perfectamente. Los métodos de alineación de las secuencias para comparación son bien conocidos en la materia. La alineación óptima de las secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS* 85: 2444, por aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (FASTDB (Intelligenetics), BLAST (*National*

Center for Biomedical Information), GAP, BESTFIT, FASTA, y
 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics
 Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por
 alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo,
 5 Ausubel).

En el contexto de los ácidos nucleicos los símbolos
 base pueden utilizarse para representar una posición en una
 secuencia de ácido nucleico que puede tener varias
 alternativas posibles. Por ejemplo, "W" representa A o T;
 10 "S" representa C o G; "M" representa A o C; "K" representa
 G o T; "R" representa A o G; "Y" representa C o T; "B"
 representa C, G o T; "D" representa A, G o T; "H"
 representa A, C, o T; "V" representa A, C, o G.

Se entenderá que, para los polipéptidos de TiLV
 15 particulares descritos en el presente documento, puede
 existir variaciones naturales entre las cepas de TiLV
 individuales. Estas variaciones pueden demostrarse por
 (una) diferencia(s) del aminoácido en la secuencia general
 o por supresiones, sustituciones, inserciones, inversiones
 20 o adiciones de (un) aminoácido(s) en dicha secuencia. Se
 han descrito sustituciones de aminoácidos que no alteran
 esencialmente las actividades biológicas e inmunológicas,
 por ejemplo, por Neurath et al en "The Proteins" Academic
 Press New York (1979). Los reemplazos de aminoácido entre
 25 los aminoácidos relacionados 15 o reemplazos que se han

producido con frecuencia en la evolución son, entre otras cosas, Ser/Ala, Gly/Ser, Asp/Asn, Asp/Gly, Ile/Val (ver Dayhof, M. D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, 5 supl. 3). Otras substituciones de aminoácido incluyen Asp/Glu, Ser/Thr, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Pro/Ala, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val y Ala/Glu. Basado en esta información, Lipman y Pearson desarrollaron un método para una comparación de proteína rápida y 10 sensible (*Science* (1985) 227:1435) y determinar la similitud funcional entre las proteínas homólogas. Dichas substituciones de aminoácido de las modalidades ejemplares de esta invención, así como variaciones que tienen supresiones e/o inserciones están dentro del alcance de la 15 invención siempre que las proteínas resultantes retengan su reactividad inmune. Se sabe que las secuencias de polipéptidos que tienen un o más variaciones de secuencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de referencia todavía pueden ser útiles para la generación de 20 anticuerpos que se unen el polipéptido de referencia.

Ácidos nucleicos y sus usos

La presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico de TiLV. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden ser útiles para, entre otras cosas, expresión de sus 25 proteínas o fragmentos, variantes o derivados que codifican

TiLV, generación de anticuerpos contra las proteínas de TiLV, generación de cebadores y sondas para la detección de TiLV y/o para diagnosticar la infección por TiLV, generando composiciones inmunogénicas contra TiLV, y seleccionar fármacos eficaces contra TiLV como se describe en este documento.

En ciertos aspectos, se proporcionan las secuencias de ácido nucleico de TiLV en la SEQ ID NOs: 1-11, correspondientes a los segmentos de genoma de TiLV (ver Tabla 2).

En ciertos aspectos, la invención se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos aislados de TiLV como se proporciona en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11

En ciertos aspectos, la invención se dirige a un ácido nucleico aislado complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a una secuencia de ácido nucleico de TiLV que tiene más del 60% de similitud a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

En ciertos aspectos, la invención se dirige a variantes de la secuencia de ácidos nucleicos aislados de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus fragmentos. Las variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que

tiene al menos de acerca de 50% a acerca de 55% de
identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
5 tiene al menos de acerca de 55.1 % a acerca de 60% de
identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
tiene al menos de acerca de 60.1% a acerca de 65% de
10 identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
tiene al menos de acerca de 65.1 % a acerca de 70% de
identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
15 variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
tiene al menos de acerca de 70.1% a acerca de 75% de
identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
20 pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
tiene al menos de acerca de 75.1% a acerca de 80% de
identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
25 tiene al menos de acerca de 80.1% a acerca de 85% de

identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
tiene al menos de acerca de 85.1% a acerca de 90% de
5 identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que
tiene al menos de acerca de 90.1% a acerca de 95% de
identidad a la de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
10 variantes de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluye,
pero no se limita a, las secuencias de ácido nucleico que
tiene acerca del 95.1%, acerca del 95.5%, acerca del 96%,
acerca del 96.5%, acerca del 97%, acerca del 97.5%, acerca
del 98%, acerca del 98.5%, acerca del 99%, acerca del 99.5%
15 o acerca del 99.9% de identidad a cualquiera de las SEQ ID
NOs: 1-11. Los programas y algoritmos para la alineación de
secuencias y comparación del % de identidad y/o homología
entre las secuencias de ácido nucleico son bien conocidas
en la materia, e incluyen BLAST, herramienta de alineación
20 SIM, y así sucesivamente.

En una modalidad, la invención proporciona un ácido
nucleico aislado que tiene una secuencia substancialmente
idéntica a un ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID
NOs: 1-11, o su fragmento. En una modalidad adicional, la
25 invención proporciona un ácido nucleico aislado que tiene

una secuencia substancialmente idéntica a un ácido nucleico complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o su fragmento.

En una modalidad, la invención se dirige a una
5 secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 50 nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido
10 nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 100 nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que
15 comprende acerca de 10 a acerca de 200 nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende
20 acerca de 10 a acerca de 300 nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende
25 10 a acerca de 400 nucleótidos consecutivos de cualquiera o

SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 500

5 nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 600 nucleótidos

10 consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 700 nucleótidos consecutivos de

15 cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 800 nucleótidos consecutivos de cualquiera o

20 SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 900 o más nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs:

25 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las

SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 1000 o más nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 1200 o más nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 1400 o más nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante. En una modalidad, la invención se dirige a una secuencia de ácido nucleico aislado que comprende acerca de 10 a acerca de 1640 o más nucleótidos consecutivos de cualquiera o SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementaria a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y su variante.

Se incluyen en la invención secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridizar a las secuencias de polinucleótidos reivindicados, incluyendo cualquiera de las secuencias de ácido nucleico divulgados

en el presente documento, y sus fragmentos bajo diversas condiciones de exigencia de los polinucleótidos homólogos a las secuencias ilustradas en la SEQ ID NOs: 1-11, se pueden identificar, *por ejemplo*, por hibridación entre sí bajo

5 condiciones estrictas o bajo condiciones muy estrictas. El término "hibridación de ácido nucleico" hace referencia a un enlace de hidrógeno antiparalelo entre dos ácidos nucleicos de única hebra, en el que A hace par con T (o U si un ácido nucleico de ARN) y C hace par con G. Las

10 moléculas de ácido nucleico son "hibridizables" entre sí cuando al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con las bases complementarias de otra molécula de ácido nucleico bajo condiciones de exigencia. La exigencia de una hibridación

15 refleja el grado de identidad de la secuencia de los ácidos nucleicos implicados, de manera que cuanto mayor sea la exigencia, más similares son las dos hebras de polinucleótido. La exigencia de la hibridación se determina, *por ejemplo*, por (i) la temperatura en que se

20 realiza la hibridación y/o lavado, y (ii) la fuerza iónica y (iii) la concentración de desnaturalizantes como la formamida de la hibridación y soluciones de lavado, así como otros parámetros. La hibridación requiere que las dos hebras contengan secuencias substancialmente

25 complementarias. Dependiendo de la exigencia de la

hibridación, sin embargo, se puede tolerar cierto grado de desajustes. Bajo condiciones "de poca exigencia", se puede tolerar un mayor porcentaje de desajustes (*es decir*, no impedirá la formación de un híbrido antiparalelo). Las
5 condiciones de hibridación para diversas exigencias se conocen en la materia y son divulgadas en detalle en por lo menos Sambrook *et al.*

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con un ácido nucleico sintético que comprende los nucleótidos de
10 un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60%
15 de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia a un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no
20 aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID
25 NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que

comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de una
secuencia que tiene al menos 60% de identidad a cualquiera
de las SEQ ID NOs: 1-11; o un ácido nucleico aislado (o no
aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos
5 de una secuencia que tiene al menos 60% de identidad a un
ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera
de las SEQ ID NOs: 1-11.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un
ácido nucleico sintético que tiene una secuencia que
10 consistede acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos
consecutivos de una secuencia de ácido nucleico
seleccionada del grupo de secuencia que consiste de SEQ ID
NOs: 1-11.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un
15 ácido nucleico sintético que tiene una secuencia que
consiste de acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos
consecutivos que consiste de nucleótidos que tienen una
secuencia que es una variante de cualquiera de las SEQ ID
NOs: 1-11 que tiene al menos acerca del 95.1%, acerca del
20 95.5%, acerca del 96%, acerca del 96.5%, acerca del 97%,
acerca del 97.5%, acerca del 98%, acerca del 98.5%, acerca
del 99%, acerca del 99.5% o acerca del 99.9% de identidad a
cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona una
25 composición que comprende uno o más ácidos nucleicos que

tiene una secuencia que consiste de acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencia que consiste de SEQ ID NOs: 1-11.

5 En todavía otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos que tiene una secuencia que consiste de acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos consecutivos que consiste de nucleótidos que tienen una secuencia que es una variante de cualquiera
10 de las SEQ ID NOs: 1-11 que tiene al menos acerca del 95.1%, acerca del 95.5%, acerca del 96%, acerca del 96.5%, acerca del 97%, acerca del 97.5%, acerca del 98%, acerca del 98.5%, acerca del 99%, acerca del 99.5% o acerca del 99.9% de identidad a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

15 En todavía otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico sintético que tiene una secuencia que consistede acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico
20 seleccionada del grupo de secuencia que consiste de SEQ ID NOs: 1-11.

 En todavía otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico sintético que tiene una secuencia que consiste de acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos
25 consecutivos que es complementario a un ácido nucleico que

consiste de nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia que es una variante de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 que tiene al menos acerca del 95.1%, acerca del 95.5%, acerca del 96%, acerca del 96.5%, acerca del 97%,
5 acerca del 97.5%, acerca del 98%, acerca del 98.5%, acerca del 99%, acerca del 99.5% o acerca del 99.9% de identidad a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos que
10 tiene una secuencia que consistede acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencia que consiste de SEQ ID NOs: 1-11.

15 En todavía otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos que tiene una secuencia que consiste de acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos consecutivos que es complementario a un ácido nucleico que consiste de nucleótidos consecutivos que
20 tienen una secuencia que es una variante de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 que tiene al menos acerca del 95.1%, acerca del 95.5%, acerca del 96%, acerca del 96.5%, acerca del 97%, acerca del 97.5%, acerca del 98%, acerca del 98.5%, acerca del 99%, acerca del 99.5% o acerca del 99.9%
25 de identidad a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

En otros aspectos la invención está dirigida a las secuencias de ácido nucleico aislado como cebadores y sondas, que comprenden secuencias de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Dichos cebadores y/o
5 sondas pueden ser útiles para detectar la presencia de TiLV de la invención, por ejemplo, en muestras de fluidos corporales como sangre, saliva u orina de un animal y así pueden ser útiles en el diagnóstico de infección por TiLV. Estas sondas pueden detectar polinucleótidos de cualquiera
10 de las SEQ ID NOs: 1-11 en las muestras que comprenden TiLV representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11. Los ácidos nucleicos aislados que se puede utilizar como cebador y sondas son de longitud suficiente para permitir la hibridación con, *es decir*, formación de dúplex con una
15 correspondiente secuencia de ácido nucleico objetivo, unas secuencias de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus fragmentos y variantes.

El ácido nucleico aislado de la invención que puede ser utilizado como cebadores y/o sondas puede comprender
20 acerca de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 40, 45, 50, 55 , 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o las secuencias
25 complementarias a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus

variantes. La invención también se dirige a cebador y/o sondas que pueden marcarse por cualquier molécula y/o marca adecuada conocida en la materia, por ejemplo, pero no limitado a, etiquetas fluorescentes adecuadas para uso en la amplificación por PCR en tiempo real, por ejemplo TaqMan, cybergreen, sondas TAMRA y/o FAM; radiomarcas y así sucesivamente. En ciertas modalidades, los cebadores y/o sondas de oligonucleótidos comprenden además una marca no isotópica detectable seleccionada del grupo que consiste de: una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima, un cofactor, un sustrato de la enzima y un hapteno.

En otro aspecto, la invención proporciona una sonda de oligonucleótidos que comprende de alrededor de 10 nucleótidos a alrededor de 50 nucleótidos, en donde por lo menos alrededor de 10 nucleótidos contiguos son por lo menos 95% complementarios a una región objetivo de ácido nucleico dentro de una secuencia de ácido nucleico de TiLV en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, en donde la sonda de oligonucleótidos hibridiza a la región objetivo de ácido nucleico bajo condiciones moderadas a extremadamente exigentes para formar un dúplex de sonda objetivo: oligonucleótido de ácido nucleico detectable. En una modalidad, la sonda de oligonucleótido es por lo menos aproximadamente 95.5%, aproximadamente 96%, aproximadamente

96.5%, aproximadamente 97%, aproximadamente 97.5%,
aproximadamente 98%, aproximadamente 98.5%, aproximadamente
99%, aproximadamente 99.5% o aproximadamente 99.9%
complementaria con las SEQ ID NOs: 1-11. En otra modalidad
5 la sonda de oligonucleótido consiste esencialmente de
alrededor de 10 a alrededor de 50 nucleótidos.

En ciertos aspectos, la invención se dirige a
conjuntos de cebadores que comprenden ácidos nucleicos
aislados como se describe en el presente documento, dichos
10 conjuntos de cebador son adecuados para la amplificación de
ácidos nucleicos de muestras que comprende TiLV
representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus
variantes. Los conjuntos de cebador pueden comprender
cualquier combinación adecuada de cebadores que podrían
15 permitir la amplificación de unas secuencias de ácido
nucleico objetivo en una muestra que comprende TiLV
representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus
variantes. La amplificación puede realizarse por cualquier
método conocido en la materia, por ejemplo, pero no
20 limitado a PCR, RT-PCR, amplificación mediada por
transcripción (TMA).

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un
conjunto de cebador para determinar la presencia o ausencia
de TiLV en una muestra biológica, en donde el conjunto de
25 cebador comprende por lo menos una secuencia de ácido

nucleico sintético seleccionada del grupo que consiste del ácido nucleico sintético descrito en el presente documento.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un conjunto de cebador para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica, en donde el conjunto de cebador comprende al menos una secuencia de ácido nucleico sintético seleccionada del grupo que consiste de: un ácido nucleico sintético que tiene una secuencia que consiste de alrededor de 10 a alrededor de 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencia que consiste de SEQ ID NOs: 1-11 o sus variantes como se describe en el presente documento; o un ácido nucleico sintético que tiene una secuencia que consistede acerca de 10 a acerca de 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencia que consiste de SEQ ID NOs: 1-11 o sus variantes como se describe en este documento.

Los conjuntos de cebador pueden diseñarse por los expertos en la materia usando las secuencias de las SEQ ID NOs: 1-11. Ejemplos de pares de cebador útiles para los métodos de detección usando PCR son:

ME1 (SEQ ID NO: 23) y cebadores del clon 7450/150R (SEQ ID NO: 16);

Anidado ext-1 (SEQ ID NO: 24) y anidado ext-2 (SEQ ID NO: 25);

NM-CLU7-SF1 (SEQ ID NO: 28) y NM-CLU7-SRI (SEQ ID NO: 29);

5 TiLV-CLU5-cF1 (SEQ ID NO: 30) y TiLV-CLU5-cR1 (SEQ ID NO: 31); y

CLU5-ARNm-qF1 (SEQ ID NO: 34) y CLU5-ARNm-qR1 (SEQ ID NO: 35).

10 Con sonda opcional, sonda de CLU5-ARNm (SEQ ID NO: 36).

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un método para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica, el método que comprende: a) poner en contacto el ácido nucleico de una muestra biológica con al menos un cebador que es un ácido nucleico sintético de un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia a un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido

15

20

25

nucleico aislado (o no aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia que tiene al menos 60% de identidad a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; o un ácido nucleico aislado (o no aislado) que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia que tiene al menos 60% de identidad a un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, b) someter el ácido nucleico y el cebador a las condiciones de amplificación y, c) determinar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en donde la presencia del producto de amplificación indica la presencia de ARN asociado con el TiLV de la muestra.

La invención también se relaciona con un método para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica, el método que comprende: a) poner en contacto el ácido nucleico de una muestra biológica con un par de cebador elegido del grupo que consiste de: ME1 (SEQ ID NO: 23) y cebadores del clon 7450/150R (SEQ ID NO: 16); Anidado ext-1 (SEQ ID NO: 24) y anidado ext-2 (SEQ ID NO: 25); NM-CLU7-SF1 (SEQ ID NO: 28) y NM-CLU7-SRI (SEQ ID NO: 29);

TiLV-CLU5-cF1 (SEQ ID NO: 30) y TiLV-CLU5-cR1 (SEQ ID NO: 31) y CLU5-ARNm-qF1 (SEQ ID NO: 34) y CLU5-ARNm-qR1 (SEQ ID NO: 35), b) someter el ácido nucleico y el par cebador a las condiciones de amplificación y, c) determinar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en donde la presencia del producto de amplificación indica la presencia de ARN asociado con el TiLV de la muestra.

En otros aspectos, la invención se dirige a constructos de expresión, por ejemplo, pero no limitado, a plásmidos y vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus secuencias complementarias, sus fragmentos y variantes. Dichos constructos de expresión pueden prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos constructos de expresión son adecuados para la expresión y purificación de proteína y/o ácido nucleico viral.

En ciertos aspectos, la invención está dirigida a las moléculas de ARN de interferencia (ARNi) que dirige los ácidos nucleicos de TiLV, por ejemplo, pero no limitado a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus variantes y el silenciar un gen objetivo.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un ARNi que comprende una hebra sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la hebra anti-sentido de un gen que comprende una secuencia de ácido

nucleico seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-11.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un ARNi que comprende una hebra anti-sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la hebra sentido de un gen que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-11.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona con ARNi que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11; o un ácido nucleico aislado (o no aislado) que tiene al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia a un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

Un "agente de ARNi" (abreviatura para "agente de ARN de interferencia") como se utiliza en el presente documento, es un agente de ARN, que puede regular a la baja la expresión de un gen objetivo, *por ejemplo*, un gen TiLV. Un agente de ARNi puede actuar por uno o más de un número de mecanismos, incluyendo escisión postranscripcional de un

objetivo de ARNm a veces referido en la materia como ARNi, o mecanismos pretranscripcional o pretraducción. Un agente de ARNi puede ser un agente de ARNi de doble hebra (ds).

Un "agente de ARNi ds" (abreviatura para "agente de ARNi de doble hebra"), como se utiliza en el presente documento, es un agente de ARNi que incluye más de uno, y en ciertas modalidades dos, las hebras en las que se pueden formar la hibridación de intercadena de una región de estructura dúplex. Una "hebra" en este documento se refiere a una secuencia contigua de nucleótidos (incluyendo nucleótidos modificados o de origen natural). Las dos o más hebras pueden ser, o cada una forma parte de, moléculas separadas, o pueden estar covalentemente interconectadas, *por ejemplo*, por un vinculador, *por ejemplo*, un vinculador de polietilenglicol, para formar una molécula. Por lo menos una hebra puede incluir una región que es suficientemente complementaria a un ARN objetivo. Dicha hebra se denomina la "hebra antisentido". Una segunda hebra comprendida en el agente de ARNds que comprende una región complementaria a la hebra antisentido se denomina la "hebra sentido". Sin embargo, un agente de ARNi ds puede también formarse a partir de una sola molécula de ARN que es, al menos en parte; autocomplementaria, formando, *por ejemplo*, una estructura de horquilla o franja, incluyendo una región dúplex. En tal caso, el término "hebra" se refiere a una de

las regiones de la molécula de ARN que es complementaria a otra región de la misma molécula de ARN.

Los agentes de ARNi descritos en el presente documento, incluyendo los agentes de ARNi ds y agentes de ARNsi, pueden mediar el silenciamiento de un gen, *por ejemplo*, por la degradación del ARN. Para su comodidad, tal ARN es también conocido en el presente documento como el ARN a silenciarse. Dicho gen también se conoce como un gen objetivo. En algunas modalidades, el ARN a silenciarse es un producto de gen de un gen de TiLV.

Como se utiliza en este documento, la frase "media ARNi" se refiere a la capacidad de un agente a silenciarse, de una forma específica de secuencia, un gen objetivo. "Silenciar un gen objetivo" significa el proceso por el que una célula que contiene y/o secreta un determinado producto del gen objetivo cuando no está en contacto con el agente, contendrá y/o secretará al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% menos de tal producto de gen cuando se pone en contacto con el agente, en comparación con una célula similar que no se ha puesto en contacto con el agente. Dicho producto del gen objetivo puede, *por ejemplo*, puede ser un ARN mensajero (ARNm), una proteína o un elemento regulador.

En los usos anti-virales de la presente invención, el silenciamiento de un gen objetivo puede resultar en una

reducción en el "título viral" en la célula o en el animal, en donde "reducción en el título viral" se refiere a una disminución en el número de virus viable producido por una célula o se encuentran en un organismo que se somete al silenciamiento de un gen objetivo viral. La reducción en la cantidad celular de virus producido puede llevar a una disminución en la cantidad de virus medible producida en los tejidos de un animal que se somete a tratamiento y una reducción en la severidad de los síntomas de la infección viral. Los agentes de ARNi de la presente invención se denominan también como "agentes de ARNi antivirales".

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para reducir el título viral en un animal, mediante la administración a un animal, por lo menos un ARNi que inhibe la expresión de un gen de TiLV.

En ciertos aspectos, la invención proporciona métodos para reducir los niveles de una proteína viral, ARNm viral o título viral en una célula de un animal que comprende: administrar un agente de ARNi a un animal, en donde el agente ARNi comprende una hebra sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a un segmento de gen o genoma de TiLV que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencias que consisten de SEQ ID NOs: 1-11 y una hebra anti-sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos

contiguos complementarios a la hebra sentido. En una modalidad, el método que además comprende administrar conjuntamente un segundo agente de ARNi al animal, en donde el segundo agente de ARNi comprende una hebra sentido que

5 tiene por lo menos 15 o más nucleótidos contiguos complementarios a un segundo segmento de gen o genoma del TiLV que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencias que consiste de las SEQ ID Nos: 1-11 y una hebra anti-sentido que tiene por lo

10 menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la hebra sentido.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un método para reducir los niveles de una proteína viral de al menos un gen de TiLV en una célula en un animal que

15 comprende: administrar un agente de ARNi a un animal, en donde el agente ARNi comprende una hebra sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a un gen de TiLV que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de secuencias que consisten de las

20 SEQ ID NOS : 1-11 y una hebra anti-sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la hebra sentido.

Polipéptidos aislados y sus usos

La invención también se dirige a polipéptidos

25 aislados y sus variantes y derivados. Estos polipéptidos

pueden ser útiles para múltiples aplicaciones, incluyendo, pero no limitado a, generación de anticuerpos y de composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, la invención se relaciona a un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12. Por ejemplo, la invención se relaciona también a cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes. Un péptido de al menos 8 residuos de aminoácidos en longitud puede ser reconocido por un anticuerpo MacKenzie *et al.* (1984) *Biochemistry* 23: 6544-6549). En ciertas modalidades, la invención se dirige a los fragmentos de los polipéptidos descritos, en el presente documento, que pueden, por ejemplo, usarse para generar anticuerpos.

Así, en ciertos aspectos, la invención se relaciona a un polipéptido aislado que tiene por lo menos alrededor de 80% de la identidad de secuencia al polipéptido de la SEQ ID NO: 12. En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un polipéptido aislado que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos del polipéptido de la SEQ ID NO: 12. En ciertos aspectos, la invención se relaciona a un polipéptido aislado que comprende al menos 8 aminoácidos que tienen al menos alrededor de 80% de identidad a la secuencia del polipéptido de la SEQ ID NO: 12.

En un aspecto, la invención se dirige a variantes de

polipéptido de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12. Las variantes de los polipéptidos aislados de la SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 50% a

5 alrededor de 55% de identidad a la de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12. Las variantes de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 55.1 % a alrededor de 60% de

10 identidad a la de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12. Las variantes de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 60.1% a alrededor de 65% de identidad a la de un polipéptido

15 aislado de la SEQ ID NO: 12. Las variantes de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 65.1 % a alrededor de 70% de identidad a la de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO:

20 12. Las variantes de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 70.1% a alrededor de 75% de identidad a la de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO:

25 NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de

polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 75.1% a
alrededor de 80% de identidad a la de un polipéptido
aislado de la SEQ ID NO: 12. Las variantes de un
polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no
5 se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al
menos de alrededor de 80.1% a alrededor de 85% de identidad
a la de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12. Las
variantes de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12
incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos
10 que tienen al menos de alrededor de 85.1% a alrededor de
90% de identidad a la de un polipéptido aislado de la SEQ
ID NO: 12. Las variantes de un polipéptido aislado de la
SEQ ID NO: 12 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de
polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 90.1% a
15 alrededor de 95% de identidad a la de un polipéptido
aislado de la SEQ ID NO: 12. Las variantes de un
polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12 incluye, pero no se
limita a, secuencias de polipéptido que tiene al menos de
alrededor de 95.1%, alrededor de 95.5%, alrededor de 96%,
20 alrededor de 96.5%, alrededor de 97%, alrededor de 97.5%,
alrededor de 98%, alrededor de 98.5%, alrededor de 99%,
alrededor de 99.5% o alrededor de 99.9% de identidad al de
un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12.

En un aspecto, la invención se dirige a variantes de
25 polipéptido de cualquier polipéptido aislado codificado por

la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID
NOs: 1-11. Las variantes de cualquiera de los polipéptidos
aislados codificados por el ácido nucleico de cualquiera de
las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a,
5 secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor
de 50% a alrededor de 55% de identidad a la de un
polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido
nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las variantes de
cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la
10 secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID
NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de
polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 55.1 % a
alrededor de 60% de identidad a la de un polipéptido
aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de
15 las SEQ ID NOs: 1-11. Las variantes de cualquiera de los
polipéptidos aislados codificados por la secuencia de ácido
nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,
pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen
al menos de alrededor de 60.1% a alrededor de 65% de
20 identidad a la de un polipéptido aislado codificado por la
secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las
variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados
codificados por la secuencia de ácido nucleico de
cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se
25 limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos

de alrededor de 65.1 % a alrededor de 70% de identidad a la de un polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la

5 secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 70.1% a alrededor de 75% de identidad a la de un polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las

10 variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 75.1% a alrededor de 80% de identidad a la

15 de un polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de

20 polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 80.1% a alrededor de 85% de identidad a la de un polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la secuencia de ácido

25 nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen,

pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 85.1% a alrededor de 90% de identidad a la de un polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las

5 variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluyen, pero no se limitan a, secuencias de polipéptidos que tienen al menos de alrededor de 90.1% a alrededor de 95% de identidad a la

10 de un polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11. Las variantes de cualquiera de los polipéptidos aislados codificados por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 incluye, pero no se limita a, secuencias de

15 polipéptido que tiene al menos de alrededor de 95.1%, alrededor de 95.5%, alrededor de 96%, alrededor de 96.5%, alrededor de 97%, alrededor de 97.5%, alrededor de 98%, alrededor de 98.5%, alrededor de 99%, alrededor de 99.5% o alrededor de 99.9% de identidad al de cualquiera de las SEQ

20 ID NOs: 1-11.

La invención también se dirige a un polipéptido codificado por un ácido nucleico que es complementario a una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus fragmentos y variantes.

25 La invención se dirige a un polipéptido que comprende

de alrededor de 10 a alrededor de 50 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 100 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 150 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 200 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 300 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 350 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 400 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 420 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12 o sus variantes. En algunas modalidades, la invención se dirige a péptidos

aislados y purificados.

En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención pueden ser adecuados para usarse como antígenos para detectar anticuerpos contra la SEQ ID NO: 12 y sus variantes. En otras modalidades, los polipéptidos de la presente invención que comprenden determinantes antigénicos pueden utilizarse en diversos inmunoensayos para identificar animales expuestos a y/o muestras que comprenden la SEQ ID NO: 12 y sus variantes.

La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 50 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes.

La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 100 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 150 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La invención se dirige a un polipéptido que comprende de

alrededor de 10 a alrededor de 200 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

5 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 250 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

10 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 300 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

15 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 350 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

20 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 400 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

25 invención se dirige a un polipéptido que comprende de

alrededor de 10 a alrededor de 450 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

5 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 460 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

10 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 470 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

15 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 480 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

20 invención se dirige a un polipéptido que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 490 aminoácidos consecutivos de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o variantes. La

25 invención se dirige además a un polipéptido que comprende

de alrededor de 10 a alrededor de 550 aminoácidos consecutivos o más de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o sus secuencias complementarias o
5 variantes. En algunas modalidades, la invención se dirige a péptidos aislados y purificados.

En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención pueden ser adecuados para usarse como antígenos para detectar anticuerpos contra TiLV
10 representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus variantes. En otras modalidades, los polipéptidos de la presente invención que comprenden determinantes antigénicos pueden utilizarse en diversos inmunoensayos para identificar animales expuestos a y/o muestras que
15 comprenden TiLV representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus variantes.

Anticuerpos, métodos de fabricación y métodos para utilizarlos

En otro aspecto, la invención se dirige a un
20 anticuerpo que específicamente se une a los aminoácidos del polipéptido de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12, sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento. En una modalidad el anticuerpo es purificado. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los
25 anticuerpos también pueden ser quiméricos (es decir, una

combinación de secuencias de más de una especie, por ejemplo, una inmunoglobulina de humano-ratón quimérica), humanizado o completamente humano. Los anticuerpos específicos de especies evitar algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que poseen las regiones variables y/o constantes de otras especies. La presencia de tales secuencias de proteínas de otras especies puede conducir a la rápida separación de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo por un anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se dirige a un anticuerpo que específicamente se une a los aminoácidos del polipéptido de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-11, sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento. En una modalidad el anticuerpo es purificado. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos también pueden ser quiméricos (*es decir*, una combinación de secuencias de más de una especie, por ejemplo, una inmunoglobulina de humano-ratón quimérica), humanizado o completamente humano. Los anticuerpos específicos de especies evitar algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que poseen las regiones variables y/o constantes de otras especies. La presencia de tales secuencias de proteínas de otras

especies puede conducir a la rápida separación de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo por un anticuerpo.

Un anticuerpo descrito en esta solicitud puede
5 incluir o derivarse de cualquier mamífero, tal como pero no limitado a, un pájaro, un perro, un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate o cualquier combinación de éstos e incluye anticuerpos adaptados por CDR o injertado por CDR y/o humanos, aviar, primates,
10 roedores, mamíferos, quiméricos, humanizados aislados, inmunoglobulinas, productos de escisión y otras porciones y sus variantes.

Cualquier método conocido en la materia para producir anticuerpos pueden utilizarse para generar los anticuerpos
15 descritos en el presente documento. Los métodos ejemplares incluyen inoculación animal, visualización de fago, tecnología de ratón transgénico y tecnología de hibridoma.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para modular la actividad de cualquier
20 polipéptido codificado por la secunecia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus variantes o fragmentos. En ciertos aspectos, la invención se dirige a un método para tratar un animal, el método que comprende administrar al animal un anticuerpo que específicamente se
25 une a los aminoácidos del polipéptido de cualquier

polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-11, sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento.

En ciertas modalidades, el anticuerpo que se una al
5 polipéptido de cualquier polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes, como se describe en este documento, pueden interferir o inhibir la función del polipéptido, proporcionando así un método para inhibir la
10 propagación y esparcimiento del virus. En otras modalidades, el anticuerpo se une al polipéptido de cualquier polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes, como se describe en este documento
15 y no interfieren o inhiben la función del polipéptido.

En otras modalidades, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para purificar un polipéptido de la SEQ ID NO: 12, sus variantes o fragmentos como se describe en este documento. En otras modalidades, los anticuerpos de la
20 invención pueden utilizarse para identificar la expresión y ubicación del polipéptido de la SEQ ID NO: 12, sus variantes, fragmentos o dominios. El análisis de la expresión y localización del polipéptido de la SEQ ID NO: 12 puede ser útil para determinar el papel potencial del
25 polipéptido de la SEQ ID NO: 12.

En otras modalidades, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para purificar polipéptidos de cualquier polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus variantes o
5 fragmentos como se describe en este documento. En otras modalidades, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para identificar la expresión y ubicación del polipéptido de cualquier polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID
10 NOs: 1-11, sus variantes, fragmentos o dominios. El análisis de la expresión y ubicación del polipéptido de cualquier polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 pueden ser útiles en determinar el papel potencial del polipéptido de
15 cualquier polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y sus fragmentos y variantes.

En otras modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en varios inmunoensayos para
20 identificar animales expuestos a y/o muestras que comprenden antígenos de TiLV representado por la SEQ ID NO: 12, y sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento.

En otras modalidades, los anticuerpos de la presente
25 invención pueden usarse en varios inmunoensayos para

identificar animales expuestos a y/o muestras que comprenden antígenos de TiLV representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, y sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento.

5 También puede utilizarse cualquier inmunoensayo adecuado que puede conducir a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Las variaciones y diferentes formatos de inmunoensayos, por ejemplo, pero no limitados a ELISA, ensayos de flujo lateral para la detección de analitos en
10 muestras, inmunoprecipitación, son conocidos en la materia. En diversas modalidades, el antígeno y/o el anticuerpo puede marcarse por cualquier marca o método adecuado conocido en la materia. Por ejemplo, los inmunoensayos enzimáticos pueden utilizar soportes sólidos o
15 inmunoprecipitación. Los inmunoensayos que amplifican la señal del complejo inmune antígeno-anticuerpo puede utilizarse también con los métodos descritos en este documento.

 En ciertos aspectos la invención proporciona métodos
20 para hacer un ensayo con una muestra para determinar la presencia o ausencia de un TiLV que comprende la SEQ ID NO: 12, y sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, los métodos para hacer un ensayo con la muestra incluyen, pero no se
25 limitan a, métodos que pueden detectar la presencia de los

ácidos nucleicos, los métodos que pueden detectar la presencia de antígenos, métodos que pueden detectar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de un polipéptido de la SEQ ID NO: 12, o un polipéptido de la SEQ ID NO: 12, sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento.

En ciertos aspectos la invención proporciona métodos para hacer un ensayo con una muestra para determinar la presencia o ausencia de un TiLV que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, y sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, los métodos para hacer un ensayo con la muestra incluyen, pero no se limitan a, métodos que pueden detectar la presencia de los ácidos nucleicos, los métodos que pueden detectar la presencia de antígenos, métodos que pueden detectar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de polipéptidos codificados por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o cualquiera de los polipéptidos codificados por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes, como se describe en el presente documento.

Kits

También se proporcionan kits para practicar uno o más de los métodos anteriormente descritos.

Sus kits y reactivos de la materia pueden variar

mucho. Los reactivos de interés incluyen reactivos diseñados específicamente para uso en la determinación de si un animal tiene TiLV.

Un tipo de reactivo que se adapta específicamente para la detección del TiLV es al menos un cebador de oligonucleótidos específicos de las SEQ ID NOs: 1-11 para amplificar ácidos nucleicos obtenidos de una muestra biológica y, opcionalmente, al menos un cebador adecuado para permitir la secuenciación del ácido nucleico amplificado y la determinación de la presencia de la mutación.

Ejemplos de cebadores que pueden ser incluidos como reactivos son:

ME1 (SEQ ID NO: 23) y cebadores del clon 7450/150R (SEQ ID NO: 16);

Anidado ext-1 (SEQ ID NO: 24) y anidado ext-2 (SEQ ID NO: 25);

NM-CLU7-SF1 (SEQ ID NO: 28) y NM-CLU7-SRI (SEQ ID NO: 29);

TiLV-CLU5-cF1 (SEQ ID NO: 30) y TiLV-CLU5-cR1 (SEQ ID NO: 31); y

CLU5-ARNm-qF1 (SEQ ID NO: 34) y CLU5-ARNm-qR1 (SEQ ID NO: 35).

con sonda opcional, sonda de CLU5-ARNm (SEQ ID NO: 36).

Otro tipo de reactivo es una o más sondas de ácido nucleico que comprende o complementario de las SEQ ID NOs: 1-11. En una modalidad, una o más sondas están en una formación de matriz. Una variedad de diferentes formatos de matriz es conocida en la materia con una gran variedad de diferentes estructuras de sonda, composiciones de substrato y las tecnologías de fijación. En algunas modalidades, las matrices incluyen al menos dos sondas de ácido nucleico, en una modalidad más preferida, al menos 5 sondas de ácido nucleico, en una modalidad más preferida, al menos 10 sondas de ácido nucleico, en una modalidad más preferido, al menos 15 sondas de ácido nucleico, en una modalidad más preferida, al menos 25 de sondas de ácido nucleico, y en una modalidad más preferida, al menos 50 sondas de ácido nucleico, dichas sondas de ácido nucleico que comprende o complementa las SEQ ID NOs: 1-11.

Un tipo adicional del reactivo es uno o más anticuerpos como se describe en el presente documento que específicamente se une a los aminoácidos del polipéptido de un polipéptido aislado de la SEQ ID NO: 12, sus fragmentos y variantes, o aminoácidos del polipéptido de cualquier polipéptido aislado codificado por la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes.

El kit de la invención puede incluir los cebadores,

sondas, matrices y anticuerpos descritos anteriormente, así como reactivos adicionales empleados en los diversos métodos, tales como: reactivos de marcado; enzimas como la transcriptasa inversa, polimerasas de ADN y ARN, y
5 similares; diferentes tampones, como hibridación y tampones de lavado; generación de señal y reactivos de detección; y reactivos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra. Además, el kit puede incluir instrucciones para la práctica de los métodos de la presente invención.

10 La invención también cubre los sistemas para practicar uno o más de los métodos anteriormente descritos. Los sistemas del tema pueden variar mucho pero suelen incluir al menos un elemento para detectar TiLV, *es decir*, uno o más reactivos descritos anteriormente para la
15 detección de TiLV, incluyendo cebadores, sondas, matrices, anticuerpos y reactivos adicionales para la práctica de los métodos de la invención.

Composiciones inmunogénicas, métodos de fabricación y métodos para utilizarlos

20 Como se utiliza en el presente documento, el término composición inmunogénica se refiere a una composición capaz de inducir una respuesta inmunogénica en un animal o una célula. Como se utiliza en el presente documento, la referencia a una composición inmunogénica puede incluir una
25 vacuna.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas capaces de inducir una respuesta inmune contra TiLV incluyendo TiLV de la invención que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus fragmentos o variantes, o que comprende una secuencia de ADNc complementaria a la hebra sentido o anti-sentido de cualquiera de las SEQ ID NOs: -11 o sus fragmentos o variantes, o que comprende un polipéptido codificado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia de ADNc complementaria a la hebra sentido o anti-sentido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o que comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 12 o sus fragmentos o variantes, o que comprende un TiLV muerto o atenuado.

En ciertos aspectos, la invención se relaciona a una composición inmunogénica que comprende cualquier ácido nucleico o polipéptido del TiLV descrito en el presente documento, incluyendo variantes y fragmentos.

En una modalidad, las composiciones inmunogénicas son capaces de atenuar los síntomas de una infección por TiLV y/o de reducir la duración de una enfermedad asociada al TiLV. En otra modalidad, las composiciones inmunogénicas son capaces de inducir inmunidad protectora contra la enfermedad asociada al TiLV. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser eficaces contra

los virus TiLV divulgados en el presente documento, y también pueden hacer reacción cruzada con, y eficaz contra, múltiples diferentes clados y cepas de TiLV, y contra otros ortomixovirus.

5 En otra modalidad, la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un animal, el método que comprende administrar un ácido nucleico de TiLV, un polipéptido de TiLV o una composición inmunogénica de TiLV al animal. Los métodos para administrar polipéptidos a los
10 animales y los métodos para generar respuestas inmunes en animales mediante la administración de péptidos inmunogénicos en cantidades inmunogénicamente eficaces se conocen en la materia.

 Los tipos de composición inmunogénica incluidos por
15 la invención incluyen, pero no se limitan a, composiciones inmunogénicas virales vivas atenuadas, composiciones inmunogénicas virales (asesinados) inactivadas y composiciones inmunogénicas de subunidad.

 Los virus de TiLV de la invención pueden atenuarse
20 por la eliminación o interrupción de las secuencias virales cuyos productos provocan o contribuyen a la enfermedad y los síntomas asociados con la infección por TiLV, y dejando intactas aquellas secuencias requeridas para la replicación viral. De esta manera se puede producir un TiLV atenuado
25 que replica en animales, y que induce una respuesta inmune

en animales, pero que no induce la enfermedad nociva y los síntomas generalmente asociados con la infección por TiLV. Un experto en la materia puede determinar que las secuencias de TiLV pueden o deben eliminarse o
5 interrumpirse, y que las secuencias deben dejarse intactas, con el fin de generar un TiLV atenuado adecuado para uso como una composición inmunogénica.

El nuevo TiLV de la invención pueden también ser inactivados, tal como por tratamiento químico, para "matar"
10 los virus de manera que ya no sean capaces de replicarse o provocar una enfermedad en los animales, pero todavía inducen una respuesta inmune en un animal. Hay muchos métodos de inactivación viral adecuados conocidos en la materia y un experto en la materia puede fácilmente
15 seleccionar un método adecuado y producir un TiLV "muerto" inactivado adecuado para uso como una composición inmunogénica.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender composiciones inmunogénicas de subunidad.
20 Las composiciones inmunogénicas de subunidad incluyen composiciones inmunogénicas de ácido nucleico como composiciones inmunogénicas de ADN, que contienen ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas o subunidades virales, o porciones de esas proteínas o subunidades. Al
25 usar tales composiciones inmunogénicas, el ácido nucleico

es administrado al animal, y los péptidos o proteínas inmunogénicas codificadas por el ácido nucleico se expresan en el animal, de manera que se genera una respuesta inmune contra las proteínas o péptidos en el animal. Las composiciones inmunogénicas de subunidad también pueden ser composiciones inmunogénicas proteínicas, que contienen sus proteínas virales o subunidades, o porciones de aquellas proteínas o subunidades.

Para realizar las composiciones inmunogénicas de ácido nucleico y ADN de la invención, las secuencias de TiLV divulgadas en el presente documento pueden incorporarse en un vector plásmido o de expresión que contiene el ácido nucleico que codifica la proteína o péptido viral. Puede utilizarse cualquier plásmido o vector de expresión capaz de dirigir la expresión de la proteína o péptido en el animal. Dichos plásmidos o vectores de expresión deben incluir un promotor adecuado para dirigir la transcripción del ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico que codifica la proteína o péptido de TiLV también puede incorporarse en un virus recombinante adecuado para la administración al animal. Ejemplos de virus adecuados incluyen, pero no se limitan a, virus, vacuna, retrovirus, adenovirus y virus asociado a adeno. Un experto en la materia puede fácilmente seleccionar un plásmido, vector de expresión o virus recombinante

adecuados para el suministro de las secuencias de ácidos nucleicos de TiLV de la invención.

Para producir las composiciones inmunogénicas proteínicas de la invención, las secuencias de ácido nucleico de TiLV de la invención se suministran a las células cultivadas, por ejemplo, transfectando las células cultivadas con plásmidos o vectores de expresión que contienen secuencias de ácido nucleico de TiLV, o infectando células cultivadas con virus recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico de TiLV. Los péptidos o proteínas de TiLV pueden ser expresados en las células cultivadas y purificados. Las proteínas purificadas después pueden incorporarse en las composiciones adecuadas para la administración a los animales. Los métodos y técnicas para la expresión y purificación de proteínas recombinantes son bien conocidas en la materia, y pueden utilizarse cualesquiera tales métodos adecuados.

Las composiciones inmunogénicas de subunidad de la presente invención pueden codificar o contener cualquiera de las proteínas o péptidos de TiLV descritos en el presente documento, o cualquiera de sus porciones, fragmentos, derivados o mutantes, que son inmunogénicos en un animal. Un experto en la materia puede probar fácilmente la inmunogenicidad de las proteínas y péptidos de TiLV descritos en el presente documento, y pueden seleccionar

péptidos o proteínas para usar en las composiciones inmunogénicas de subunidad.

La producción de las composiciones inmunogénicas y virus de TiLV también se puede realizar mediante un sistema de expresión recombinante que expresa TiLV, una proteína de
5 TiLV, un fragmento de una proteína de TiLV o una variante de una proteína viral de TiLV. El sistema de expresión puede comprender cualquier plásmido o un constructo de expresión lineal adecuado conocido en la materia.

10 El virus de TiLV y las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento se pueden producir en las células. La producción de los virus de TiLV y composiciones inmunogénicas descritos en el presente también puede realizarse en cualquier medio útil y célula o
15 tejidos permisivos, que pueden derivarse líneas celulares de peces u otros animales. Como se utiliza en este documento, una célula o un tejido puede incluir, pero no se limita a células individuales, tejidos, órganos, células de insectos, células de peces, células de mamíferos, células
20 de hibridomas, células primarias, líneas celulares continuas y/o células genéticamente modificadas, como células recombinantes que expresan un virus. Por ejemplo, la producción del virus de TiLV y composiciones inmunogénicas puede ser en cualquier tipo de célula,
25 incluyendo pero no limitado a las células de la tilapia.

Las líneas celulares adecuadas para producir el virus de TiLV y composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento. El sistema de cultivo celular para producir el virus de TiLV y composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento puede ser un cultivo de monocapa adherente tradicional. Alternativamente, los sistemas de cultivo celular de microportador y suspensión también pueden utilizarse.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden comprender una vacuna de TiLV muerta o inactivada. La composición inmunogénica inactivada se puede realizar por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que TiLV se propaga a altos títulos, la masa antigénica de TiLV podría obtenerse por métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la masa antigénica viral de TiLV puede obtenerse por dilución, concentración o extracción. Todos estos métodos han sido empleados para obtener una apropiada masa antigénica de TiLV para producir composiciones inmunogénicas. TiLV puede ser inactivado por tratamiento con formalina (*por ej.* 0.1-10%), betapropriolactona (BPL) (*por ejemplo*, 0.01-10%), o con etilenimina binaria (BEI) (*p. ej.* 1-10 mM), o usando otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Además de la producción de TiLV muerta, diversos medios de atenuación también son posibles y son bien

conocidos y descritos en la materia. La atenuación que lleva a composiciones inmunogénicas vivas modificadas también pueden usarse en conjunto con las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Los métodos de atenuación adecuados para uso con los virus descritos en el presente documento incluyen paso continuo en el cultivo celular, paso continuo en animales, diversos métodos para la generación de modificaciones genéticas y mutagénesis ultravioleta o química.

La atenuación de TiLV puede lograrse a través de adaptación en frío de una cepa de TiLV. Las cepas del virus de TiLV adaptadas en frío se pueden producir por métodos que incluye pasar un virus de TiLV tipo silvestre, seguido por la detección de TiLV que crece a una temperatura menor. El TiLV adaptado en frío se puede producir, por ejemplo, pasando secuencialmente un TiLV de tipo silvestre en las células embrionadas o huevos de gallina a temperaturas progresivamente más bajas, seleccionando así ciertos miembros de mezcla de TiLV que replican de manera estable en la temperatura reducida. Una cepa de TiLV adaptada en frío puede presentar un fenotipo sensible a la temperatura. Un TiLV adaptado en frío sensible a la temperatura se replica a temperaturas menores, pero ya no se replica en ciertas temperaturas mayores de crecimiento en las que el TiLV de tipo silvestre se replicarán. Una temperatura en la

cual un TiLV sensible a la temperatura crecerá es denominado en el presente documento como una temperatura "permisiva" para ese TiLV sensible a la temperatura, y una temperatura mayor en la que el TiLV sensible a la temperatura no crecerá, pero en la que un correspondiente TiLV de tipo silvestre crecerá, se denomina en el presente documento como una temperatura "no permisiva" para ese TiLV sensible a la temperatura. Un TiLV adaptado en frío también puede ser producido por medios recombinantes. En este enfoque, una o más mutaciones específicas, asociadas con una adaptación en frío, atenuación, sensibilidad a la temperatura o fenotipos de interferencia dominante identificados, pueden identificarse y se introducen en una cepa de TiLV tipo silvestre usando un enfoque de genética inversa. Las implicaciones de la genética inversa pueden realizarse usando complejos de polimerasa de ARN aislados de células infectadas por TiLV para transcribir segmentos de genoma de TiLV artificiales que contienen la(s) mutación(es), incorporando el(los) segmento(s) de ARN sintetizados en las partículas de virus usando un virus ayudante, y después seleccionar los virus que contienen los cambios deseados.

La atenuación de un TiLV puede lograrse pasando en serie una cepa de TiLV de tipo silvestre en el cultivo celular. La cepa de TiLV puede pasarse en una variedad de

sistemas celulares hasta que su capacidad para producir la enfermedad se pierde mientras que su carácter inmunogénico es completamente retenido. Una vez inoculado en el anfitrión, el TiLV puede ser capaz de la multiplicación hasta cierto punto. Por ejemplo, se pueden preparar las composiciones de TiLV atenuadas de la línea celular que ha sido atenuada por el paso en serie incluyendo el paso en serie en temperaturas sub-óptimas a un estado donde ya no es capaz de provocar una enfermedad, pero todavía es capaz de suscitar una respuesta inmune protectora.

Las cepas de TiLV atenuadas adecuadas también se pueden obtener por el paso en serie para obtener una cepa sobre atenuada. La "sobre atenuación" significa que el número de pasajes para la atenuación ha sido substancialmente mayor que lo que es normalmente necesario para la eliminación de la patogenicidad. El TiLV atenuado retiene su antigenicidad después de estos numerosos pasajes de manera que su capacidad inmunogénica no se deteriora. Dichas cepas prácticamente no producen síntomas o efectos secundarios cuando se administran, y por lo tanto son vacunas seguras y eficaces.

Los métodos de purificación del virus inactivo son conocidos en la materia y pueden incluir uno o más de, por ejemplo, centrifugación de gradiente, ultracentrifugación, ultracentrifugación de flujo continuo y cromatografía, tal

como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de afinidad líquida. Los métodos de purificación adicionales incluyen ultrafiltración y dialfiltración.

5 Otros ejemplos de métodos de purificación adecuados para uso en la invención incluyen precipitación de polietilenglicol o sulfato de amonio (véase Trepanier *et al.* (1981) *Journal of Virological Methods* 3:201-711; Hagen *et al.* (1996) *Biotechnology Progress* 12:406-412; and
10 Carlsson *et al.* (1994) *Journal of Virological Methods* 47:27-36) así como ultrafiltración y microfiltración (véase Pay *et al.* (1985) *Developments in Biological Standardization* 60:171-174; Tsurumi *et al.* (1990) *Polymer Journal* 22:1085-1100; and Makino *et al.* (1994) *Archives of*
15 *Virology* 139:87-96).

 Los virus pueden ser purificados mediante cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico. La purificación cromática permite la producción de grandes volúmenes de virus que contiene la suspensión. El
20 producto viral de interés puede interactuar con el medio cromático por un mecanismo simple de adsorción/desorción, y se pueden procesar grandes volúmenes de muestra en una sola carga. Los contaminantes que no tienen afinidad para lo adsorbente pasan a través de la columna. El material de
25 virus luego puede ser eluido en forma concentrada.

Las resinas de intercambio aniónico que se pueden utilizar incluyen pero no se limitan a DEAE y EMD TMAE. Las resinas de intercambio catiónico pueden comprender una superficie modificada por ácido sulfónico. El virus puede ser purificado usando una cromatografía de intercambio iónico que comprende una resina de intercambio aniónico fuerte (*por ejemplo*, EMD TMAE) para la primera etapa y EMD-SO₃ (resina de intercambio catiónico) para la segunda etapa. Una etapa de cromatografía de afinidad de unión a metal puede ser opcionalmente incluida para posterior purificación. (Véase, p. ej., WO 97/06243).

Una resina como Fractogel EMD también se puede utilizar. Esta resina a base de metacrilato sintético tiene cadenas de polímero lineales, largas unidas de manera covalente y permite una gran cantidad de ligandos estéricamente accesibles para el enlace de biomoléculas sin ningún impedimento estérico.

La cromatografía de afinidad líquida basada en columna es otro método de purificación que puede ser usado de la invención. Un ejemplo de una resina para su uso en el método de purificación es Sulfato de Celufina Matrex (MCS). El MCS consiste de una matriz de celulosa esférica rígida (aproximadamente 45-105. μm de diámetro) del límite de exclusión de 4.98162×10^{-6} g (3,000 Daltons) (su estructura de poro excluye macromoléculas), con una concentración baja

de funcionalidad de éster sulfato en la posición 6 de la celulosa. Como el ligando funcional (éster sulfato) está relativamente altamente disperso, presenta una densidad de carga catiónica insuficiente para permitir que las

5 proteínas más solubles se adsorban sobre la superficie del grano. Por lo tanto, el volumen de la proteína encontrada en los grupos normales de virus (sobrenadantes de cultivo celular, *por ej.* pirógenos y proteínas más contaminantes, así como los ácidos nucleicos y endotoxinas) se lavan de la

10 columna y se alcanza un grado de purificación del virus enlazado.

Los virus inactivados pueden purificarse además por centrifugación del gradiente, o centrifugación de gradiente de densidad. Para la operación de escala comercial una

15 centrifugación de gradiente de sacarosa de flujo continuo sería una opción. Este método es ampliamente utilizado para purificar las composiciones inmunogénicas antivirales y se conocen por un experto en la materia.

Los métodos de purificación adicionales que pueden

20 utilizarse para purificar el virus de la invención incluyen el uso de un agente degradante de ácido nucleico, una enzima degradante de ácido nucleico, tal como una nucleasa que tiene actividad DNasa y RNasa, o una endonucleasa, tal como de *Serratia marcescens*, absorbedores de membrana con

25 grupos funcionales aniónicos o etapas adicionales

cromatográficas con grupos funcionales aniónicos (ej. DEAE o TMAE). Una ultrafiltración/dialfiltración y etapa de filtración estéril final podrían añadirse también al método de purificación.

5 La preparación viral purificada de la invención está sustancialmente libre de proteínas contaminantes derivadas de las células o cultivos celulares y pueden comprender menos de 1000, 500, 250, 150, 100 o 50 pg de ácido nucleico celular/antígeno de virus .mu.g, y menos de alrededor de
10 1000, 500, 250, 150, 100 ó 50 pg de ácido nucleico celular/dosis. La preparación viral purificada puede comprende también menos de alrededor de 20 pg o menos de alrededor de 10 pg. Los métodos para medir los niveles de ácido nucleico celular de la célula anfitriona en una
15 muestra viral se conocen en la materia. Pueden utilizarse métodos estandarizados aprobados o recomendados por las autoridades reguladoras como la OMS o la FDA.

 Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden al menos un componente inmunogénico derivado de
20 TiLV, tal como los descritos en el presente documento. Las composiciones también pueden comprender uno o más aditivos incluyendo, pero no limitado a uno o más portadores, tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes, solubilizantes, liposomas o agentes inmunomoduladores
25 farmacéuticamente aceptables. Los agentes inmunomoduladores

adecuados incluyen, pero no están limitados a, adyuvantes, citocinas, citocinas que codifican polinucleótidos, y agentes que facilitan la absorción celular del componente inmunogénico derivado de TiLV.

5 Las composiciones inmunogénicas para uso de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, pueden formularse de manera convencional, usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el proceso de los compuestos
10 activos en preparaciones que pueden usarse para inducir una respuesta inmunogénica. Estas composiciones inmunogénicas pueden fabricarse en una forma que es conocida en sí por ejemplo, por medio de una mezcla convencional, disolución, granulación, fabricación de gragea, pulido, emulsión,
15 encapsulación, atrapamiento o procesos de liofilización. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína u otro ingrediente activo de la presente invención
20 es administrada por inyección vía intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína u otro ingrediente activo de la presente invención será en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógeno. La preparación de dicha proteína parenteralmente aceptable u
25 otras soluciones de ingrediente activo, que tienen respecto

a pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro de la materia. Un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, 5 inyección de Ringer lactato, solución de Hanks, tampón de solución salina fisiológico, u otro vehículo como se conoce en la materia se puede utilizar para formular la solución. La composición inmunogénica de la presente invención también puede contener estabilizadores, conservantes, 10 antioxidantes, tampones u otros aditivos conocidos para los expertos en la materia. Para la administración transmucosa, se utilizan los penetrantes apropiados según la barrera a permearse en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la materia.

15 Para la administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente mediante la combinación de los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia. Dichos portadores permiten que los compuestos de la invención sean formulados 20 como polvos, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas, soluciones, suspensiones, elíxires y similares, para la ingesta oral por un animal a tratar. Las preparaciones inmunogénicas para uso oral pueden obtenerse de excipientes sólidos, 25 opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando

la mezcla de gránulos, después de añadir los auxiliares adecuados, si lo desea, para obtener núcleos de tabletas o gragea. Los excipientes adecuados son, en particular, llenadores tales como azúcares incluyendo lactosa, 5 sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio o polivinilpirrolidona (PVP). Si lo desea, se pueden 10 agregar agentes de desintegración, tales como polivinil pirrolidona reticulado, agar, o ácido algínico, o una sal de los mismos tal como alginato de sodio. Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, puede utilizarse las soluciones de azúcar 15 concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de Carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y mezclas de disolventes o disolventes orgánicos adecuadas. Cuando se administra en forma líquida, puede 20 añadirse un portador líquido como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal como el aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soya o aceite de sésamo o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición inmunogénica puede contener además la solución salina fisiológica, 25 dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles como el

etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los recubrimientos de tabletas o grageas para identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

5 Las preparaciones inmunogénicas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por empuje de gelatina, así como blandas, cápsulas selladas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos
10 en mezcla con relleno, tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites
15 grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben ser en dosificaciones convenientes para dicha administración. Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar
20 forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Las cápsulas y cartuchos pueden formularse para contener una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Los compuestos
25 se pueden formular para administración parenteral por

inyección, por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de múltiples dosis, con un
5 conservante añadido. Las composiciones pueden tomar esas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

10 Las formulaciones inmunogénicas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar las suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección aceitosa
15 adecuadas. Los vehículos o disolventes lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener
20 sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la
25 preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

5 Un portador para los compuestos hidrofóbicos de la invención puede ser un sistema de disolvente conjunto que comprende alcohol bencílico, un surfactante no polar, un polímero orgánico miscible con agua y una fase acuosa. El sistema de disolvente conjunto puede ser el sistema de
10 disolvente conjunto de VPD. El VPD es una solución de 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del polisorbato 80 surfactante no polar y 65% p/v de polietilenglicol 300, formada hasta volumen en etanol absoluto. El sistema de disolvente conjunto de VPD (VPD:5W) consiste de VPD diluido
15 1:1 con dextrosa al 5% en la solución acuosa. Este sistema de co-disolvente disuelve bien los compuestos hidrofóbicos, y por sí mismo produce baja toxicidad sobre la administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema de co-disolvente pueden variarse
20 considerablemente sin destruir sus características de toxicidad y solubilidad. Además, la identidad de los componentes de disolvente conjunto puede ser variada: por ejemplo, otros surfactantes no polares de baja toxicidad pueden ser utilizados en lugar de polisorbato 80; el tamaño
25 de la fracción del polietilenglicol puede variarse; otros

polímeros biocompatibles pueden reemplazar el polietilenglicol, por ejemplo, polivinil pirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituirse por dextrosa.

5 Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de suministro para compuestos inmunogénicos hidrofóbicos. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de portadores o vehículos de suministro para fármacos hidrofóbicos. Los liposomas incluyen agentes anfipáticos
10 como los lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas laminares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitinas,
15 fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de tales formulaciones liposomales está dentro del nivel de la materia.

 Adicionalmente, los compuestos pueden ser suministrados utilizando un sistema de liberación
20 sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen al agente terapéutico. Los diferentes tipos de materiales de liberación sostenida se han establecido y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida pueden,
25 dependiendo de su naturaleza química, liberar los

compuestos por unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de la proteína u otro ingrediente activo.

Las composiciones inmunogénicas también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase de gel. Los ejemplos de dichos portadores o excipientes incluyen, pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles. Muchos de los ingredientes activos de la invención pueden proporcionarse como sales con contraiones inmunogénicamente compatibles. Dichas sales de adición base inmunogénicamente compatibles son aquellas sales que retienen la eficacia biológica y propiedades de los ácidos libres y que se obtienen por la reacción con bases orgánicas o inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de magnesio, amoníaco, triálquilamina, dialquilamina, monoalquilamina, aminoácidos dibásicos, acetato de sodio, benzoato de potasio, trietanolamina y similares.

La composición inmunogénica de la invención puede ser en forma de un complejo de la(s) proteína(s) u otro ingrediente activo de la presente invención junto con

antígenos de proteína o péptido.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en el presente documento también pueden ser composiciones inmunogénicas multivalentes que comprenden además
5 secuencias de polipéptidos o ácido nucleico que codifican polipéptidos adicionales de otros virus.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en el presente documento también pueden ser composiciones inmunogénicas multivalentes que comprenden además
10 secuencias de fragmentos de polipéptidos o ácido nucleico que codifican fragmentos de polipéptidos adicionales de otros virus.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en este documento también pueden ser composiciones
15 inmunogénicas multivalentes que comprenden además virus adicionales (*por ejemplo*, virus que son atenuados, muertos o de lo contrario desactivados) o secuencias de ácido nucleico que codifican virus adicionales (*p. ej.* virus que son atenuados, muertos o de lo contrario desactivados).

20 Las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en el presente documento también pueden comprender proteínas de fusión o ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de TiLV, o un fragmento o una variante del mismo y por lo menos un
25 polipéptido, o un fragmento de polipéptido o variante de

otro virus.

Otros polipéptidos virales y secuencia de ácidos nucleicos adecuados para uso en las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documentos se discuten en Tucker *et al.* (2000) "Assessment of DNA vaccine potential for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, through the introduction of reporter genes by particle bombardment and histopathology" *Vaccine* 19(7-8):801; Corbeil *et al.* (1999) "Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV, G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines" *Dis. Aquat. Organ* 39(1):29; Nusbaum *et al.* (2002) "Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpes virus (IHV-1)" *Vet Immunol. Immunopathol.* 84:151; Clark *et al.* (1992) "Developmental expression of surface antigen genes in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(14):6363-6367; y Sato *et al.* (2000) "Expression of YAV proteins and vaccination against viral ascites among cultured juvenile yellowtail" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1494. Numerosas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de los antígenos del patógeno de peces son conocidos y accesibles a través de las bases de datos de *Genbank* y otras fuentes.

Otros aditivos que son útiles en una composición inmunogénica y formulaciones de vacuna son conocidos y serán evidentes para los expertos en la materia.

En un aspecto, la vacunación de animales puede realizarse inyectando directamente los polipéptidos de TiLV, sus fragmentos o variantes en el animal para generar una respuesta inmunogénica. En algunas modalidades, el polipéptido de TiLV se puede inyectar por ellos mismos, o unas composiciones de TiLV inmunogénica que comprende otros componentes, incluyendo por ejemplo, excipientes, aditivos y adyuvantes.

La vacunación puede realizarse también por vacunación directa con un ADN que codifican un polipéptido de TiLV. Al usar tales vacunas, el ácido nucleico es administrado al animal, y los polipéptidos inmunogénicos codificados por el ácido nucleico se expresan en el animal, de manera que se genera una respuesta inmune contra las proteínas o péptidos en el animal. Las vacunas de subunidad también pueden ser vacunas proteínicas, que contienen proteínas virales o subunidades, o porciones de aquellas proteínas o subunidades. Puede utilizarse cualquier plásmido o vector de expresión capaz de dirigir la expresión de un polipéptido. Los plásmidos o vectores de expresión pueden incluir un promotor para dirigir la transcripción del ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico que codifican

los polipéptidos de TiLV también pueden incorporarse en un virus recombinante adecuado para la administración al animal. Ejemplos de virus adecuados incluyen, pero no se limitan a, virus, vacuna, retrovirus, adenovirus y virus asociado a adeno. Un experto en la materia será capaz de seleccionar un plásmido, vector de expresión o virus recombinante adecuados para el suministro de las secuencias de ácidos nucleicos de TiLV de la invención. La vacunación directa con proteínas que codifican el ADN ha sido exitosa para muchas proteínas diferentes. (Como se examinó en por ejemplo Donnelly *et al.* (1993) *The Immunologist* 2: 20-26, 1993)).

La vacunación con los ácidos nucleicos y polipéptidos de TiLV en el presente documento también se puede realizar usando los portadores recombinantes vivos capaces de expresar los polipéptidos descritos en el presente documento. Los portadores recombinantes vivos son microorganismos o virus en los que la información genética adicional, *por ejemplo*. una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de TiLV, o un fragmento del mismo ha sido clonado. Los peces infectados con tales portadores recombinantes vivos producirán una respuesta inmunológica no sólo contra los inmunógenos del portador, sino también contra el polipéptido de TiLV o fragmento de polipéptido de TiLV.

Alternativamente, se puede realizar la vacunación pasiva elevando los anticuerpos contra TiLV en una primera especie animal (p. ej. un conejo), de líneas celulares productoras de anticuerpos, o de técnicas *in vitro* antes de
5 administrar tales anticuerpos (en forma purificada o no purificada) a una segunda especie animal. Este tipo de vacunación pasiva puede ser utilizado cuando el segundo animal ya está infectado con un TiLV. En algunos casos, la vacunación pasiva puede ser útil cuando la infección en el
10 segundo animal no puede, o no ha tenido tiempo suficiente para montar una respuesta inmune a la infección.

Muchos métodos para la vacunación de los peces son conocidos en la materia. Por ejemplo, la vacunación con los ácidos nucleicos y polipéptidos de TiLV descritos en el
15 presente documento puede realizarse en los peces por inyección, inmersión, hundimiento o a través de la administración oral. Se puede optimizar el protocolo de administración de acuerdo con la práctica de vacunación estándar

20 Para la vacunación oral de la tilapia, los ácidos nucleicos, polipéptidos o composiciones inmunogénicas de TiLV descritos en el presente documento pueden mezclarse con alimentación, recubierto en el alimento o administrarse en forma encapsulada. En algunas modalidades, la vacunación
25 puede realizarse por incubación de alimentación en vivo en

una suspensión de vacuna de TiLV antes de alimentar un animal (p. ej. una tilapia) de manera que la ingestión de la alimentación en vivo provocará que la vacuna contra TiLV se acumule en el tracto digestivo del animal que se somete a la vacunación. Un experto en la materia apreciará que estos métodos de administración pueden exponer un antígeno a una potencial degradación o desnaturalización y por lo tanto el técnico asegurará que el método de vacunación sea apropiado para un antígeno elegido. En el caso de la vacunación oral, la vacuna también puede ser mezclada con uno o más portadores. El portador adecuado para uso en la vacunación oral incluye sustancias metabolizadas y no metabolizadas.

La vacunación de la tilapia también puede realizarse mediante protocolos de inmersión. Los epitelios de piel y branquias en los peces tienen superficies mucosas que contribuyen al reconocimiento de patógenos mediante la adsorción de antígenos. La adsorción a su vez resulta en la activación de anticuerpos productores de las células como parte de la respuesta inmune. Así en una modalidad, la vacunación de peces con los polipéptidos descritos en el presente documento puede realizarse sumergiendo los peces en el agua que contiene una composición de vacuna contra TiLV. Por lo menos dos tipos de vacunación de inmersión pueden utilizarse en conjunto con los polipéptidos

descritos en el presente documento. En la vacunación por hundimiento, los peces se sumergen en agua que comprende por un periodo corto de tiempo (*por ejemplo*, alrededor de 30 segundos) en una solución de vacuna concentrada (*por ejemplo*, 1 parte de vacuna, 9 partes de agua). En vacunación por baño, la inmersión se produce por periodos más largos de tiempo (*por ejemplo*, varias horas) en agua que contiene concentraciones más bajas de la vacuna. Un experto en la materia fácilmente será capaz de determinar la dilución de la vacuna contra TiLV y la duración de inmersión suficiente para inducir una reacción inmune en un protocolo de inmersión.

Otro método para vacunar la tilapia con los ácidos nucleicos y polipéptidos de TiLV descritos en el presente documento es por vacunación por inyección. En la vacunación por inyección, se inyecta una vacuna en la cavidad abdominal del pez. Aunque uno experto en la materia puede determinar fácilmente el punto de inyección adecuado, un lugar común para la inserción de agujas en la tilapia es la línea media del abdomen, la longitud de la aleta pélvica en frente a la base de las aletas pélvicas. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, polipéptidos o composiciones inmunogénicas de TiLV pueden suministrarse en la cavidad corporal del pez en una emulsión de aceite, u otros adyuvantes o aditivos que mejoran y/o prolongan las

respuestas inmunes. Además de la inyección intraperitoneal, la vacunación por inyección también puede realizarse por inyección intramuscular. Un experto en la materia apreciará que la manipulación inadecuada y la inserción de la aguja
5 puede provocar mortalidad de peces y por lo tanto se puede utilizar anestesia ligera durante el proceso de vacunación para reducir el estrés y daño mecánico a los animales. El experto también apreciará que las agujas que tienen la longitud adecuada y el espesor pueden ser importantes para
10 asegurar la correcta vacunación evitando complicaciones secundarias debido a la infección, inflamación o daño en el tejido.

Los ácidos nucleicos, polipéptidos o composiciones inmunogénicas de TiLV descritos en el presente documento
15 pueden también suministrarse en la forma de una presentación de aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, *por ejemplo*, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas
20 adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos pueden formularse para contener una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como
25 lactosa o almidón.

Los ácidos nucleicos, polipéptidos o composiciones inmunogénicas de TiLV descritos en el presente documento pueden ser administrados en cualquier cantidad inmunológicamente efectiva suficiente para desencadenar una
5 respuesta inmune en un animal. En ciertos casos, esta cantidad puede ser entre alrededor de 0.01 y alrededor de 1000 microgramos de ácido nucleico, polipéptido o composición inmunogénica de TiLV por animal.

Una "cantidad inmunológicamente efectiva" de las
10 composiciones de la invención puede administrarse a un animal o un humano. Como se utiliza en este documento, el término "cantidad inmunológicamente efectiva" se refiere a una cantidad capaz de inducir o mejorar la inducción de la respuesta inmune deseada en un animal o un humano. La
15 respuesta deseada puede incluir, *entre otras cosas*, inducir un anticuerpo o respuesta inmune mediada por células o ambos. La respuesta deseada puede ser también la inducción de una respuesta inmune suficiente para atenuar los síntomas de una enfermedad asociada a TiLV y/o proporcionar
20 inmunidad protectora en un animal o un humano contra el posterior desafío con un TiLV. Una cantidad inmunológicamente efectiva puede ser una cantidad que induce "protección" real contra enfermedades asociadas a TiLV, lo que significa la prevención de cualquiera de los
25 síntomas o condiciones que resultan de la enfermedad

asociada a TiLV en animales o humanos. Una cantidad inmunológicamente efectiva también puede ser una cantidad suficiente para retrasar la aparición de los síntomas y condiciones asociados con la infección, reducir el grado o
5 tasa de infección, reducir la severidad de cualquier enfermedad o síntoma que resulta de la infección y reducir la carga viral de un animal infectado o de un humano.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente qué es una "cantidad inmunológicamente efectiva" de las
10 composiciones de la invención sin tener que realizar alguna experimentación indebida. Una cantidad efectiva puede determinarse por medios convencionales, empezando con una dosis baja de y luego aumentando la dosificación mientras que se supervisa los efectos inmunológicos. Numerosos
15 factores pueden tomarse en consideración cuando se determina una cantidad óptima para administrar, incluyendo el tamaño, edad y estado general del animal, la presencia de otros fármacos en el animal, la virulencia del TiLV particular contra el cual el animal está siendo vacunado y
20 similares. La dosificación real se puede elegir después de la consideración de los resultados de varios estudios en animales.

La cantidad inmunológicamente efectiva de la composición inmunogénica puede administrarse en una sola
25 dosis, en dosis divididas, o mediante un régimen de

"refuerzo inductor". Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, incluyendo pero no limitado a vías parenteral, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, oral o intraocular, o por una combinación de vías. Las composiciones también pueden ser administradas con un dispositivo de "pistola" que dispara partículas, tales como partículas de oro, sobre las cuales las composiciones de la presente invención han sido recubiertas, en la piel de un animal. El experto será capaz de formular la composición inmunogénica de acuerdo con la vía elegida.

Los tamaños de las dosis de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden estar en el rango de alrededor de 0.1 a 2.0 ml dependiendo de la vía de administración, pero los tamaños de dosis no se limitan a este rango. Para las composiciones de TiLV inactivadas pueden contener niveles adecuados de TCID₅₀ del virus antes de la inactivación. El contenido de antígeno en la preparación de TiLV puede tener, pero no se limita a un título de entre 10 a 10,000 unidades/ml como la cantidad que se administra por dosis. Un experto en la materia fácilmente será capaz de determinar un contenido de antígeno adecuado para las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Para las composiciones inmunogénicas que contienen TiLV vivo modificado o TiLV atenuado, una dosis terapéuticamente efectiva puede determinarse por un experto en la materia. Para las composiciones inmunogénicas que contienen antígenos de subunidad de TiLV, una dosis terapéuticamente efectiva puede determinarse por un experto en la materia. Mientras que las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto.

Células que comprenden TiLV y sus usos

TiLV puede utilizarse para infectar células. Las células pueden ser cultivadas en cualquier medio útil y cualquier célula o tejidos permisivos, que pueden ser, o pueden derivarse de células de peces, incluyendo pero no limitado a las células de la tilapia, células CHSE-214 *Oncorhynchus tshawytscha*, células BF-2 *Lepomis macrochirus*; células BB *Ictalurus nebulosus*, células EPC *Cyprinus carpio*, células KF-1 *Cyprinus carpio*, células RTG-2 *Salmo gairdneri*, células FHM *Pimephales promelas* y células E-11 *Ophicephalus striatus*. Como se utiliza en este documento, una célula o un tejido puede incluir, pero no se limita a células individuales, tejidos, órganos, células de insectos, células de roedores, células aviares, células de mamíferos, células de hibridomas, células primarias, líneas

celulares continuas y/o células genéticamente modificadas. Las líneas celulares adecuadas para la propagación, crecimiento, o cultivo de la secuencia de ácido nucleico de TiLV o para expresar un polipéptido producido por la

5 secuencia de ácido nucleico de TiLV que incluye, células de la tilapia, células CHSE-214 *Oncorhynchus tshawytscha*, células BF-2 *Lepomis macrochirus*; células BB *Ictalurus nebulosus*, células EPC *Cyprinus carpio*, células KF-1 *Cyprinus carpio*, células RTG-2 *Salmo gairdneri*, células FHM

10 *Pimephales promelas*, y células E-11 *Ophicephalus striatus* así como células no de pez pero no se limitan a células de riñón de perro, células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células CHO, células COS, células murinas, células humana, células HeLa, células 293, células VERO, células

15 MDBK, células MDCK, células MDOK, células CRFK, células RAF, células TCMK, células LLC-PK, células PK15, células WI-38, células MRC-5, células T-FLY, células BHK, células SP2/0, NS0, PerC6 (células de retina humana), células de embrión de pollo o derivados, células de huevo embrionadas,

20 huevos de pollo embrionados o sus derivados.

Las formulaciones de medios de cultivo celular para cultivar adecuadamente las células infectadas con los virus TiLV descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, medio modificado de Eagle MEM, medio esencial

25 mínimo MEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco D-MEM,

medio D-MEM-F12, medio E de William, medio RPMI, medio de cultivo celular HyClone, (HyClone, Logan, Utah); y medio epitelial basal libre de suero (CellnTech) y sus análogos y derivados. Esto también puede ser especialidad de medio de cultivo de célula y crecimiento de virus como VP-SFM, OptiPro.TM. Medios de SFM, AIM V.R, HyQ SFM4 MegaVir, EX-CELL Vero SFM, EPISERF, ProVero, cualquiera de 293 o medios CHO y sus análogos y derivados. El medio de cultivo descrito en el presente documento se puede suplementar por cualquier aditivo conocido de la técnica anterior que es aplicable para el cultivo de células y virus como por ejemplo, sueros animales y sus fracciones o análogos, aminoácidos, factores de crecimiento, hormonas, tampones, elementos traza, tripsina, piruvato de sodio, vitaminas, L-glutamina y tampones biológicos. Un medio es Optipro SFM suplementado con L-glutamina y tripsina. En ciertas modalidades, el medio de cultivo celular puede ser suplementado con 0.1 a 10 unidades de tripsina. Alternativamente, los equivalentes derivados de las plantas de tripsina (p. ej. Accutase) que van desde 2 a 100 unidades pueden también ser utilizados en cultivo celular. El medio de cultivo celular se puede utilizar en la ausencia o presencia de componentes de origen animal. Un ejemplo de la suplementación con un componente derivado de animales es el suero irradiado con gamma que va de 0.5-10%

de la concentración final.

Un vector de expresión puede ser introducido en las células para producir proteínas (por ejemplo, SEQ ID NO: 12 y sus fragmentos y variantes descritos en el presente documento) codificadas por secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes descritos en el presente documento). Las células pueden contener un vector de expresión por medio de la introducción del vector de expresión en una célula anfitriona apropiada mediante métodos conocidos en la materia.

Un vector de expresión puede ser introducido en las células con el fin de producir proteínas codificadas por secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o una secuencia complementarias a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes descritos en el presente documento). Las células pueden contener un vector de expresión por medio de la introducción del vector de expresión en una célula anfitriona apropiada mediante métodos conocidos en la materia.

Un vector de expresión eucariótico puede ser utilizado para transfectar las células con el fin de producir proteínas (por ejemplo, SEQ ID NO: 12 o proteínas codificadas por las SEQ ID NOs: 1-11) y sus fragmentos y

variantes descritos en el presente documento codificados por secuencias de nucleótidos del vector.

Un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, un ADNc de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o un ADNc complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos o variantes descritos en el presente documento) puede ser introducido en una célula a través de una variedad de técnicas conocidas en la materia.

Un vector de expresión eucariótico puede ser utilizado para transfectar las células con el fin de producir proteínas codificadas por las secuencias de nucleótidos (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, un ADNc de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o un ADNc complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos o variantes descritos en el presente documento). Las células mamíferas pueden contener un vector de expresión por medio de la introducción del vector de expresión en una célula anfitriona apropiada mediante métodos conocidos en la materia.

Un ácido nucleico exógeno puede ser introducido en una célula por medio de una variedad de técnicas conocidas en la materia, como lipofección, microinyección, precipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrina o electroporación. Otros métodos utilizados para transfectar las células

también pueden incluir precipitación de fosfato de calcio, precipitación de fosfato de calcio modificado, precipitación de polibreno, fusión de liposomas de microinyección y suministro de gen mediado por receptor.

5 Los vectores de expresión pueden contener secuencias de codificación o sus porciones, que codifican las proteínas para la producción y expresión. Los vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y polipéptidos producidos, así como los elementos de control
10 de conversión y transcripción adecuados, se pueden generar usando métodos bien conocidos y practicados por los expertos en la materia. Estos métodos incluyen técnicas sintéticas, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, y recombinación genética *in vivo* que se describen en Sambrook
15 *et al.*, Ausubel *et al.*

Las células que se van a infectar con TiLV o sus ácidos nucleicos (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, un ADNc de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o un ADNc complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-
20 11, sus fragmentos o variantes) pueden ser células primarias y secundarias, que pueden obtenerse de diversos tejidos e incluye tipos de células que pueden ser mantenidos y propagados en el cultivo.

Las células mantenidas en cultivo pueden ser pasadas
25 por su transferencia de un cultivo previo a un cultivo con

medio fresco. En una modalidad, las células epiteliales inducidas son mantenidas de manera estable en cultivo celular durante al menos 3 pasajes, al menos 4 pasajes, al menos 5 pasajes, al menos 6 pasajes, al menos 7 pasajes, al menos 8 pasajes, al menos 9 pasajes, al menos 10 pasajes, al menos 11 pasajes, al menos 12 pasajes, al menos 13 pasajes, al menos 14 pasajes, al menos 15 pasajes, al menos 20 pasajes, al menos 25 pasajes, o al menos 30 pasajes.

En una modalidad, las células que han sido infectas con TiLV o sus ácidos nucleicos (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, un ADNc de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o un ADNc complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos o variantes descritos en el presente documento) puede expresar una variedad de marcadores que los distinguen de las células no infectadas. La expresión de los marcadores puede evaluarse por una variedad de métodos conocidos en la materia. La presencia de marcadores puede determinarse al nivel de ADN, ARN o polipéptido.

En una modalidad, el método puede comprender detectar la presencia de una expresión de polipéptido del gen marcador. La expresión del polipéptido incluye la presencia de una secuencia de polipéptido del gen marcador, o la presencia de una elevada cantidad de polipéptido de gen marcador en comparación con las células no epiteliales.

Estos pueden detectarse por diferentes técnicas conocidas en la materia, incluyendo por secuenciación y/o enlace a ligandos específicos (tales como anticuerpos). Por ejemplo, la expresión del polipéptido puede ser evaluada por los
5 métodos que incluye, pero no se limita a inmunotinción, análisis FACS o inmunoblot. Estos métodos son bien conocidos en la materia.

En otra modalidad, el método puede comprender detectar la presencia de los ácidos nucleicos (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, un ADNc de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, o un ADNc complementario a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos o
10 variantes). La expresión de ARN incluye la presencia de una secuencia de ARN, la presencia de un empalme o precesamiento de ARN, o la presencia de una cantidad de ARN. Estos pueden detectarse por diferentes técnicas conocidas en la materia, incluyendo la secuenciación de todo o parte del ARN del gen marcador o por hibridación selectiva o amplificación selectiva de todo o parte del
15 ARN. En una modalidad, la hibridación *in situ* puede utilizarse para detectar los ácidos nucleicos de TiLV.

Las células transformadas resultantes pueden ser utilizadas para la investigación básica, así como pruebas
25 para agentes terapéuticos y profilácticos. Específicamente,

para este último, las células anfitrionas pueden ser incubadas y/o ponerse en contacto con un potencial agente terapéutico o profiláctico. La expresión resultante del constructo de gen se puede detectar y comparar a la
5 expresión del constructo de gen en la célula antes de ponerse en contacto con el agente.

Estos constructos de gen, así como las células anfitrionas transformadas con estos constructos de gen también pueden ser la base para animales transgénicos para
10 la prueba tanto como herramientas de investigación y para agentes terapéuticos y profilácticos. Dichos animales incluiría, pero no se limitan a, ratones sin pelaje y peces. Los fenotipos pueden ser correlacionados con los genes y consultados con el fin de determinar el efecto de
15 los genes en los animales, así como el cambio en el fenotipo después de la administración o contacto con un potencial agente terapéutico.

Una modalidad adicional de la presente invención es un método y/o ensayo para la detección e/o
20 identificación de un agente de prueba para la prevención y/o tratamiento del YiLV que comprende poner en contacto o incubar un agente de prueba a un nucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus fragmentos o variantes como se describe en este
25 documento y determinar si el agente de prueba se enlaza al

nucleótido, en donde si el agente de prueba se enlaza al nucleótido, el agente de prueba es identificado como un agente terapéutico y/o preventivo para TiLV.

Una modalidad adicional de la presente invención es un método y/o ensayo para la detección e/o identificación de un agente de prueba para la prevención y/o tratamiento del TiLV que comprende poner en contacto o incubar un agente de prueba a un nucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus fragmentos o variantes como se describe en este documento y detectar la expresión del nucleótido antes y después de poner en contacto o incubar con el agente de prueba, en donde si se disminuye la expresión del nucleótido después de poner en contacto o incubar con el agente de prueba, el agente de prueba es identificado como un agente terapéutico y/o preventivo para TiLV.

Una modalidad adicional de la presente invención es un método y/o ensayo para la detección e/o identificación de un agente de prueba para la prevención y/o tratamiento del TiLV que comprende poner en contacto o incubar un agente de prueba con un constructo de gen que comprende un nucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus fragmentos o variantes como se describe en este documento, y detectar la expresión del nucleótido en el constructo de gen antes y

después de poner en contacto o incubar con el agente de prueba con el constructo de gen, en donde si se disminuye o reduce la expresión del gen después de poner en contacto con el agente de prueba o compuesto, el agente de prueba es
5 identificado como un agente terapéutico y/o preventivo para TiLV.

Una modalidad adicional de la presente invención es un método y/o ensayo para la detección e/o identificación de un agente de prueba para la prevención y/o tratamiento
10 del TiLV que comprende transformar una célula anfitriona con un constructo de gen que comprende un nucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 1-11 o sus fragmentos o variantes como se describe en este documento, detectar la expresión del nucleótido en la
15 célula anfitriona, poner en contacto el agente de prueba con la célula anfitriona, y detectar la expresión del nucleótido en la célula anfitriona después de poner en contacto con el agente de prueba o compuesto, en donde si se disminuye o reduce la expresión del nucleótido después
20 de poner en contacto con el agente de prueba o compuesto, el agente de prueba es identificado como un agente terapéutico y/o preventivo para TiLV.

La expresión de un nucleótido o un gen puede ser determinada mediante un fenotipo medible, ya sea uno que es
25 nativo al gen o uno que es artificialmente vinculado, tal

como un gen reportero.

Una modalidad adicional es un método y/o ensayo para la detección e/o identificación de un agente de prueba para la prevención y/o tratamiento del TiLV, que comprende poner
5 en contacto o incubar un agente de prueba con un polipéptido codificada por una secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1-11, o un fragmento o una variante de las mismas, y detectar la presencia de un complejo entre el agente de prueba y el polipéptido, en donde si un complejo
10 entre el agente de prueba y el polipéptido se detecta, el agente de prueba se identifica como prevención y/o tratamiento para TiLV.

Una modalidad adicional es un método y/o ensayo para la detección e/o identificación de un agente de prueba
15 para la prevención y/o tratamiento del TiLV, que comprende poner en contacto o incubar un agente de prueba con un polipéptido codificada por una secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1-11, o un fragmento o variante de las mismas, y un ligando conocido del polipéptido, y detectar
20 la presencia de un complejo entre el agente de prueba y el ligando, en donde si un complejo entre el agente de prueba y el ligando se detecta, el agente de prueba se identifica como prevención y/o tratamiento para TiLV.

Otra modalidad de la presente invención es un
25 método y/o ensayo para la detección e/o identificación de

un agente de prueba para la prevención y/o tratamiento del TiLV, que comprende poner en contacto o incubar un agente de prueba con un polipéptido codificada por una secuencia de nucleótido de las SEQ ID NOs: 1-11, o un fragmento o variante de las mismas y un anticuerpo conocido del polipéptido, y detectar la presencia y cantidad de un anticuerpo no enlazado, en donde la presencia de un anticuerpo no enlazado indica que el agente de prueba se enlaza al polipéptido, y el agente de prueba se identifica como prevención y/o tratamiento para TiLV.

La selección de alto rendimiento puede utilizarse también para seleccionar los agentes de prueba. Pequeños péptidos o moléculas pueden ser sintetizados y enlazados a una superficie y se ponen en contacto con los polipéptidos y se lavan. El péptido enlazado es visualizado y detectado por métodos conocidos en la materia.

La invención también proporciona polipéptidos a utilizarse para el diseño racional de fármacos donde se pueden diseñar polipéptidos biológicamente activos de análogos estructurales. Dichos análogos interferirían con el polipéptido *in vivo*, como un enlace no productivo a objetivo. En este enfoque la estructura tridimensional de la proteína es determinada por cualquier método conocido en la materia incluyendo, pero no limitado a cristalografía de rayos x y el modelado por computadora. También puede

obtenerse información utilizando la estructura de proteínas homólogas o anticuerpos específicos a objetivo.

Utilizando estas técnicas, se pueden diseñar los agentes que actúan como inhibidores o antagonistas de los polipéptidos, o actúan como señuelos, enlazándose a moléculas objetivo de manera no productiva y bloqueando el enlace del polipéptido activo.

El término "agente" como se utiliza en el presente documento significa una sustancia que produce o es capaz de producir un efecto y se incluye, pero no se limita a químicos, farmacéuticos, biológicos, pequeñas moléculas orgánicas, anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas.

EJEMPLOS

La presente invención puede entenderse por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se presentan con el fin de ilustrar más completamente las modalidades preferidas de la invención. De ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplo 1- Materiales y métodos utilizados para los Ejemplos 2-9

Cultivo celular: Ocho líneas celulares de peces

establecidas fueron utilizadas en este estudio: (1) CHSE-214 (ATCC CRL 1681) del salmón real *Oncorhynchus tshawytscha*; (2) BF-2 (ATCC CCL 91), derivada del pez sol *Lepomis micropterus*; (3) BB (ATCC CCL 59), del from the Ameiurus nebulosus *Ictalurus nebulosus*; (4) y (5) EPC (ATCC CRL 2872 y KF-1), del carpa común *C. carpio*; (6) RTG-2 (ATCC CCL 55), de la trucha arcoiris *Salmo gairdneri*; (7) FHM (ATCC CCL 42), del *Pimephales promelas*; y (8) E-11, del *Channa striata* *Ophicephalus striatus* (generosamente proporcionados por M. Ucko, Investigación Limnológica y Oceanográfica de Israel). Además, se generó un cultivo de células cerebrales de la tilapia primaria, desarrollado como se describió anteriormente en Hasegawa *et al.* 1997 and Hedrick *et al.* 2000. Brevemente, las tilapias del Nilo comerciales (*O. niloticus*) (50 gramos) fueron sacrificados por sobredosis anestésica (600 mg/litro de metanosulfonato de tricaina [MS-222]; Finquel, Estados Unidos), y los cerebros se retiraron asépticamente. Los cerebros molidos fueron manualmente homogeneizados y pasados a través de un triturador de malla de 100 μ . Las células después fueron lavadas y sembradas en matraces sellados de 12.5 ml (Becton-Dickinson, San Francisco, CA, EE.UU.) a 25 °C. El medio de cultivo inicial contenía 80% de medio Leibovitz (L-15) (Gibco, Estados Unidos), 10% de suero de becerro fetal inactivado (FCS) (Gibco) y 10% de medio de suero de

tilapia inactivado, suplementado con L-glutamina (300 mg/litro), HEPES (1%), penicilina (100 µg/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml).

5 Durante los primeros 21 días de incubación, el 50% del medio se cambió cada semana. Después de eso, las monocapas fueron tripsinizadas y transferidas en matraces nuevos de 25 ml (Cellstar; Greiner Bio-One, Alemania) con una mezcla 1:1 del medio condicionado (de cultivos antiguos) y medio fresco. Los cultivos de las células primarias fueron pasados cada dos semanas. Después de 35 pasajes, el suero de tilapia y los medios de acondicionamiento fueron omitidos, y las células se dividieron (en una proporción de 1:2) cada 2 a 3 semanas en medio regular (L-15 con 5% de FCS inactivado).

15 **Virus y cultivo de virus:** Se recolectaron un total de 25 aislados del virus de la tilapia del lago (TiLV) de brotes sospechosos que ocurrieron entre mayo de 2011 y junio de 2013. Los aislamientos se obtuvieron de todas las regiones de Israel donde los peces son cultivados comercialmente: la orilla costera (2 aislamientos); el valle del Jordán (que comprende el valle de Bet Shean y el valle de Yizrael; 9 aislamientos); y alta y baja Galilea (3 aislamientos). Además, se obtuvieron 11 aislamientos de varias especies de tilapias silvestres del mar de Galilea.

20 Un brote de peces cultivados se definió como un aumento

repentino e inexplicado en la mortalidad (2% o más diario) en al menos tres días consecutivos. Si dos pabellones fueron afectados simultáneamente en la misma granja, estos se clasifican como un solo brote. Por lo tanto, cada

5 aislado representa un brote clínico distinto. Los virus de peces silvestres que muestran lesiones oculares fueron aislados de peces atrapados comercialmente en el mar de Galilea; cada aislado representa una captura diferente. Los peces que pesan de 20 a 200 gramos o 40 a 350 gramos (peces

10 silvestres y criados, respectivamente) fueron recolectados durante las estaciones calientes (mayo a octubre; temperatura del agua, entre 22 y 32 °C). Para minimizar los riesgos de contaminación, los sesos y vísceras (riñones, hígados, bazos y corazones) de los peces sospechosos se

15 retiraron asépticamente, se agruparon y se homogeneizaron manualmente con nueve volúmenes de la solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), centrifugada a 3,000 x g durante 10 minutos, y los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0.22 μ (Sarstedt, Alemania). Los

20 filtrados se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Para la infección, las monocapas (alrededor de 90% de confluencia) se lavaron dos veces con HBSS y se incubaron con 500 μ l del filtrado de virus a 25 °C por 1 hora, después de que las células se lavaron con HBSS, se complementaron con medio L-

25 15 (2% FCS) y se incubó a 25 °C. Los cultivos fueron

observados diariamente durante 21 días para efectos citopáticos (CPE). En experimentos donde se reprodujo la enfermedad de la tilapia por inyección de virus, un virus llamado TiLVx2 también fue utilizado, que se purificó por dos sucesivas rondas de ensayos de dilución de punto final. Esto se realizó con cultivos de E-11, infectados con diluciones seriadas de TiLV (aislado 4/2011; obtenido del cerebro de un pez de San Pedro que se recolectó del lago Kinneret en junio de 2011).

10 **Titulación del virus:** El sobrenadante del cultivo que contiene el virus original (aislado 4/2011) se cultivó en células E-11 y se diluyó en serie en incrementos de 10 veces con HBSS y 50 µl de cada dilución se inoculó en monocapas de E-11 en placas de 96 pocillos. Se utilizaron cuatro pocillos para cada muestra diluida. Las placas fueron incubadas a 25 °C y observadas diariamente para CPE. Después de 7 días, se calculó el 50% de la dosis infecciosa del cultivo de tejido (TCID₅₀) (ml⁻¹) por el método de Reed y Muench 1938.

20 **Análisis de la microscopía electrónica:** Para los exámenes de TiLV por microscopía electrónica de transmisión, los cultivos infectados por E-11 fueron raspados del matraz, centrifugados (a 2,000 rpm durante 7 minutos), fijados con glutaraldehído al 1.5% en 0.1 M de cacodilato de sodio (pH 7.2) durante 2 horas, y luego

25

enjuagar cinco veces en tampón fosfatado (pH 7.2). Los gránulos, que consisten de células E-11 infectadas, fueron fijados después en en 1% de OsO₄ en tampón fosfatado y deshidratados con mayores concentraciones de etanol. Los

5 gránulos después se lavaron dos veces con óxido de propileno al 100% y se trataron con óxido de propileno-Epon (3:1) durante 30 minutos, seguido de óxido de propileno-Epon (1:1) durante 15 minutos. Finalmente, los gránulos fueron incluidos en Epon al 100% y se dejó durante la

10 noche. Las secciones delgadas (70 a 90 nm) se colocaron en rejillas de cobre recubiertas con Formvar y teñidas con acetato de uranilo, seguido por citrato de plomo, según el método de Reynolds (Reynolds 1963). Todas las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico JEOL 1200-EX

15 que funciona a 60 o 80 kV (Electron Microscopy [EM] Unit, Institute of Biotechnology, Bar-Ilan University, Israel). El análisis de la ME de los gránulos del virión negativamente teñidas se realizó en la Unidad de ME, Universidad de Tel Aviv, exactamente como se describe antes

20 en Oberpichler et al. 2008, con un microscopio de electrones de transmisión A JEM 1200 EX (JEOL-USA, Peabody, MA, EE.UU.). Los viriones para este análisis fueron granulados por ultracentrifugación mediante almohadillas de sacarosa al 25%.

25 **Purificación del virus a partir de sobrenadantes de**

cultivo usando fraccionamiento de gradiente de sacarosa:

Las células E-11 cultivadas se infectaron con TiLV (aislado 4/2011), y el sobrenadante del cultivo se limpió de los restos celulares por centrifugación (10 minutos a 3,000 rpm). El sobrenadante se dividió en capas sobre 2 ml de una almohadilla de tampón Tris-EDTA(TE) -sacarosa al 30% (p/vol) y se centrifugó por 2 h en un rotor T865 a 65,000 rpm (Sorvall Discovery 90SE). El gránulo se suspendió de nuevo en tampón TE y se dividió en capas sobre un gradiente de paso de sacarosa (Bacharach *et al.* 2000; Laham and Bacharach 2007; Melamed *et al.* 2004). El gradiente consistió en capas de 3 ml con concentraciones de sacarosa de 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10% (peso/vol) en TE, de abajo hacia arriba. La ultracentrifugación se realizó en un rotor TST41.14 durante 2 horas a 40,000 rpm (Sorvall Discovery 90SE). Las fracciones de un mililitro fueron tomadas de la parte superior del gradiente, y los viriones se granularon de cada fracción por ultracentrifugación (durante 2 horas a 65,000 rpm; rotor T865; Sorvall Discovery 90SE) y se suspendieron de nuevo en 1 ml de tampón TE. Las alícuotas de 100 µl de cada muestra se incubaron con células E-11 sin tratamiento para supervisar CPE. La incubación de cultivos con controles negativos, consisten en alícuotas de las fracciones de un gradiente de sacarosa idéntico pero sin adición de sobrenadantes de cultivo, que no resultó en CPE.

Aislamiento de ácidos nucleicos de viriones

purificados y síntesis de ADNc: Los ácidos nucleicos se extrajeron de gránulos de virión purificado utilizando peqGOLD Trifast para ARN (Peqlab, Alemania) o el kit de preparación de plantilla para PCR alto puro para ADN (Roche, Alemania). La transcripción inversa se realizó con el kit de ADNc de Verso (termo, Lituania), según las instrucciones del fabricante. Para identificar las secuencias específicas del TiLV, los sobrenadantes de cultivos de E-11 infectados por TiLV (aislado 4/2011) se limpiaron de los restos celulares por medio de centrifugación (por 10 minutos a 3,000 x g), y los sobrenadantes purificados fueron sometidos a purificación adicional por ultracentrifugación (durante 2 horas en un rotor T865 a 65,000 rpm [Sorvall Discovery 90SE]) a través de una almohadilla de sacarosa al 30%. El gránulo se suspendió de nuevo en TE, y los viriones se purificaron además por almohadillas de sacarosa de 40 a 70% (peso/vol). Después de la ultracentrifugación (rotor TST41.14 durante 2 horas a 40,000 rpm; Sorvall Discovery 90SE), se recolectó la fracción de sacarosa al 40%, y los viriones se granularon por ultracentrifugación adicional (rotor TST41.1 durante 2 horas a 40,000 rpm; Sorvall Discovery 90SE). Se extrajo el ARN de los gránulos por tiocianato de guanidina (peqGOLD Trifast; peqlab). Se generó el ADNc por

transcripción inversa y cebado aleatorio, utilizando el ARN purificado como una plantilla. Los fragmentos de este ADNc fueron aislados de la clonación de pistola (Nehls y Boehm 1995).

5 **Clonación de pistola por cebado aleatorio:** La clonación de pistola se realizó como se describe por Nehls y Boehm. El ADNc purificado (aproximadamente 10ng) fue cebado al doble con un cebador MluI(N)6 (GGAAGTCAATGCACGCGTNNNNNN) (SEQ ID NO: 13) usando una
10 mezcla maestra de PCR ReddyMix (Thermo, Lituania). Los productos cebados fueron amplificados por PCR con cebador MluI (GGAAGTCAATGCACGCGT) (SEQ ID NO: 14) y clonados en el vector pJET1.2/blunt (CloneJET; Fermentas/Thermo, Lituania), que se transformó en células HIT-DH5 α de cepa
15 *Escherichia coli* (Real Biotech, Taiwán). Los transformantes resistentes a ampicilina, cultivados a 37 °C en placas de agar LB que contienen 100 μ g/ml de ampicilina, fueron recolectados y cultivados durante la noche en 5 ml de LB suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina. El plásmido de
20 ADN fue aislado utilizando el minikit de plásmido HiYield (RBC, Taiwán). Los insertos fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores derivados de pJET1.2, separados por electroforesis en un gel de 1.0%, colocados en tampón 1X Tris-acetato-EDTA (TAE) a 80 V durante 1.5 horas,
25 teñidos con bromuro de etidio, eliminado y purificado por

gel mediante la extracción del gel de GeneJET y micro kit de limpieza de ADN (termo, Lituania). Los fragmentos únicos fueron secuenciados por Hy laboratorios (Israel) usando ABI 3730. Las secuencias fueron analizadas para homología de secuencias de nucleótidos en la base de datos de GenBank usando la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica de nucleótido (BLASTn) y el *software* Vector NTI 6 (InforMax, Inc.). Se realizaron más búsquedas de bases de datos de la proteína por BLASTx. Los cebadores internos de cada clon secuenciado fueron probados para la amplificación por PCR del genoma de TiLV. Los cebadores derivados del clon 7450 específicamente amplificó la secuencia cognada de cultivos infectados por TiLV, en transcripción inversa por PCR (RT-PCR).

15 **Amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE):**

Para extender la secuencia del clon 7450 obtenido por clonación por pistola, la rápida amplificación de los extremos de ADNs 3' y 5' (RACE) las reacciones se llevaron a cabo como se describe antes (Scotto Lavino et al. 2006a; Scott-Lavino et al. 2006b), utilizando ARN total que fue extraído de las células E-11 infectadas por TiLV por el reactivo de EZ-ARN (Biological Industries). Brevemente, para RACE 3', se generó el ADNc usando el cebador Q_T

(CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT VN) (SEQ ID NO: 15) y el sistema de síntesis de la primera

hebra SuperScript III para RT-PCR (Catálogo No. 18080-051; Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Se amplificó el ADNc con el clon 7450/cebado 150R (TATCACGTGCGTACTCGTTTCAGT) (SEQ ID NO: 16) que fue derivado

5 de una secuencia interna del fragmento de pistola y con el cebador Q₀ (CCAGTGAGCAGAGTGACG, (SEQ ID NO: 17) derivada del cebador Q_T), usando la enzima Ex-Taq (catálogo no. RR001A; TaKaRa). Los productos resultantes de PCR fueron diluidos 1:20 y fueron sometidos a una segunda PCR con los

10 cebadores anidados Q_I (GAGGACTCGAGCTCAAGC (SEQ ID NO: 18) derivada del cebador Q_T) y E11-inf-R (AAGTTCTCTTGCCTCTTGG (SEQ ID NO: 19), derivada de la secuencia del fragmento de pistola). Para 5' RACE, se generó ADNc como arriba pero con el clon de cebador 7450/150F (CACCCAGACTTGCGGACATA)

15 (SEQ ID NO: 20). Las colas de Poli(A) fueron agregadas al ADNc mediante la transferasa terminal (catálogo no. 3333566; Roche), según las instrucciones del fabricante. El ADNc con cola se amplificó por PCR usando la el cebador E-11-inf-F (TCCAAGGAAACAGCTGAGC (SEQ ID NO: 21), derivado de

20 la secuencia del fragmento de pistola), junto con una mezcla de los cebadores Q₀ y Q_T. Los productos de PCR resultantes se diluyeron 1:20 y se sometieron a un segundo PCR-anidado usando los cebadores E11-inf-F-en (GAGGCAATATGGATTCTTCG) (SEQ ID NO: 22) y Q_I.

25 **RT-PCR** Se tomaron muestras de cerebro, corazón,

cabeza del riñón, bazo e hígado de casos clínicos de sospecha de brotes de TiLV, agrupados y directamente congelados a -80 °C. El ARN total fue purificado utilizando peqGOLD Trifast (Peqlab, Alemania), según las instrucciones del fabricante, seguidas por transcripción inversa y amplificación (kit de Verso 1-paso RT-PCR ReddyMix; Thermo, Lituania). Se sustituyeron los cebadores al azar del *kit* con el cebador específico externo ME1 (GTTGGGCACAAGGCATCCTA) (SEQ ID NO: 23) y el clon 7450/150R (TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT) (SEQ ID NO: 16). Se realizó el ciclo a 50 °C durante 15 minutos (transcripción inversa), 95 °C por 2 minutos (inactivación de la enzima) y 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 60 segundos; la reacción se terminó por 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1% en 0.5x tampón TAE (40 mM de Tris acetato y 1 mM de EDTA).

Ensayos de sensibilidad de nucleasas: Se recolectó el sobrenadante (9 ml) de un cultivo de E-11 infectadas con TiLV y los viriones se purificaron y se granularon a través de una almohadilla de sacarosa al 25% (peso/vol), utilizando ultracentrifugación (107,000 X g a 4 °C durante 2 horas). Un sobrenadante de cultivo de E-11 no infectado se utilizó como un control. Para digerir los ácidos nucleicos libres, los gránulos se resuspendieron en 300 µL

de tampón de DNasa 1X (10 mM de Tris-HCl [pH 7.5], 2.5mM de $MgCl_2$ y 0.5 mM de $CaCl_2$) y se complementaron con 33 μ g de RNasaA (Sigma R4642) y 1 U de DNasa (DNasa de línea basal - CERO). Las muestras se incubaron durante 40 minutos a

5 temperatura ambiente, después de que cada mezcla de reacción fue diluida en 9 ml de medio Leibovitz (L-15), suplementado con 5% de FCS y los viriones se granularon como se describió anteriormente. Para liberar ácidos nucleicos protegidos por nucleasa de los viriones y para

10 digerir posibles restos de RNasa A y DNasa I, los gránulos fueron resuspendidos en 150 μ L de tampón de proteinasa K (50 mM de Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 1% de SDS), suplementado con 100 μ g/ml de proteinasa K (Roche), y las proteínas fueron digeridas durante 30

15 minutos a 37 °C. Los ácidos nucleicos fueron extraídos por el fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (CIP) y se precipitó con etanol, 0.3 M de acetato de sodio (pH 5.2) y glucógeno como portador. Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 20 μ l de tampón (10 mM de Tris-HCl [pH 8.3], 10 mM de $MgCl_2$, 1

20 mM de Ditiotreititol [TDT], 60 mM de NaCl), y añadió 3 μ l a 100 μ l de tampón de RNasa I (100 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl [pH 7.9], 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de TDT) con o sin 50 unidades de RNasa I (catálogo no. M0243S; NEB). La digestión se llevó a cabo durante 5 minutos a 37 °C, y los

25 ácidos nucleicos fueron extraídos por CIP y precipitados

como se describió anteriormente. Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 20 µl de mezcla de reacción de transcripción inversa; una reacción sin la transcriptasa inversa también fue montada para asegurar la ausencia del ADN protegido. El ADNc resultante fue amplificado con cebadores específicos a TiLV (anidado ext-1 [TATGCAGTACTTTCCTGCC] (SEQ ID NO: 24) y anidado ext-2 (TTGCTCTGAGCAAGAGTACC] (SEQ ID NO: 25)) o con cebadores específicos a retrovirus de Channa (SnRV) (Channa gag-pol fw [CAGATCACTGATCGATGC] (SEQ ID NO: 26) y Channa gag-pol rev [GTCTGAAAGGTAAGGTGG] (SEQ ID NO: 27)). Los productos amplificados (491 y 284 bp para TiLV y SnRV, respectivamente) fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Ensayos de sensibilidad de éter y cloroformo: Se realizaron los ensayos de sensibilidad de TiLV para éter y cloroformo como se describe antes (Crandell *et al.* 1975; Hutoran *et al.* 2005).

Reproducción experimental de la enfermedad y cuestiones éticas: Las especies de tilapia utilizadas en este estudio, *O. niloticus* (cepa Chitralada), se cultivó en una instalación libre de patógeno específico (SPF) (ambiente libre de patógeno tratado con UV) a una temperatura constante de 28 °C. Los peces fueron alimentados con un régimen diario del 2% (peso/peso); los

parámetros de agua ($O_2 > 5$ ppm, $NH_4^+ < 1$ ppm, $NaCl < 1$ ppt) fueron mantenidos constantes. Se llevaron a cabo todas las infecciones inducidas experimentalmente con el aislado de campo de TiLV (aislado 4/2011, paso 2), en el que se
5 dividió en alícuotas y se mantuvieron congelados a $-80^\circ C$. Antes de usar, el virus fue descongelado y se cultivó una vez más (paso 3). Para la reproducción artificial de la enfermedad, 2.6×10^5 TCID₅₀ se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) (Grupo 1) en cada pez (30 a 35
10 gramos). Todos los experimentos se realizaron por triplicado con grupos de 30 peces. Para prevenir las infecciones transmitidas por el agua, cada grupo de peces se mantuvieron en un acuario separado de 100 litros. Durante los ensayos de convivencia (Grupo 2), se
15 mantuvieron grupos de 30 peces en acuarios de 200 litros que fueron divididos en tres compartimentos por rejillas permeables al agua, que permitía la circulación de agua (pero no de peces) en el acuario; un grupo de control se mantuvo en el medio. Los peces que sobrevivieron la
20 infección primaria por i.p. se agruparon y 3 semanas después fueron divididos en dos grupos (cada uno con 15 peces) e infectados una vez más por inyección intraperitoneal. Los grupos de control se inyectaron con cultivos de E-11 no infectados (sin tratamiento).

25 Cuando se realizaron los experimentos *in vivo/ex*

vivo, el cerebro de los peces inyectados con TiLV individuales fueron recolectados (5 a 7 días después de la inyección) y molido como antes. Los homogeneizados (500 µl) se incubaron con cultivos de E-11 confluentes. Después de la publicación de CPE, los sobrenadantes se recolectaron e inyectaron (200 µL) i.p. en los peces sin tratamiento.

Las condiciones de salud de los peces fueron cuidadosamente supervisadas a lo largo de los períodos de crecimiento y experimento; los signos externos y las tasas de mortalidad fueron supervisados dos veces al día para un total de 21 días. El cuidado de los animales, manejo experimental y normas de seguridad se ajustaron a los lineamientos establecidos por la Comisión de cuidado de animales de laboratorio en los servicios veterinarios israelíes y se llevaron a cabo bajo permiso de 020_b5471_6, publicado por el Comité israelí para el Bienestar Animal.

Análisis Histológico: Las muestras de tejido fueron recolectadas de los peces eutanasiados infectados naturalmente por incisión abdominal y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%. Los especímenes fueron incorporados en parafina (Paraplast Plus; Diapath), cortado por micrótopo (Reichert-Jung 2050) en serie de secciones de 5 µm, teñidos con hematoxilina y eosina (H & E) 277 (Roberts et al. 2012) y se examina bajo un microscopio óptico (Leica DMRB). Las imágenes fueron adquiridas por un

sistema de iluminación digital de Nikon.

Análisis Estadístico Los resultados de los experimentos *in vivo* se presentaron como porcentajes de las tasas de mortalidad medias de tres (o dos, en caso del pez sobreviviente) experimentos independientes. Cada experimento incluyó tres grupos experimentales (tres repeticiones independientes) de 30 peces.

Los experimentos con los peces sobrevivientes fueron realizados por duplicado (dos repeticiones independientes), en el que cada grupo estuvo integrado por 20 peces. La variabilidad entre experimentos (infección por inyección intraperitoneal directa, infección por convivencia y los peces de control) se determinó mediante pruebas de chi cuadrado, en las que un valor P mayor de 0.05 se consideró significativo.

Deposición de cultivo: TiLV (No. de acceso a CNCM I-4817) fue depositado en la colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM) en el Instituto Pasteur, París, Francia. **Número de acceso a secuencia de nucleótido:** El número de acceso de GenBank para la secuencia extendida del clon 7450 es KJ605629 (SEQ ID NO: 1).

Ejemplo 2 - Distribución geográfica y características de las tilapias enfermas del mar de Galilea y estanques comerciales.

Se detectaron brotes de enfermedades en las tilapias

silvestres y comerciales en el mar de Galilea y en estanques comerciales en Israel, situado en la orilla costera norte, Bet-Shean, Yizrael, el valle del Jordán y alta y baja Galilea. En los estanques comerciales, esta enfermedad dio lugar a una mortalidad masiva (Figura 1A). El muestreo del pez procedente de capturas comerciales en el mar de Galilea reveló que todas las especies de tilapia son susceptibles a la enfermedad, aunque no se observaban mortalidades masivas. En este caso, los peces enfermos se presentan con las lesiones oculares pronunciadas (Figura 1B).

Los hallazgos patológicos incluyen lesiones macroscópicas caracterizadas principalmente por alteraciones oculares, incluyendo opacidad del lente (catarata). En casos avanzados, las lesiones incluyen lentes rotas con uveitis inducida por facoclástica o endoftalmitis acompañado por la formación de una membrana ciclítica, seguida por la hinchazón del globo ocular (bftalmia), pérdida de la integridad del globo con córneas perforadas ocasionales y con poros del contenido espesado o contracción y pérdida del funcionamiento ocular (ftisis bulbi) (Figura 1B). Otras lesiones incluyen erosiones de la piel (observadas en tilapias criadas en estanque enfermas; Figura 1C), hemorragias en las leptomeninges y congestión moderada del bazo y del riñón (Figura 1D).

Las lesiones histológicas del cerebro incluyen edema, hemorragias focales en las leptomeninges y congestión capilar en la materia blanca y gris (Figura 1E). Se detectaron focos de gliosis y manguitos perivasculares ocasionales de linfocitos (Figura 1F). Algunas neuronas dentro del telencéfalo y en particular en los lóbulos ópticos muestran distintos niveles de degeneración neuronal, incluyendo rarefacción y vacuolización y núcleos desplazados periféricamente (cromatolisis central).

Las lesiones oculares incluyeron una cápsula lenticular ondulada, delgada y con frecuencia en espiral y rota, rodeada de fibroplasia circular y fibrosis con múltiples sinequias al iris y cuerpo ciliar (sinequia posterior) y un número moderado de células granulocíticas eosinófilas y centros melano-macrófago o MMCs. El infiltrado extendido en la cámara anterior, iris, humor vítreo y coroides (endoftalmitis). Había cambios opacificados dentro del lente caracterizado por estructuras esféricas homogéneas eosinófilas (glóbulos de morgagni), las células epiteliales marcadamente agrandadas en el lente con abundante citoplasma microvacuolado eosinófilo (células de la vejiga), grandes lagos de fluido proteínico (fibras del lente licuadas), mineralización y células alargadas aplanadas (metaplasia fibrosa) (Figura 1Ga, en comparación con un lente normal en la Figura 1 Gb). El epitelio

escamoso de la córnea con frecuencia fue erosionado y ulcerado e infiltrado por un número moderado de linfocitos, macrófagos y células granulocíticas eosinófilas, y fue subrayado por la neovascularización estromal y edema (Figura 1H).

El parénquima hepático muestra focos distribuidos al azar ocasionales de hinchazón hepatocelular y claro, con la acumulación citoplasmática de pigmento amarillo a marrón granular. El bazo era hiperplásico, con proliferación de linfocitos que rodean los elipsoides. Los MMCs aumentaron en tamaño y cantidad en el hígado y el bazo. Los MMCs son racimos característicos de células cargadas de pigmento, comúnmente vistas dentro de la matriz de soporte reticuloendotelial de los tejidos hematopoyéticos. La proliferación de MMC se asocia con etapas tardías de infección crónica como una respuesta a la lesión de tejido severa en una variedad de infecciones (sobre todo virus) o las condiciones ambientales pobres. Por lo tanto, se consideran indicadores de salud de la población de peces (Agius y Roberts 2003).

Ejemplo 3- Aislamiento del agente etiológico de ejemplares infectados

Para cultivar patógenos potenciales de tilapias enfermas, los órganos de los peces con las características descritas anteriormente se agruparon, homogeneizaron y se

incubaron con ocho diferentes líneas celulares como se describe en el Ejemplo 1. No se identificó ningún patógeno conocido, y sólo la línea celular E-11 establecida y las células cerebrales de tilapia primaria demostraron

5 constantemente CPE en incubación con los homogenados antes mencionados. En las células E-11, CPE se convirtió visible 5 a 7 días después de la inoculación, con la aparición de vacuolas citoplásmicas y formación de la placa (Figura 2A), que progresó rápidamente a una desintegración casi completa

10 de la monocapa celular (en los días 9 a 10 después de la inoculación). El CPE en las células cerebrales de tilapia primaria se caracterizó por la conversión de las típicas células alargadas en las células hinchadas, redondeadas y granuladas, que fueron claramente observadas en los días 10

15 a 12 después de la inoculación (Figura 2B), que lleva a un gran desprendimiento de la monocapa (días 14 a 19), pero sin formación de placa. El E-11 infectado por prueba de control y cultivos cerebrales de tilapia primarios no mostró ningún CPE (Figuras 2C y 2D, respectivamente). Los

20 resultados similares se obtuvieron cuando se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos con CPE para inocular los cultivos sin tratamiento (probadas para hasta 18 pasajes) y cuando los sobrenadantes o los homogenados antes mencionados, se filtraron a través de 0.22 μ m filtros.

25 Además, el número de placas inducido por el agente se

relaciona directamente con su dilución, produciendo una curva de un hit. Una sola unidad infecciosa por lo tanto fue suficiente para producir una placa. Estos resultados indicaron que el CPE descrito fue debido a la presencia de un agente infeccioso, probablemente un virus. El agente causante de CPE fue recuperado de 25 muestras, recolectadas de todas las regiones israelíes donde los peces fueron cultivados.

Ejemplo 4 - Características morfológicas de las partículas tipo virus

Más apoyo para la infección viral en cultivos de E-11 que muestran CPE vinieron del examen de ME de secciones delgadas de estas células como se describe en el Ejemplo 1. Este análisis reveló la presencia de escasas partículas densas a los electrones (diámetro, 55 a 75 nm), incluidas en la membrana intracitoplasmática (Figura 2E) o dentro del citoplasma (Figura 2F). No se encontraron dichas partículas en los cultivos de células sanas de control. Cabe señalar, que estas partículas no originan los retrovirus de cabeza de serpiente (SnRV) que se expresan en E-11, desde los montajes de este retrovirus tipo C son más grandes y se generan sólo en la membrana plasmática; por otra parte, los viriones nacientes de SnRV no fueron visualizados por ME en esta línea celular específica (aunque las secuencias de SnRV podrían ser amplificadas por PCR).

Los gránulos, purificados a partir de los sobrenadantes de los cultivos de E-11 infectados por ultracentrifugación a través de las almohadillas de sacarosa al 25%, fueron teñidos negativamente y examinados por ME. Este análisis reveló estructuras tipo virión (aproximadamente 75 a 80 nm) rodeadas por una capa gruesa fácilmente detectada (Figura 2G). Estos viriones eran abundantes y no se detectaron en los gránulos de control preparados a partir de las células E-11 sin tratamiento.

Ejemplo 5- Sensibilidad del agente infeccioso al éter o cloroformo

El análisis del ME del Ejemplo 4 indicaron que el agente infeccioso aislado de la tilapia enferma, es un virus envuelto. Para probar esto, los viriones en los sobrenadantes de las células E-11 infectadas fueron expuestos a éter o cloroformo y el efecto de estos tratamientos en la infectividad se midió como se describe en el Ejemplo 1.

La tabla 1 sintetiza los resultados de dos y tres repeticiones de los ensayos de sensibilidad de éter y cloroformo, respectivamente. Se observó una reducción de la infectividad de aproximadamente tres (cloroformo) a cinco (éter) órdenes de magnitud, que demuestra la sensibilidad del agente a estos disolventes. Esto indica que el agente infeccioso de hecho está envuelto por una membrana

lipídica.

TABLA 1 Ensayos de sensibilidad de éter y cloroformo .

Tratamiento	Expt No.	TCID ₅₀ /ml sin tratamiento	TCID ₅₀ /ml más tratamiento	reducción de plegado	reducción de plegado promedio
Éter	1	10 ^{4.49}	10 ^{3.1}	10 ^{5.49}	1.58 × 10 ⁵
	2	10 ^{4.83}	10	10 ^{5.83}	
Cloroformo	1	10 ^{4.63}	10 ^{3.5}	10 ^{3.13}	0.93 × 10 ³
	2	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	10 ²	
	3	10 ^{4.63}	10 ^{3.5}	10 ^{3.13}	

5

Ejemplo 6- Caracterización Molecular inicial del Virus de la tilapia

Al haber demostrado que un agente infeccioso puede ser aislado de peces enfermos y puede ser propagado en cultivo celular específico (Ejemplos 3), este agente causante de la enfermedad fue nombrado virus de la tilapia del lago (TiLV), como una referencia al sitio desde el que fue inicialmente aislado.

Para purificar el TiLV, los sobrenadantes de cultivo infectados por TiLV fueron fraccionados mediante gradientes de paso de sacarosa de velocidad desde 10 hasta 70% de sacarosa. La actividad de inducción de CPE fue localizada principalmente a las fracciones de sacarosa al 30 a 40%.

Para identificar además secuencias específicas de TiLV, se extrajo el ARN de los viriones de TiLV (purificados por almohadillas de sacarosa a través de ultracentrifugación) y utilizado como una plantilla en una reacción de transcripción inversa. Los fragmentos del ADNc resultante se clonaron mediante un enfoque de pistola como

25

se describe en el Ejemplo 1. Este enfoque permite la clonación de ADNcs que están presentes en pequeñas cantidades, sin conocimiento previo de sus secuencias. Uno de estos fragmentos (clon 7450) fue sometido a reacciones de RACE 5' y 3', dando por resultado la identificación de 1,326 bases de una secuencia de TiLV (SEQ ID NO: 1) (número de acceso a GenBank KJ605629), que contiene un marco abierto de lectura (ORF) de 420 aminoácidos (SEQ ID NO: 12). La SEQ ID NO. 1 fue identificada más adelante como parte de la SEQ ID NO: 9.

No se encontraron homologías significativas en las secuencias de ácidos nucleicos y proteína de este clon usando búsquedas BLAST (Altschul *et al.* 1997; Johnson *et al.* 2008) en las bases de datos de GenBank.

Ejemplo 7- PCR para la detección de TiLV

Como se describe en el Ejemplo 1, se realizó PCR para detectar TiLV. Para establecer un ensayo de PCR para la detección de TiLV, el ARN total fue extraído de los cerebros, riñones, corazones, hígados y bazo de peces moribundos. Además, el ARN fue extraído del cerebro de la tilapia primaria infectado con TiLV o cultivos de E-11 y fue utilizado como una plantilla para la generación de ADNc. Estas muestras fueron sometidas a RT-PCR con cebadores que se derivaron del clon 7450 (SEQ ID NO: 1). Un fragmento de 250 bp fue amplificado con ME1

(GTTGGGCACAAGGCATCCTA) (SEQ ID NO: 23) y el clon 7450/150R (TATCACGTGCGTACTCGTTTCAGT) (SEQ ID NO: 16). Los ensayos de PCR dio lugar a la amplificación del fragmento 250 bp esperado de los cerebros de los peces infectados por TiLV (Figura 3A).

La amplificación de TiLV fue alcanzada solamente después de un paso de transcripción inversa, incluso bajo condiciones en las que las muestras no fueron tratadas con DNasa (Figura 3B). Se extrajo el ARN total del sobrenadante o de extractos celulares del cultivo E-11 infectado por TiLV, o del cultivo de E-11 sin tratamiento. Las muestras no fueron tratadas con DNasa y la transcripción inversa se realizó (+) o no (-) antes del paso de PCR. También se incluyó un control negativo de "no ARN" (carril 7). Un fragmento de 491-bp fue amplificado con los cebadores anidados ext-1 (TATGCAGTACTTTCCTGCC) (SEQ ID NO: 25) y anidado ext-2 (TTGCTCTGAGCAAGAGTACC) (SEQ ID NO: 26), sólo cuando se realizó la transcriptasa inversa. Esto es altamente indicativo de un genoma de ARN de TiLV. La amplificación consistente en las muestras de los tejidos cerebrales fue observada en comparación con los otros órganos. También se observó la amplificación en cerebro de tilapia primaria infectada por TiLV y cultivos de E-11 pero no en un control negativo que incluía ADNc preparado a partir del cerebro de un pez saludable (sin tratamiento)

(Figura 3B).

No se observó amplificación en controles negativos adicionales, que incluían cerebro de tilapia primaria infectada por prueba y cultivos de E-11 o cultivos de E-11 infectados con el betanodavirus de necrosis nerviosa viral (VNN). Cabe señalar, la ausencia de amplificación en la muestra de células infectadas con VNN que indica además que el clon 7450 representa una secuencia derivada de TiLV en lugar de un gen de pez que es regulado al alza después de la infección. En todos los casos, la secuenciación de los fragmentos amplificados reveló completa identidad con la secuencia prevista.

El ensayo de PCR anterior también ha aprovechado para probar aún más la naturaleza de ARN del genoma de TiLV. Para esto, los viriones en los sobrenadantes de cultivos de E-11 infectados por TiLV se expusieron a DNasa I y RNasa A para digerir los ácidos nucleicos que no están protegidos por los viriones. Las partículas fueron granuladas a través de almohadillas de sacarosa y digeridas con proteinasa K, y los ácidos nucleicos desproteinizados protegidos fueron purificados. Estos ácidos nucleicos fueron expuestos a RNasa I, una enzima con una preferencia por el ARN de una hebra. Los productos resultantes fueron transcrito o no inversos y sometidos a amplificación por PCR usando cebadores específicos a TiLV. (Anidado ext-1

[TATGCAGTACTTTCCTGCC] (SEQ ID NO: 25) y anidado ext-2
 (TTGCTCTGAGCAAGAGTACC] (SEQ ID NO: 26)) o cebadores
 específicos a SnRV (Channa gag-pol fw [CAGATCACTGATCGATGC]
 (SEQ ID NO: 27) y Channa gag-pol rev [GTCTGAAAGGTAAGGTGG]
 5 (SEQ ID NO: 28).

La amplificación de secuencias de TiLV se observó
 sólo después de un paso de transcripción inversa (Figura
 3C, carriles 1 y 3, similar al resultado en la Figura 3B),
 y sólo si RNasa I se evitó (Figura 3, carriles 1 y 2). El
 10 ARN genómico de única hebra de SnRV, que fue copurificada a
 lo largo del genoma de TiLV, fue utilizado como control
 positivo interno para este ensayo (Figura 3C, carriles 5 y
 8). Estos resultados indicaron además que el genoma TiLV,
 encapsulado en el virión, está compuesto de ARN en forma de
 15 única hebra.

Ejemplo 8- Reproducción de la enfermedad de la tilapia por inyección Intraperitoneal

Para probar si TiLV puede causar enfermedad en las
 tilapias, los sobrenadantes de los cultivos cerebrales de
 20 la tilapia primariaa o de E-11 infectadas por TiLV o sin
 tratamiento fueron filtrados (0.22 µm) y se inyectó 200 µl
 i.p. en *Tilapia nilotica* sin tratamiento (grupos de 30
 peces como se describe en el Ejemplo 1). Todos los peces
 sin tratamiento fueron inoculados con los sobrenadantes de
 25 control (de los cultivos de E-11 sin tratamiento) seguía

siendo asintomáticos. Sin embargo, 74 a 85% de los peces que fueron inyectados con los sobrenadantes de cultivos cerebrales de tilapia primaria infectada por TiLV o E-11 infectados por TiLV desarrollaron enfermedad clínica (letargo, decoloración, alteraciones oculares, parches en la piel y úlceras) y murieron dentro de 10 días (Figura 4). También se observó la misma tasa de mortalidad para los peces inyectados con TiLV que fueron purificados por el ensayo de dilución de punto final (TiLVx2). Además, los cerebros de peces experimentalmente infectados fueron cosechados e incubados de manera concomitante con las células E-11 sin tratamiento. Tales cultivos desarrollaron un CPE característico. Los sobrenadantes de estos cultivos fueron cosechados e inyectados en peces sin tratamiento, dando lugar a la aparición de la enfermedad en los peces. En general, este en un experimento de paso *in vivo/ex vivo* se repitió en serie tres veces, con una tasa de mortalidad constante de 75 a 85% en cada ronda dentro de los 10 días después de la inyección.

Esto claramente confirmó que TiLV, aislado de los peces infectados y propagado en células E-11, de hecho fue el agente etiológico de la enfermedad. Es importante, que los peces que sobrevivieron a la enfermedad inducida experimentalmente (35 peces) fueron totalmente inmunes al desarrollo de la enfermedad después de un desafío que

consiste en una segunda inyección i.p. (3 a 4 semanas después de la primera inyección). Esto indica que el pez puede montar una respuesta inmune protectora a TiLV.

Ejemplo 9- Reproducción de la enfermedad de la 5 tilapia por convivencia

Para determinar si TiLV es transmisible en un entorno que se asemeja a las condiciones naturales, se realizó un experimento de convivencia en que los peces sin tratamiento convivían con los peces infectados experimentalmente con
10 TiLV como se describe en el Ejemplo 1.

Estos experimentos demostraron claramente que el pez sin tratamiento desarrolló una enfermedad letal, con una tasa de mortalidad similar a la obtenida por vía i.p. pero con cinética más lenta (2 a 3 días de demora en llegar al
15 50% de mortalidad, $P < 0.05$ (Figura 4)). Estos experimentos proporcionan evidencia de la capacidad de TiLV para difundirse a través de una vía transmitidas por el agua.

Ejemplo 10 - Análisis de los datos de Bioinformática

Se obtuvieron datos de Ion Torrent usando como
20 plantilla el ARN cerebral de la tilapia enferma después del agotamiento del ARN ribosomal (dos bibliotecas). Se generaron datos Illumina para nucleasa tratada y las partículas purificada por gradiente de sacarosa obtenidas de las células de cultivo de E11 infectadas (dos
25 bibliotecas). Las bibliotecas de Ion Torrent fueron

preprocesadas con cutadapt (Martin 2011) para eliminar los extremos de baja calidad, cortadas a la longitud máxima de 150 bp y despojadas de las secuencias del adaptador.

Las lecturas de todas las cuatro bibliotecas (2
5 cultivos cerebrales y 2 cultivos celulares) se clasificaron taxonómicamente mediante taxMaps (<https://github.com/nygenome/taxmaps>) por mapeo contra la base de datos del Centro nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), la base de datos de NCBI RefSeq
10 (Pruitt et al. 2012), la secuencia de genoma de la tilapia de referencia (Orenill1.1) y sus correspondientes secuencias de ARNm de la tilapia anotadas (Brawand et al. 2014). Las lecturas no clasificadas (sin mapeo a cualquier secuencia conocida) entonces fueron montadas independientemente
15 usando el ensamblador de VICUNA (Yang et al. 2012). Los cóntigos de cada biblioteca se alinearon con BLAST (Camacho et al. 2009) contra todos los cóntigos de las otras 3 bibliotecas, reteniendo hits con un valor e de $1e-10$ o inferior. El agrupamiento de único vínculo se utilizó para
20 agrupar todos los cóntigos que mostraron cualquier similitud. En el supuesto de que el agente infeccioso debe estar presente en todas las 4 bibliotecas, los 10 racimos de cóntigo se identificaron que contenían al menos un cóntigo de cada una de las 4 bibliotecas.

25 Dentro de cada racimo, los cóntigos se alinearon

entre sí para montarse manualmente para generar la máxima longitud de secuencia después de las duplicaciones en tándem invertidas en los extremos de los cóntigos, resultaron probablemente de artefactos de amplificación, que fueron quitadas. Los ORFs predichos superpuestos en cóntigos de los diferentes montajes fueron utilizados para corregir errores del marco de lectura (que ocurre sobre todo debido a indels en las lecturas del Ion Torrent) y deducir el ORF más largo posible.

Basado en un modelo en donde los segmentos genómicos se prevén que contienen términos conservados, se utiliza una combinación de análisis k-mer, análisis de profundidad de lectura, y conservación manual para construir motivos de secuencia terminal 5' y 3' para refinar las secuencias terminales. El mapeo de las secuencias de consenso final 10 contra los datos de lectura puros iniciales con BWA-MEM (Li 2013) demostraron que el 99% de las lecturas no identificadas de las bibliotecas de Illumina y el 87% de las lecturas no identificadas de las bibliotecas de Ion Torrent mapeadas a las secuencias de consenso.

Ejemplo 11- Caracterización completa del genoma de TiLV

Con base en las secuencias de consenso bioinformática de los cebadores de PCR fueron diseñados y las secuencias contiguas de los 10 racimos amplificados de los ejemplares

de Tilapia infectados. Las secuencias terminales de cada uno de los segmentos de genoma fueron revisadas por amplificación rápida de 5'- y 3'- de los extremos de ADNc (RACE) (Tabla 2). Los análisis análogos por secuenciación de alto rendimiento y amplificación por PCR se realizó en las muestras de la tilapia enferma de Israel y entonces se realizó en las muestras de la tilapia con un síndrome de enfermedad similar de Ecuador. Se obtuvieron las secuencias para todos los 10 segmentos que mostraron una identidad de secuencia de nucleótido mayor al 94% a las secuencias correspondientes de la Tilapia israelí.

Los fragmentos de cada segmento se clonaron en vectores de plásmido para generar sondas para transferencia por adsorción *Nothern*. Se utilizaron tres mezclas de sondas que representan los segmentos 1, 4, 7 y 10 (Combo 1); 3, 6 y 9 (Combo 2); o 2, 5 y 8 (Combo 3) para evitar la superposición de señal de los segmentos de tamaños similares. El ARN total fue extraído de los hígados de la tilapia ecuatoriana enferma y de las células del cultivo infectado con cerebro derivado de TiLV del sobrenadante de cultivo celular o tilapia israelí. La transferencia por adsorción *Nothern* la presencia de todas las 10 secuencias en extractos de ácido nucleico de la tilapia israelíes y ecuatoriana infectada (Figura 5).

Las búsquedas de homología en la base de datos de

secuencia de NCBI rindieron solamente un *hit* para el segmento 1 que indicó una homología muy distante con motivos de polimerasa de ARN dependiente a ARN ortomixoviral (Tabla 2).

5 **Tabla 2** Segmentos de genoma de TiLV

Segmento	# de racimo	Tamaño [nt]	Homología a secuencias conocidas	SEQ ID NO
1	5	1640	dominios de polimerasa PB1 ortomixoviral	7
2	0	1471	ninguna	2
3	7	1371	ninguna	9
4	4	1249	ninguna	6
5	1	1098	ninguna	3
6	2	1044	ninguna	4
7	3	777	ninguna	5
8	9	657	ninguna	11
9	8	549	ninguna	10
10	6	465	ninguna	8

Ejemplo 12- Diagnóstico por PCR

PCR convencional: Los cebadores NM-CLU7-SF1, 5'-AGT TGC TTC TCA YAA GCC TGC TA (SEQ ID NO: 28) y NM-CLU7-SR1, 5'-TCG TGT TCA CAR CCA GGT TTA CTT (SEQ ID NO: 29) fueron
diseñados para amplificar una región de aproximadamente

245-nt del segmento 3 de TiLV (racimo 7, no. de acceso KJ605629). El ADNc del reactivo TRI (Invitrogen) extraído de ARN se sintetizó con Superscript III (Life Technologies) y hexámeros aleatorios de acuerdo con el protocolo del proveedor. El PCR se realizó con Amplitaq Gold (Life Technologies) y los productos de PCR visualizados en geles de agarosa, purificados con el kit de Extracción de Gel Purelink (Invitrogen) y confirmado por especificidad del objetivo por la secuenciación de Sanger en ambas hebras (GeneWiz, NJ). (Figura 6)

PCR en tiempo real cuantitativo: Un ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo para TiLV se estableció dirigido al segmento 1 de TiLV y beta-actina como un control de gen doméstico (ARNm beta-actina de *Oreochromis niloticus*, XM_003443127) (Figura 7). Para ambos ensayos las regiones objetivo respectivas se clonaron en vectores de plásmido usando los cebadores TiLV-CLU5-cF1, 5'-GGT CAA TTC GAG TCA TGC TCG (SEQ ID NO: 30) / TiLV-CLU5-cR1, 5'-GCT GGA CTG CTT TAT AAA TAG CAT AG (SEQ ID NO: 31), or TIL-Actin-cF1, 5'-ATC CTG CGT CTG GAC CTG GCT (SEQ ID NO: 32) / TIL-Actin-cR1, 5'-TGC CAA TGG TGA TGA CCT GTC (SEQ ID NO: 33) para generar estándares de calibración cuantitativa (Figuras 7A y 7B).

El PCR en tiempo real dirigido se realizó usando los siguientes nucleótidos específicos:

segmento 1 de TiLV (racimo 5)

CLU5-ARNm-qF1, 5'-AGC TAT GTT ATC TGG CGC T (SEQ ID NO: 34)

5 CLU5-ARNm-qR1, 5'-GTT GTT ATA CCT ATA GGC ACA T (SEQ ID NO: 35)

CLU5-ARNm-Sonda, FAM-5'-GCC ATT CCA CTC AGC AGA ACG TCT G-TAMRA (SEQ ID NO: 36)

Beta-actina de tilapia

10 TiL-Actina-qF1, 5'-GCG TGA CAT CAA RGA GAA GCT G (SEQ ID NO: 37)

TiL-Actina-qR1, 5'-CCA ATG GTG ATG ACC TGT C (SEQ ID NO: 38)

15 TiL-Actina-Sonda, FAM-5'-CCC TGG AGA AGA GTT ACG AGC TGC-TAMRA (SEQ ID NO: 39)

Como se muestra en la Figura 7C, la detección del TiLV auténtico fue encontrada en varias muestras de tejido de la tilapia enferma de Israel usando PCR en tiempo real con cebadores específicos para TiLV.

REFERENCIAS

- Agius Y Roberts 2003. *J. Fish Dis.* 26:499-509.
- Altschul *et al.* 1997. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-
5 3402.
- Bacharach *et al.* 2000. *J. Virol.* 74:11027-11039.
- Bigarré *et al.* 2010. *J. Fish Dis.* 32:667-673.
- Brawand *et al.* 2014. *Nature* 513:375-81.
- Camacho *et al.* 2009. *BMC Bioinformatics* 10:421.
- 10 Crandell *et al.* 1975. *J. Clin. Microbiol.* 2:465-468.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. Programa de información de especies acuáticas cultivadas, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United
15 Nations, Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. Fisheries and Aquaculture Department. Species fact sheets: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United
20 Nations, Roma, Italia.
- Hasegawa *et al.* 1997. *Fish Pathol.* 32:127-128.
- Hedrick *et al.* 2000. *J. Aquat. Anim. Health* 12:44-57.
- Hutoran *et al.* 2005. *J. Virol.* 79:1983-1991.
- Johnson *et al.* 2008. *Nucleic Acids Res.* 36(Suppl
25 2):W5-W9.

- Laham y Bacharach 2007 *J. Virol.* 81:10687-10698.
- Li 2013. arXiv:1303.3997.
- Martin 2011 *EMBnet.journal* 17:10-12.
- Melamed *et al.* 2004. *J. Virol.* 78:9675-9688.
- 5 Nehls y Boehm 1995. *Trends Genet.* 11:39-40.
- Oberpichler *et al.* 2008. *Environ. Microbiol.* 10:2020-
2029.
- Pruitt *et al.* 2012 *Nucleic Acids Res.* 40:D130-D135.
- Reed y Muench 1938. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- 10 Reynolds 1963. *J. Cell. Biol.* 17:208-212.
- Roberts *et al.* 2012 *Laboratory Methods in Fish
Pathology*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Scotto-Lavino *et al.* 2006a. *Nat. Protoc.* 1:2742-2745.
- Scotto-Lavino *et al.* 2006b. *Nat. Protoc.* 1:2555-2562.
- 15 Shlapobersky *et al.* 2010. *Virology* 399:239-247.
- Yang *et al.* 2012. *BMC Genomics* 13:475.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que tiene una
secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
5 NOs: 1-11.

2. Un ácido nucleico aislado complementario a
una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
NOs: 1-11.

3. Un ácido nucleico aislado que es una
10 variante de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-11 y tiene por lo
menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia a
cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

4. El ácido nucleico aislado de conformidad
con la reivindicación 3, en donde la variante tiene por lo
15 menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%,
aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente
95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%,
aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente
99.5% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

5. Un ácido nucleico aislado que es
20 complementario a una variante de cualquiera de las SEQ ID
NOs; 1-11 y en donde la variante tiene al menos
aproximadamente 60% de identidad de secuencia con las SEQ
ID NOs: 1-11.

6. El ácido nucleico aislado de conformidad

con la reivindicación 5, en donde la variante tiene por lo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%,
5 aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 99.5% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

7. Un ácido nucleico aislado que comprende por lo menos 10 nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
10 NOs: 1-11.

8. Un ácido nucleico aislado que comprende por lo menos 10 nucleótidos complementarios a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-11.

9. El ácido nucleico aislado de conformidad
15 con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el ácido nucleico comprende por lo menos 10 nucleótidos.

10. El ácido nucleico aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el ácido nucleico es ADN.

20 11. El ácido nucleico aislado de conformidad con la reivindicación 10, en donde el ADN es ADNc.

12. El ácido nucleico aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el ácido nucleico es ARN.

25 13. Un polipéptido aislado codificado por el

ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-11.

14. Un polipéptido aislado codificado por un ácido nucleico complementario a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-11.

15. Un polipéptido aislado que está codificado por una variante de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-11, en donde dicha variante tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a las SEQ ID NOs: 1-11.

16. El polipéptido aislado de conformidad con la reivindicación 15, en donde la variante tiene por lo menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 99.5% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

17. Un polipéptido aislado que es codificado por una variante de un ácido nucleico complementario a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs; 1-11, en donde dicha variante tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con el polipéptido codificado por un ácido nucleico complementario a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

18. El polipéptido aislado de conformidad con la reivindicación 17, en donde la variante tiene por lo

menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%,
aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente
97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o
aproximadamente 99.5% de identidad con cualquiera de las
5 SEQ ID NOs: 1-11.

19. Un polipéptido aislado que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

20. Un polipéptido aislado que es una variante
de SEQ ID NO: 112 y tiene por lo menos aproximadamente 80%
10 de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

21. El polipéptido aislado de conformidad con
la reivindicación 21, en donde la variante tiene por lo
menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%,
aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente
15 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o
aproximadamente 99.5% de identidad con la SEQ ID NO: 12.

22. El polipéptido aislado de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 13-21, en donde el
polipéptido comprende por lo menos 8 aminoácidos.

20 23. Un anticuerpo aislado que se une
específicamente a un polipéptido codificado por el ácido
nucleico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que
consiste en SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes.

24. Un anticuerpo aislado que se une
25 específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

25. El anticuerpo aislado de conformidad con las reivindicaciones 26 o 27, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de diagnóstico.

5 26. El anticuerpo aislado de conformidad con las reivindicaciones 26 o 27, en donde el anticuerpo se une al Virus de la Tilapia del Lago o un polipéptido tipo Virus de la Tilapia del Lago e inhibe, neutraliza o reduce la función o actividad del Virus de la Tilapia del Lago o el
10 polipéptido del Virus de la Tilapia del Lago.

27. El anticuerpo aislado de conformidad con las reivindicaciones 26 o 27, en donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

28. El anticuerpo aislado de conformidad con
15 las reivindicaciones 26 o 27, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

29. Una composición inmunogénica que comprende un ácido nucleico del Virus de la Tilapia del Lago.

30. La composición inmunogénica de conformidad
20 con la reivindicación 29, en donde el ácido nucleico del Virus de la Tilapia del Lago comprende el ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

31. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 30, en donde el ácido nucleico del
25 Virus de la Tilapia del Lago comprende por lo menos 24

ácidos nucleicos consecutivos.

32. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 29, en donde el ácido nucleico del Virus de la Tilapia del Lago es sustancialmente idéntico a la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

33. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 29, en donde el ácido nucleico es una variante de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y tiene por lo menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

34. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 33, en donde la variante tiene por lo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 99.5% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

35. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde el ácido nucleico es un ADNc.

36. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido del Virus de la Tilapia del Lago.

37. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36, en donde el polipéptido del Virus

de la Tilapia del Lago es un polipéptido codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

38. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 37, en donde el ácido nucleico
5 comprende por lo menos 24 ácidos nucleicos consecutivos.

39. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36, en donde el polipéptido del Virus de la Tilapia del Lago es un polipéptido codificado por el ácido nucleico que es sustancialmente idéntico al ácido
10 nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

40. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36, en donde el ácido nucleico es una variante de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 y tiene por lo menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia a
15 cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

41. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 40, en donde la variante tiene por lo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente
20 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 99.5% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

42. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36, en donde el polipéptido del Virus
25 de la Tilapia del Lago comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

43. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 42, en donde el polipéptido comprende por lo menos 8 aminoácidos consecutivos.

5 44. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36, en donde el polipéptido es una variante de la SEQ ID NO: 112 y tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

10 45. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 44, en donde la variante tiene por lo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%,
15 aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 99.5% de identidad con la SEQ ID NO: 12.

46. Una composición inmunogénica que comprende un virus muerto que comprende un polipéptido del Virus de la Tilapia del Lago.

20 47. Una composición inmunogénica que comprende un virus atenuado que comprende un polipéptido del Virus de la Tilapia del Lago.

48. La composición inmuniogénica de conformidad con las reivindicaciones 29-47, que además
25 comprende por lo menos un excipiente, aditivo o adyuvante.

49. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26-35 y 37-41, en donde el ácido nucleico es ADNc.

50. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido fusión, donde el polipéptido fusión comprende un polipéptido del Virus de la Tilapia del Lago, un fragmento o variante del mismo y por lo menos un polipéptido o fragmento de un virus adicional.

51. Un método para inducir una respuesta inmune en un animal, el método comprende administrar la composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29-50.

52. Un método para prevenir o reducir una infección Viral de la Tilapia del Lago en un animal, el método comprende administrar la composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29-50.

53. El método de conformidad con las reivindicaciones 51 o 52, en donde la composición inmunogénica se administra por vía oral, por inmersión o por inyección.

54. El uso de la composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29-50 en la fabricación de una vacuna para la prevención o tratamiento del Virus de la Tilapia del Lago en un animal.

55. Una sonda de oligonucleótidos que

comprende de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, en donde por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos contiguos son por lo menos 95% complementarios a una región objetivo de ácido nucleico dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 1-11.

56. La sonda de oligonucleótidos de conformidad con la reivindicación 55, en donde la sonda es por lo menos aproximadamente 95.5%, aproximadamente 96%, aproximadamente 96.5%, aproximadamente 97%, aproximadamente 97.5%, aproximadamente 98%, aproximadamente 98.5%, aproximadamente 99%, aproximadamente 99.5% o aproximadamente 99.9% complementaria con las SEQ ID NOs: 1-11.

57. La sonda de oligonucleótidos de conformidad con la reivindicación 55, que consiste de desde aproximadamente 10 a aproximadamente 33 nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 1-11.

58. La sonda de oligonucleótidos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55-57, en donde el ácido nucleico es ADNc.

59. Un ácido nucleico sintético que comprende por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos del ácido nucleico aislado que tiene la secuencia de ácido nucléico

de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

60. Un ácido nucleico sintético que comprende por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos complementarios al ácido nucleico aislado que tiene la secuencia de ácido
5 nucléico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

61. Un método par determinar la presencia o ausencia del Virus de la Tilapia del Lago en una muestra biológica, el método comprende:

a) contactar el ácido nucleico de una muestra
10 biológica con por lo menos un cebador que es un ácido nucleico sintético de conformidad con la reivindicación 59 o la reivindicación 60;

b) someter el ácido nucleico y el cebador a condiciones de amplificación, y

15 c) determinar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en donde la presencia del producto de amplificación indica la presencia de ARN asociado al Virus de la Tilapia del Lago en la muestra.

62. El método de conformidad con la
20 reivindicación 61, en donde el cebador se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 16, 23-25, 28-31, 34, y 35.

63. El método de conformidad con la reivindicación 61, en donde se utiliza más de un cebador, y
25 los cebadores se seleccionan del grupo que consiste en:

(SEQ ID NO: 23) y (SEQ ID NO: 16); (SEQ ID NO: 24) y (SEQ ID NO: 25); (SEQ ID NO: 28) y (SEQ ID NO: 29); (SEQ ID NO: 30) y (SEQ ID NO: 31); y SEQ ID NO: 34) y (SEQ ID NO: 35).

5 64. Un conjunto de cebador para determinar la presencia o ausencia de TiLV en una muestra biológica, en donde el conjunto de cebador comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico sintético seleccionada del grupo que consiste en:

10 a) un ácido nucleico sintético de la reivindicación 59; y

b) un ácido nucleico sintético de la reivindicación 60.

15 65. El conjunto de cebador de conformidad con la reivindicación 64, en donde los cebadores se seleccionan del grupo que consiste en: (SEQ ID NO: 23) y (SEQ ID NO: 16); (SEQ ID NO: 24) y (SEQ ID NO: 25); (SEQ ID NO: 28) y (SEQ ID NO: 29); (SEQ ID NO: 30) y (SEQ ID NO: 31); y SEQ ID NO: 34) y (SEQ ID NO: 35).

20 66. Un método para determinar si una muestra contiene o no Virus de la Tilapia del Lago, el método comprende:

25 a) contactar una muestra biológica con un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes; y

b) determinar si el anticuerpo se une o no a un antígeno en la muestra biológica, en donde la unión indica que la muestra biológica contiene Virus de la Tilapia del Lago.

5 67. El método de conformidad con la reivindicación 66, en donde la determinación comprende el uso de un ensayo de flujo lateral o ELISA.

10 68. Un método para determinar si una muestra biológica ha sido infectada o no por el Virus de la Tilapia del Lago, el método comprende:

a) determinar si una muestra biológica contiene o no anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus fragmentos y variantes.

15 69. Un RNA de interferencia (ARNi) que comprende una hebra sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la hebra anti-sentido de un gen de un virus que comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos: 1-11.

20 70. Un RNA de interferencia (ARNi) que comprende una hebra anti-sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la hebra sentido de un gen de un virus que comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos:

25

1-11.

71. Un método para reducir los niveles de una proteína viral de la Tilapia del Lago en un animal, ARNm viral en un título animal o viral en una célula de un animal, el método comprende administrar al animal un ARNi de conformidad con las reivindicaciones 69 y 70.

72. El método de conformidad con la reivindicación 71, que además comprende administrar conjuntamente un segundo agente de ARNi al animal, en donde el segundo agente de ARNi comprende una hebra sentido que tiene por lo menos 15 o más nucleótidos contiguos complementarios a un segundo gen o segmento genético del Virus de la Tilapia del Lago que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos: 1-11 y una hebra anti-sentido que tiene por lo menos 15 o más nucleótidos contiguos complementarios a la hebra sentido.

73. Un virus aislado que comprende por lo menos 24 nucleótidos consecutivos del ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

74. Un virus aislado que comprende por lo menos 8 aminoácidos consecutivos de un polipéptido codificado por el ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

75. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11.

76. Un método para probar un agente para la prevención y/o el tratamiento del Virus de la Tilapia del Lago, que comprende:

- a) contactar las células con el agente;
- b) contactar las células con el Virus de la Tilapia del Lago; y
- c) medir el número de células infectadas con el Virus de la Tilapia del Lago,

en donde si el número de células infectadas con el Virus de la Tilapia del Lago se reduce o es menor después del contacto con el agente, el agente es un agente preventivo y/o terapéutico para el Virus de la Tilapia del Lago.

77. Un método para probar un agente para la prevención y/o el tratamiento del Virus de la Tilapia del Lago, que comprende:

- a) contactar las células con el Virus de la Tilapia del Lago;
- a) contactar las células con el agente; y
- c) medir la replicación del Virus de la Tilapia del Lago,

en donde si la replicación del Virus de la

Tilapia del Lago es menor después del contacto con el agente, el agente es un agente preventivo y/o terapéutico para el Virus de la Tilapia del Lago.

5 78. Un kit para la detección del Virus de la Tilapia del Lago, que comprende (a) por lo menos un cebador que comprende un ácido nucleico aislado que tiene la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11 para amplificar ácidos nucleicos obtenidos de una muestra biológica y, opcionalmente, (b) cebadores o
10 adaptadores adecuados para permitir la secuenciación del ácido nucleico amplificado y la determinación de la presencia del Virus de la Tilapia del Lago.

79. El kit de conformidad con la reivindicación 78, en donde el cebador se elige del grupo que consiste en:
15 SEQ ID NOs: 16, 23-25, 28-31, 34, y 35.

80. El kit de conformidad con la reivindicación 78, que comprende más de un cebador, y en donde los cebadores se eligen del grupo que consiste en: (SEQ ID NO: 23) y (SEQ ID NO: 16); (SEQ ID NO: 24) y (SEQ ID NO: 25);
20 (SEQ ID NO: 28) y (SEQ ID NO: 29); (SEQ ID NO: 30) y (SEQ ID NO: 31); y SEQ ID NO: 34) y (SEQ ID NO: 35).

81. Un kit para la detección del Virus de la Tilapia del Lago que comprende por lo menos dos oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ácido
25 nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-11, sus

fragmentos y variantes, en un formato de micromatriz para identificar el Virus de la Tilapia del Lago.

5

10

15

RESUMEN

La invención se dirige al Virus de la Tilapia del Lago aislado o TiLV, y las secuencias y polipéptidos de ácido nucleico aislado del mismo. La invención también se refiere a sondas y cebadores, y a anticuerpos contra antígenos del TiLV, y el uso de estos reactivos para detectar la presencia o ausencia de TiLV en un animal. La invención también se refiere a ARNs que se dirigen a secuencias de ácido nucleico de TiLV. La invención también se refiere a composiciones inmunogénicas, incluyendo anticuerpos y vacunas, para inducir una respuesta inmune contra TiLV en un animal. La invención también se refiere a construcciones genéticas y células que comprenden TiLV y secuencias de ácidos nucleicos aislados y polipéptidos de las mismas para su uso en el desarrollo de agentes profilácticos y terapéuticos.

20

25