

VIRUS DE LA TILAPIA DE TIPO ORTOMIXO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Se reclama el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 62/276,873, presentada el 10 de enero de 2016 y 62/352,570, presentada el 21 de junio de, 2016, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

CAMPO

Esta descripción se refiere al aislamiento y la caracterización de un virus de ARN de pez recientemente descubierto. Por lo tanto, existen métodos para la detección del virus aislado, una vacuna de virus vivo atenuado y una vacuna de virus inactivado.

ANTECEDENTES

La Tilapia es el nombre común de aproximadamente 100 especies de peces cíclidos tropicales que son el segundo pez globalmente más cultivado. Con base en informes de la Asociación de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO por sus siglas en inglés), la Tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, es una de las principales especies de Tilapia cultivadas para consumo, alcanzando una producción global de 3.2 millones de toneladas (mt) en 2012 (FAO). La *Tilapia sp.* se cultiva en países de clima cálido, siendo Israel uno de sus puntos de distribución más septentrionales.

Según el Ministerio de Agricultura de Israel, en Israel se consumen 7,662 toneladas de Tilapia por año, lo que representa el 43% del consumo total de pescado de agua dulce. En las últimas dos décadas, la producción de peces Tilapia en el valle de Beit She'an aumentó de 1,600 toneladas a 5,700 toneladas por año.

En el mes de agosto de 2009, los piscicultores informaron de ocurrencias repentinas de alta mortalidad entre la Tilapia en la región del valle de Beit She'an. En la Tilapia gris híbrida; las tasas de mortalidad general alcanzaron 30%-40%. El daño a la producción de híbridos de Tilapia roja es más dramático, llegando al 100% en algunos de los estanques de peces. Se observó mortalidad en peces juveniles y adultos tanto en estanques de crecimiento como de reserva. En los peces juveniles, los eventos de mortalidad se caracterizaron por una pérdida inicial de apetito, la observación de peces débiles en el borde del estanque, la presencia elevada de aves depredadoras y, en última instancia, la mortalidad de los peces a diferentes tasas. Se detectó una presencia elevada de parásitos conocidos y el tratamiento pareció mitigar parte de la pérdida. En los peces más grandes, la pérdida de apetito y el letargo son evidentes y las altas tasas de mortalidad durante

varios días son seguidas por una recuperación de la población de peces. Las pruebas de diagnóstico para la presencia del virus de la Necrosis Nerviosa fueron negativas.

Durante el verano de 2010, los informes de mortalidad de la Tilapia comenzaron en junio tanto en el valle de Beit She'an como en las áreas costeras del Mediterráneo. Las pérdidas predominantes siguieron a la inversión sexual y el crecimiento inicial. Las pruebas en el *Fish Health Center* en Nir-David no pudieron generar un modelo de enfermedad ni pudieron caracterizar un agente etiológico. Los eventos epizooticos inexplicados continuaron durante los veranos de 2011 y 2012. El análisis estadístico inicial de los eventos de mortalidad en 2011 y 2012 no reveló una correlación significativa entre la presencia de parásitos y la mortalidad en las granjas de Tilapia. Los parásitos identificados variaron por especie y, por lo tanto, no pudieron explicar los eventos epizooticos. Además, se sabe que los parásitos pueden ser un patógeno secundario y no la principal causa de mortalidad. No se observó una correlación significativa para la presencia de bacterias y eventos de mortalidad. Además, el inicio de la enfermedad y los signos clínicos no se conocían de los patógenos virales de Tilapia.

Por lo tanto, existe una necesidad para determinar el agente causal de los recientes eventos epizooticos de la Tilapia.

BREVE DESCRIPCIÓN

Se proporciona un virus de la Tilapia aislado (TLV por sus siglas en inglés) depositado en el CNCM (Instituto Pasteur) como número de acceso CNCM I-4892.

También se proporcionan virus tipo ortomixto aislados que tienen un genoma compuesto por secuencias de ácido nucleico por lo menos 90% idénticas a cada una de SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24.

Se describe además secuencias de ácido nucleico que comprenden un ácido nucleico por lo menos 90% idéntico a un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs 25-48.

La presente divulgación también describe métodos para detectar una infección por virus de la Tilapia (TLV), que incluyen aislar una muestra de un sujeto sospechoso de estar infectado por TLV; generar un molde de ADNc a partir de la muestra; y amplificar un ácido nucleico a partir del molde de ADNc utilizando por lo menos un cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de ácido nucleico por lo menos 90% idéntica a por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 25-48, en donde la amplificación de una secuencia de ácido nucleico con el cebador indica la presencia de TLV en la muestra.

Los virus de la Tilapia aislados atenuados y aislados inactivados (TLV) también se describen en el presente. En particular, cualquiera de las composiciones de virus aislado incluye también un adyuvante.

Adicionalmente, se proporcionan kits para detectar TLV, que incluyen los ácidos nucleicos descritos, y métodos de vacunación de un sujeto contra TLV a través del uso de los virus aislados inactivados o atenuados.

La descripción que antecede y otros objetos, características y ventajas serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, la cual procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una micrografía electrónica (EM por sus siglas en inglés) de células de Tilapia infectadas el día 5 después de la infección. Las células presentan desintegración de compartimentos y organelos celulares. Las vacuolas citoplásmicas contienen una gran cantidad de estructuras tipo virus que varían en tamaño y morfología (flechas, panel derecho).

La Figura 2 muestra células de aleta Tilapia (TFC por sus siglas en inglés) no infectadas (panel superior) e infectadas (panel inferior) mantenidas a 15°C-33°C. Las células infectadas a 15°C exhiben morfología normal sin CPE evidente. A 23°C-33°C las células exhiben vacuolización citoplasmática y el redondeo de las células que eventualmente causan la mortalidad del cultivo celular.

La Figura 3 es un análisis filogenético del cóntigo 4 de TLV que se asemeja a la ARN polimerasa PB1 del virus ortomixo. Utilizando el software de alineamiento de secuencias TREX-MAFFT, se ensambló un árbol filogenético, comparando las secuencias conocidas de aminoácidos del virus Ortomixo PB1 a la del TLV.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la generación de mutación en TLV a través de irradiación sub-letal. El TLV se irradió a dosis crecientes de UV y la infectividad residual se determinó mediante titulación viral en placas de 96 micropocillos, como se muestra en el gráfico. En la dosis más alta en donde la infectividad residual se mantuvo y se propagó.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el perfil de seguridad de dos clones de TLV atenuados en comparación con un grupo tratado con placebo.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la eficacia de los prototipos de vacunas cuando se los desafía con una dosis letal de TLV de tipo natural mediante inyección IP.

La Figura 7 es un gel de electroforesis que muestra la detección de TLV usando cebadores de Con19, en cultivos infectados y que demuestra que TLV tiene genoma de ARN

expresado que no pasa a través de una etapa de ADN durante su ciclo de propagación. La especificidad de Con19 como un cóntigo viral. Los cebadores Con19 (carriles 1-5) o los cebadores TL-NA endógenos de control de Tilapia (carriles 6-10) se ensayaron usando ADN o ARN extraído de TFC infectadas y no infectadas. Se usó ARN para generar ADNc total utilizando el Mini Kit Aurum Total RNA (BIO-RAD Cat No. 732-6820). La distribución de carril es de la siguiente manera: MW: escala de ADN de 100 pb; 1: ADNc de TFC infectadas ensayadas con cebadores de Con19; 2: ADNc de TFC no infectadas ensayadas con cebadores de Con19; 3: Fragmento viral de Con19 clonado en un plásmido ensayado con cebadores Con19; 4: ADN de TFC infectadas ensayadas con cebadores de Con19; 5: ADN de TFC no infectada ensayada con cebadores de Con19; 6: ADNc de TFC infectadas ensayadas con TL-NA (control endógeno); 7: ADNc de TFC no infectadas ensayadas con TL-NA (control endógeno); 8: ADN de TFC infectadas ensayadas con TL-NA (control endógeno); 9: ADN de TFC no infectadas ensayadas con TL-NA (control endógeno); 10: Control negativo: ambos conjuntos de cebadores fueron probados en una reacción sin modelo.

La Figura 8 es un gel de electroforesis que muestra el uso de Con4 como herramienta de diagnóstico para identificar TLV de peces infectados. El TLV se identifica fácilmente tanto en peces infectados experimentalmente como en epizootias de campo. El ARN fue extraído de cerebros de peces y sirvió como modelo para RT-PCR usando cebadores Con4 (panel superior) o un marcador endógeno de Tilapia (TL-NA) como control (panel inferior). Carriles 1-19: Tilapia Sin Tratamiento se inyectó con TLV y cohabitó con peces no expuestos. Durante un período de observación de 26 días se recolectaron los peces enfermos/muertos y se mantuvieron a -80°C para su posterior evaluación. Carril 20: peces enfermos muestreados durante una epizootia en una granja de Tilapia en Israel. Carril 21: Peces saludables recolectados de la misma granja. MW - marcador molecular de 100bp, control negativo - NC, agua utilizada como modelo, control positivo de PC, ARN extraído de TFC infectadas con TLV.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la mortalidad acumulada de los peces de Tilapia desafiados a través de inyección IP con TLV virulento cuando fueron vacunados con preparaciones inactivadas de TLV como se muestra en la figura. La mortalidad acumulada de peces Tilapia desafiados a través de vacunación IP con TLV virulento, 28 días después de la vacunación IP con: x - Medio de células TFC no infectadas, x - Pescado sin tratamiento, Δ - TLV inactivado con formalina en emulsión con adyuvante incompleto de Freund - IFA (1:1), $\diamond$ - TLV inactivado con formol, y $\bullet$ - emulsión que contiene placebo – Medio de células no infectadas con adyuvante incompleto de Freund - IFA (1:1).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DESCRITAS

Los suplementos de secuencias de ácido nucleico y/o amino ácidos aquí proporcionados se muestran usando de letras estándar para bases de nucleótidos y códigos de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.FR 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida en cualquier referencia a la cadena mostrada. Como se describe en el presente:

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de cóntigo 4.

SEQ ID NO: 2 es la traducción conceptual de cóntigo 4.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de cóntigo 7.

SEQ ID NO: 4 es la traducción conceptual de cóntigo 7.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de cóntigo 5.

SEQ ID NO: 6 es la traducción conceptual de cóntigo 5.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de cóntigo 6.

SEQ ID NO: 8 es la traducción conceptual de cóntigo 6.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de cóntigo 8.

SEQ ID NO: 10 es la traducción conceptual de cóntigo 8.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de cóntigo 14.

SEQ ID NO: 12 es la traducción conceptual de cóntigo 14.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de cóntigo 15.

SEQ ID NO: 14 es la traducción conceptual de cóntigo 15.

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de cóntigo 12.

SEQ ID NO: 16 es la traducción conceptual de Cóntigo 12.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de cóntigo 16.

SEQ ID NO: 18 es la traducción conceptual de cóntigo 16

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de cóntigo 20.

SEQ ID NO: 20 es la traducción de la fase conceptual 1 de cóntigo 20.

SEQ ID NO: 21 es la traducción conceptual de la fase 2 de cóntigo 20.

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de cóntigo 21.

SEQ ID NO: 23 es la traducción conceptual de Cóntigo 21.

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de cóntigo 19.

SEQ ID NOs. 25 y 26 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 4.

SEQ ID NOs. 27 y 28 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 7.

SEQ ID NOs. 29 y 30 son cebadores directos e inversos específicos de Cóntigo 5.

SEQ ID NOs. 31 y 32 son cebadores directos e inversos específicos de Cóntigo 6.

SEQ ID NOs. 33 y 34 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 8.

SEQ ID NOs. 35 y 36 son cebadores directos e inversos específicos de Cóntigo 14.

SEQ ID NOs. 37 y 38 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 15.

SEQ ID NOs. 39 y 40 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 12.

5 SEQ ID NOs. 41 y 42 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 16.

SEQ ID NOs. 43 y 44 son cebadores hacia adelante y reverencia específicos para cóntigo 20.

SEQ ID NOs. 45 y 46 son cebadores directos e inversos específicos para cóntigo 21.

SEQ ID NOs. 47 y 48 son cebadores directos e inversos específicos para Cóntigo 19.

10 SEQ ID NO: 49 es una secuencia del segmento 4 mutada de un TLV atenuado.

SEQ ID NO: 50 es una secuencia del segmento 5 mutada de un TLV atenuado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 I. Abreviaturas

TFC células de aletas de Tilapia

TLV virus de la Tilapia

II. Términos

20 A menos que se explique lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente tienen el mismo significado que el que entiende una persona con conocimientos medios en la materia a la que pertenece esta divulgación. Los términos singulares “un”, “uno”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra “o” tiene la intención de incluir “y” a menos que el contexto

25 indique claramente lo contrario. Se entiende además que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o los polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para descripción. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden utilizar en la práctica o en pruebas de esta divulgación, los métodos y materiales adecuados se describen

30 más adelante. El término “que comprende” significa “que incluye”. La abreviatura “e.g.” se deriva de *exempli gratia* en Latín, y se utiliza para indicar un ejemplo no limitativo. Por lo tanto, la abreviatura “e.g.” es sinónimo del término “por ejemplo”.

En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo las explicaciones de los términos, controlará. Además, todos los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Administración: la introducción de una composición en un sujeto por una vía elegida.

5 La administración de un compuesto activo o composición, tal como una cepa de vacuna de TLV atenuada, puede ser por cualquier vía conocida por el experto en la materia. La administración puede ser local o sistémica.

Amplificación: Cuando se usa en referencia a un ácido nucleico, cualquier técnica que aumente el número de copias de una molécula de ácido nucleico en una muestra o espécimen.

10 Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en todas sus variaciones actualmente practicadas, en la que una muestra biológica recolectada de un sujeto se pone en contacto con un par de cebadores oligonucleotídicos, en condiciones que permiten la hibridación de los cebadores a modelo de ácido nucleico en la muestra. Los cebadores se extienden en condiciones adecuadas, se disocian del modelo, y luego se reasocian, extienden y disocian para
15 amplificar el número de copias del ácido nucleico. El producto de la amplificación *in vitro* se puede caracterizar por electroforesis, patrones de escisión por endonucleasas de restricción, hibridación o ligación de oligonucleótidos y/o secuenciación de ácidos nucleicos, usando técnicas estándar. Los ejemplos no limitantes de PCR incluyen RT-PCR y qPCR. Otros ejemplos de técnicas de amplificación *in vitro* incluyen la amplificación de desplazamiento de cadena (véase la Patente
20 Estadounidense No. 5,744,311); amplificación isotérmica libre de transcripción (véase la Patente Estadounidense No. 6,033,881); reparar la amplificación de la reacción en cadena (ver WO 90/01069); amplificación de la reacción en cadena de la ligasa (véase EP-A-320308); amplificación de la reacción en cadena de la ligasa que llena el hueco (véase la Patente Estadounidense No. 5,427,930); detección de ligasa y PCR acopladas (véase la Patente Estadounidense No. 6,027,889);
25 y amplificación libre de transcripción de ARN de NASBA™ (véase la Patente Estadounidense No. 6,025,134).

Animal: Organismos vivos vertebrados multicelulares, una categoría que incluye, por ejemplo, peces, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término sujeto incluye tanto sujetos humanos como veterinarios, por
30 ejemplo, humanos, primates no humanos, peces, perros, gatos, caballos y vacas. De manera similar, el término “sujeto” incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, tales como peces.

Virus atenuado: un virus que ha sido alterado para reducir o eliminar su virulencia. Los virus atenuados están “vivos”, pero tienen una capacidad reducida o interrumpida para dañar o matar las células hospederas y, por lo tanto, causar una patología asociada al virus.

Muestra Biológica: Cualquier muestra que pueda ser obtenida directa o indirectamente de un organismo, incluyendo sangre total, plasma, suero, lágrimas, moco, saliva, orina, fluido pleural, fluido cefalorraquídeo, fluido gástrico, sudor, semen, secreción vaginal, esputo, fluido de úlceras y/u otras erupciones superficiales, ampollas, abscesos, tejidos, células (tales como fibroblastos, células mononucleares de sangre periférica o células musculares), organelos (tales como mitocondrias), órganos y/o extractos de tejidos, células (tales como fibroblastos, células mononucleares de sangre periférica o células musculares), organelos (tales como mitocondrias) u órganos. Una muestra biológica también puede ser una muestra de investigación de laboratorio tal como un sobrenadante de cultivo celular. La muestra se recolecta o se obtiene usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. En la presente divulgación actual, “muestra biológica” se usa intercambiabilmente con “muestra”.

ADNc (ADN complementario): Una porción de segmentos de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras de la transcripción. El ADNc también puede contener regiones no traducidas (UTRs) que son responsables del control de la traducción en la molécula de ARN correspondiente. El ADNc se sintetiza en el laboratorio mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de las células.

Complementario: Una cadena de ADN o ARN bicatenario de dos cadenas complementarias de pares de bases. El enlace complementario se produce cuando la base de una molécula de ácido nucleico forma un enlace de hidrógeno a la base de otra molécula de ácido nucleico. Normalmente, la base adenina (A) es complementaria a timidina (T) y uracilo (U), mientras que la citosina (C) es complementaria a la guanina (G). Por ejemplo, la secuencia 5'-ATCG-3' de una molécula de ADNss puede enlazarse a 3'-TAGC-5' de otro ADNss para formar un ADNds. En este ejemplo, la secuencia 5'-ATCG-3' es el complemento inverso de 3'-TAGC-5'. De forma similar, el ADNc producido a partir de la molécula de ARNss será el complemento inverso de la secuencia de ARN.

Contacto: Colocación en asociación física directa. Incluye ambos, en forma sólida y líquida. El contacto puede ocurrir *in vitro* con células aisladas o *in vivo* mediante la administración a un sujeto.

Detectar: Determinar si un agente (tal como una señal o una muestra de ácido nucleico de nucleótido particular, aminoácido o proteína, por ejemplo, una proteína o ácido nucleico de TLV) está presente o ausente. En algunos ejemplos, esto puede incluir además la cuantificación.

Diagnóstico: El proceso de identificar una enfermedad, por sus signos, síntomas y resultados de varias pruebas y métodos, por ejemplo, los métodos divulgados en el presente documento.

Fluoróforos: Un compuesto químico que, cuando se estimula por exposición a un estímulo particular, busca una longitud de onda de luz definida, emite luz (fluorescencias), por ejemplo a una longitud de onda diferente (tal como una longitud de onda de luz más larga).

Los fluoróforos son parte de la clase más grande de compuestos luminiscentes. Los compuestos luminiscentes incluyen moléculas quimioluminiscentes, que no requieren una longitud de onda particular de luz para la luminiscencia, sino que usan una fuente química de energía. Por lo tanto, el uso de moléculas quimioluminiscentes (tal como la aequorina) puede eliminar la necesidad de una fuente externa de radiación electromagnética, tal como un láser. Los ejemplos de fluoróforos particulares que se pueden usar en las sondas y cebadores se proporcionan en la patente estadounidense No. 5,866,366 de Nazarenko *et al.*, tal como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5- (2'-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino N- [3-vinilsulfonil] fenil] naftalimida-3,5-disulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, amarillo brillante, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino 4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcoumarina (Coumaran 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5'-dibromopirogallol-sulfoneftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidrotilben-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftalenos-1-sulfonilo (cloruro de dansilo); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales isotiocianato de asosina y eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de malaquita verde; 4-metilumbeliferona; ortocresoltaleína nitrotirosinas; pararosanilina; fenol rojo; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Rojo Reactivo 4 (Cibacron™ Rojo Brillante 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de risamida B, cloruro de lisamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforodamina B, sulforodamina 101 y derivados de cloruro de sulfonilo de sulforodamina 101 (Rojo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi rodamina (TAMRA); tetrametilo rodamina; isotiocianato de tetrametilo rodamina (TRITC); riboflavina; derivados del ácido rosólico y del quelato de terbio; Rojo LightCycler 640; Cy5.5; y Cy56-carboxifluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); difluoruro de dipirrometeo de boro (BODIPY); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi rodamina (TAMRA); acridinas, estilbeno, -6-carboxi-

fluoresceína (HEX), TET (tetrametil fluoresceína), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), Rojo Texas, 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), Cy3, Cy5, VIC® (*Applied Biosystems*), Rojo LC 640, Rojo LC 705, amarillo Yakima, entre otros.

Virus inactivado: Un virus que ha sido inactivado o “matado” para eliminar su virulencia. Aunque no es infeccioso, las partículas de virus inactivado pueden provocar una respuesta inmune y pueden formar la base de una vacuna. Los métodos no limitantes de inactivación viral incluyen calor, exposición a rayos UV o medios químicos, tales como la exposición a formaldehído (formalina).

Aislado: Un componente biológico (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína u organelo) que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se produce de forma natural, es decir, otras proteínas y organelos de ADN y ARN cromosómico y extracromosómico. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han **aislado** incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas utilizando métodos de purificación estándar. El término también describe ácidos nucleicos y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedera así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Marcador: Un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente con otra molécula para facilitar la detección de esa molécula. Ejemplos específicos, no limitantes de marcadores incluyen isótopos radiactivos (tales como: S^{35} y P^{32}), sustratos de enzima, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas.

Oligonucleótidos: Una pluralidad de nucleótidos unidos por enlaces enlaces fosfodiéster nativos, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido análogo se refiere a fracciones que funcionan similar a los oligonucleótidos pero tienen porciones de ocurrencia no natural. Los oligonucleótidos particulares y análogos de oligonucleótidos pueden incluir secuencias lineales de hasta 300 nucleótidos de longitud, por ejemplo, una secuencia (tal como ADN o ARN) que es por lo menos 6 bases, por ejemplo, por lo menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 o incluso 200 o 300 bases de longitud, desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 50 bases, por ejemplo aproximadamente 10-25 bases, tal como 12, 15 o 20 bases.

Ortomixoviridae: Una familia de virus de ARN, que incluye el virus de la influenza. La caracterización y secuenciación del virus de TLV descrita en el presente indica un ortomixovirus. La *Ortomixoviridae* puede tener cápsides filamentosas o esféricas. Su genoma de ARN está segmentado y se transcribe y replica mediante ARN polimerasas dependientes de ARN codificadas por virus.

Sondas y cebadores: Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos se pueden preparar fácilmente basándose en las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en esta invención. Una sonda comprende un ácido nucleico aislado unido a un marcador detectable o molécula reportera. Los marcadores típicos incluyen isótopos radiactivos, sustratos de enzimas, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas.

Los cebadores son moléculas de ácido nucleico cortas, preferiblemente oligonucleótidos de ADN de 10 nucleótidos o más de longitud. Los cebadores se pueden adaptar a una cadena de ADN complementaria objetivo mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN objetivo, y después el cebador extenderse a lo largo de la cadena de ADN objetivo por una enzima de ADN polimerasa. Los pares de cebadores pueden usarse para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante PCR u otros métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la materia.

Purificado: El término **purificado** no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de proteína purificada es aquella en la que la proteína se denomina proteína pura en su entorno natural dentro de una célula.

PCR cuantitativa en tiempo real: Método para detectar y medir los productos generados durante cada ciclo de una PCR, cuyos productos son proporcionales a la cantidad de ácido nucleico templado presente antes del inicio de la PCR. La información obtenida, tal como una curva de amplificación, se puede usar para cuantificar las cantidades iniciales de la secuencia de ácido nucleico.

Identidad de secuencia: La similitud entre dos secuencias de ácido nucleico, o dos secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de similitud entre las secuencias, referidas de otra manera como identidad de secuencia. La identidad de secuencia a menudo se mide en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias.

Vacuna: Una composición que induce a un sujeto a adquirir protección inmune contra un agente específico causante de enfermedades (patógeno), tal como un virus o bacteria. Las vacunas pueden incluir, entre otros, fragmentos antigénicos del patógeno, que a su vez inducen la respuesta inmune en el sujeto. Otros ejemplos de vacunas incluyen vacunas vivas atenuadas o muertas en las que el patógeno en sí es la base de la vacuna. La vacuna descrita en este documento es una cepa de TLV atenuada viva. La **vacunación** es el proceso de proporcionar una vacuna, y por lo tanto protección, a un sujeto contra un patógeno. Una vacuna es un tipo ejemplar de composición inmunogénica.

Virus: Organismo infeccioso microscópico que reproduce células vivas internas. Un virus consiste esencialmente en un núcleo de un solo ácido nucleico rodeado por un recubrimiento de proteína, y tiene la capacidad de replicarse solo dentro de una célula viva. La “replicación viral” es la producción de virus adicional por la aparición de por lo menos un ciclo de vida viral. Un virus puede alterar las funciones normales de las células hospederas, haciendo que la célula se comporte de la manera determinada por el virus. Por ejemplo, una infección viral puede dar como resultado que una célula produzca una citocina, o que responda a una citocina, cuando la célula no infectada normalmente no lo hace.

Virión: Una partícula viral completa que incluye elementos de envoltura, cápside y ácido nucleico.

III. Descripción General de Diversas Modalidades

Se describe en un virus aislado de Tilapia (TLV) depositado en el CNCM (Instituto Pasteur) como número de acceso CNCM I-4892.

También se describen virus tipo ortomixovirus aislados que tienen un genoma que comprende secuencias de ácido nucleico con por lo menos 90% de identidad con cada una de SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24.

Además, se describen en el presente ácidos nucleicos aislados que comprenden un ácido nucleico por lo menos 90% idéntico a un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID Nos 25-48.

En modalidades particulares, el ácido nucleico comprende además un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente, un marcador radioactivo o un marcador químico.

La presente divulgación describe también métodos para detectar una infección por el virus de la Tilapia (TLV), que incluyen el aislamiento de una muestra de un sujeto sospechoso de estar infectado por TLV; generar un molde de ADNc a partir de la muestra; y amplificar un ácido nucleico a partir del molde de ADNc utilizando por lo menos un cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de ácido nucleico por lo menos 90% idéntica a por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 25-48, en donde la amplificación de una secuencia de ácido nucleico con el cebador indica la presencia de TLV en la muestra.

En modalidades particulares de los métodos de detección aquí descritos, la amplificación se lleva a cabo con por lo menos un par de cebadores que tienen secuencias por lo menos 90% a los pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOs 25 y 26; SEQ ID NOs 27 y 28; SEQ ID NOs 29 y 30; SEQ ID NOs 31 y 32; SEQ ID NOs 33 y 34; SEQ ID

NOs 35 y 36; SEQ ID NOs 37 y 38; SEQ ID NOs 39 y 40; SEQ ID NOs 41 y 42; SEQ ID NOs 43 y 44; SEQ ID NOs 45 y 46; y SEQ ID NOs 47 y 48.

La presente divulgación también incluye kits para la detección de una infección por virus de la Tilapia (TLV), que contienen por lo menos uno de los ácidos nucleicos aislados descritos.

En modalidades particulares, los kits contienen por lo menos un ácido nucleico aislado que es por lo menos un par de cebadores de oligonucleótidos por lo menos 90% idénticos a los pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOs 25 y 26; SEQ ID NOs 27 y 28; SEQ ID NOs 29 y 30; SEQ ID NOs 31 y 32; SEQ ID NOs 33 y 34; SEQ ID NOs 35 y 36; SEQ ID NOs 37 y 38; SEQ ID NOs 39 y 40; SEQ ID NOs 41 y 42; SEQ ID NOs 43 y 44; SEQ ID NOs 45 y 46; y SEQ ID NOs 47 y 48.

En modalidades particulares, el kit incluye además un marcador detectable, que, en modalidades particulares, puede usarse en combinación con por lo menos uno de los ácidos nucleicos aislados en el kit.

Los virus de la Tilapia inactivos (TLV) aislados atenuados y aislados inactivados también se describen en el presente.

Además, se describe un virus de la Tilapia (TLV) atenuado aislado producido por el proceso de pasar el TLV a través de las células de Tilapia por lo menos 10 veces, irradiando el TLV a una dosis de radiación subletal; y aislar un clon atenuado infeccioso. En modalidades particulares, el TLV atenuado aislado se pasa por lo menos 20 veces a través de las células de Tilapia. En otras modalidades particulares, la dosis de radiación subletal se encuentra entre 3.2-6.8 mJ/cm², tal como 6.8 mJ/cm². Un TLV atenuado aislado ejemplar proporcionado en el presente se depositó en el CNCM (Instituto Pasteur) como Acceso no. CNCM I-5075.

En modalidades particulares, las cepas de TLV aisladas atenuadas o inactivadas descritas en el presente son parte de una composición inmunogénica, tal como composiciones que también incluyen un coadyuvante.

La presente descripción describe adicionalmente métodos para vacunar a un sujeto contra una infección por el virus de la Tilapia (TLV). En modalidades particulares, la vacunación incluye infectar a un sujeto con los TLV aislados atenuados o inactivados descritos. En otras modalidades, la vacunación incluye administrar a un sujeto una composición inmunogénica que comprende los TLV aislados atenuados o inactivados descritos.

IV. Virus de la Tilapia y Métodos para su Detección

A partir de 2009, los piscicultores del norte de Israel observaron enfermedades y una alta mortalidad entre las Tilapias en sus granjas. Estos eventos han continuado en cada verano

sucesivo. Se describe en el presente el aislamiento y la caracterización del agente causal de la enfermedad y los eventos de mortalidad, un virus tipo ortomixovirus recientemente descubierto que se llama virus de la Tilapia (TLV).

La caracterización primaria del TLV indica un virus de ARN esférico pleomórfico, que se propaga de una manera dependiente de la temperatura entre 23°C-33°C. El virus se ha cultivado a una titulación mayor y se depositó el 15 de junio de 2014 en el CNCM (Instituto Pasteur) bajo Acceso No. CNCM I-4892.

El análisis genómico revela un genoma de ARN segmentado con casi ninguna homología con las secuencias en la base de datos de GenBank. Sin embargo, el análisis de BlastX también mostró que el cóntigo 4 de TLV (establecido como SEQ NO: 1) incluye un dominio putativo conservado de la subunidad PB1 de la RNA polimerasa dependiente del ARN de la influenza.

Las secuencias cóntigo se han determinado a partir del TLV, establecidas en el presente como SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24.

En modalidades particulares, el TLV descrito contiene un genoma que tiene una secuencia idéntica a las secuencias establecidas como SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24. Sin embargo, se aprecia que la variación genómica de las secuencias de TLV descritas existirán en diferentes TLV aislados. Por consiguiente, en modalidades particulares, el TLV aislado descrito tiene un genoma en el que cualquiera de los cóntigos puede ser menos de 100% idénticos a las secuencias establecida como SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24. Dichas secuencias pueden ser por lo menos del 99%, 95%, 90%, 85%, 80% o incluso menos idénticas a una o más de las secuencias de cóntigo descritas.

Las secuencias genómicas aisladas pueden producirse sintéticamente tal como se describe o como ADN (por ejemplo, ADNc) o como fragmentos más cortos de ARN o ADN de las secuencias descritas en el presente. Los usos no limitados de tales fragmentos incluyen sondas y cebadores para su uso en cualquier método conocido en la materia para la detección de virus en una muestra. En modalidades particulares, los fragmentos (que pueden ser sondas) pueden ser por lo menos 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70% o incluso menos idénticos al complemento inverso de la secuencia de cóntigo a detectar. De manera similar, una sonda aislada para su uso en la detección de TLV puede ser 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, cualquier porcentaje intermedio, o incluso menor en longitud en comparación con la secuencia a detectar. Por ejemplo, el cóntigo 4 (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 1620 nucleótidos (nt). Una sonda aislada descrita del cóntigo 4 puede, por lo tanto, ser idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, pero puede ser significativamente más corta en longitud, tal como 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 nt de longitud o cualquier longitud

intermedia. Por ejemplo, en otras modalidades, un ácido nucleico aislado que puede usarse como una sonda para el cóntigo 4 (SEQ ID NO: 2) puede tener una longitud de 35-1620 nt, tal como 50-1600 nt, 1000-1600 nt, 500-1500, 750-1200 nt, y cualquier longitud intermedia. Se entiende que pueden usarse fragmentos de ácido nucleico aislados, que incluyen fragmentos de ADN o ARN, de cada una de las secuencias de cóntigo que pueden usarse similarmente como una secuencia de sonda para el cóntigo individual.

De manera similar, las secuencias establecidas como SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24, o cualquier secuencia inclusiva más corta se puede amplificar como se describe usando cebadores desarrollados a partir de las secuencias descritas. En particular, los cebadores pueden tener 12-35 nt de longitud, tal como 15-25 nt, 18-30 nt y similares. Ejemplos particulares no limitantes de cebadores que se pueden usar para amplificar las secuencias descritas incluyen los cebadores oligonucleotídicos establecidos como SEQ ID No. 25-48, o cebadores por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o incluso más idénticos a SEQ ID Nos. 25-48.

Las secuencias de ácido nucleico aisladas establecidas como SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 22 y 24, y fragmentos de la misma (incluyendo sondas y cebadores), pueden modificarse covalentemente para incluir un marcador detectable como se describe. Ejemplos no limitantes particulares de tales marcadores incluyen isótopos radiactivos, sustratos de enzimas, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. En modalidades particulares, el marcador es un marcador radiactivo. En otras modalidades, el marcador es un marcador fluorescente, tal como cualquiera de los marcadores fluorescentes aquí descritos.

Se describen adicionalmente métodos para detectar TLV en una muestra, como una muestra recolectada de un sujeto (por ejemplo, un pez Tilapia). Los métodos incluyen detectar un ácido nucleico de TLV en la muestra, que indica la presencia de TLV en la muestra.

En modalidades particulares, la muestra es aislada de un sujeto individual, tal como un pez Tilapia. En otras modalidades, la muestra se recolecta de una población, tal como una población de peces. En todavía otras modalidades, la muestra se recolecta de un entorno en el que los sujetos viven, tal como un estanque de peces y similares. Cuando la muestra es una muestra de uno o más sujetos, la presencia de un ácido nucleico o proteína de TLV en la muestra indica que el sujeto está infectado por TLV.

Los métodos de aislamiento de ácido nucleico y su detección son bien conocidos en la materia. En particular, las sondas o cebadores marcados descritos en el presente se pueden usar para detectar TLV en una muestra mediante técnicas de hibridación estándar, que incluyen una

matriz, tal como una micromatriz. Otros métodos de detección incluyen cualquier método adecuado de amplificación de ácidos nucleicos, tal como PCR y sus variaciones, incluyendo RT-PCR y qPCR.

Como un virus de tipo ortomixovirus, el TLV tiene un genoma de ARN que no atraviesa una etapa de ADN durante su ciclo de propagación. En consecuencia, cuando están en forma de ADN, los ácidos nucleicos aislados aquí descritos son sintéticos. También se apreciará que los métodos de amplificación de ácidos nucleicos de TLV mediante métodos estándar incluirán una etapa de transcripción inversa para producir ADNc como base para los métodos de PCR y similares. Los métodos de transcripción inversa y PCR son conocidos en la materia.

También se describen kits para detectar TLV en una muestra. Los kits descritos incluyen por lo menos una de las sondas y cebadores específicos de TLV descritos anteriormente. En modalidades particulares, los kits incluyen reactivos para aislar ARN viral de una muestra. En otras modalidades, los kits incluyen reactivos y/o enzimas para transcripción inversa y amplificación de ADN. En aún otras modalidades, los kits incluyen por lo menos un par de cebadores tal como los pares respectivos de los oligonucleótidos establecidos en el presente como SEQ ID NOs 25-48, o cebadores por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o incluso más idénticos a las SEQ ID NOs 25-48. En modalidades particulares, los ácidos nucleicos específicos de TLV suministrados se marcan previamente con un marcador detectable. En otras modalidades, se incluye un marcador detectable en el kit junto con reactivos y/o enzimas opcionales para asociar el marcador con el ácido nucleico.

V. Vacunas del Virus de la Tilapia Atenuado e Inactivado

En el presente se describen además aislados de TLV atenuado e inactivado, que pueden conferir resistencia a la infección por TLV silvestre.

Los virus atenuados aquí proporcionados se aíslan y se clonan después de múltiples pasos a través de células de Tilapia, seguidos de la exposición a una condición mutagénica no letal, tal como radiación ultravioleta o mutágeno químico.

En modalidades particulares, la cepa de TLV atenuado se produce pasando primero el virus, por métodos conocidos en la materia (por ejemplo, en donde cada paso es un ciclo de infección y aislamiento del virus resultante de la infección), por lo menos 10 veces a través de células de Tilapia, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más veces a través de células de Tilapia. En ejemplos particulares, a cada paso le sigue la exposición a una condición mutagénica antes del siguiente ciclo de paso. En otras modalidades, la exposición del virus recolectado a una condición mutagénica no letal (también descrita en el presente como “subletal”) (por ejemplo, una condición en la que el virus puede seguir infectando las células) se da después del paso final. En

algunas modalidades, el virus bajo atenuación se expone a una dosis subletal de radiación ultravioleta (UV), tal como 3.2 a 6.8 mJ/cm² y más particularmente 6.8 mJ/cm².

En una modalidad particular, una cepa de TLV atenuado se produce pasando TLV silvestre a través de células de aleta de Tilapia durante 20 pasos, exponiendo las células a una dosis de radiación UV de 6.8 mJ/cm² y luego aislando un clon de virus individual.

Cuando se proporciona como una composición inmunogénica a un sujeto, tal como en una vacuna, la cepa de TLV atenuada descrita puede conferir resistencia parcial o completa a una infección por TLV de tal manera que una población de peces vacunados que es desafiada con TLV silvestre, mostrará por lo menos una tasa de supervivencia del 60%, tal como 60% -100% de supervivencia, tal como 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 95% -100%, o incluso hasta aproximadamente 100% de supervivencia.

Un ejemplo particular de un TLV atenuado como se describe en el presente es el TLV atenuado que ha sido depositado en la CNCM (Instituto Pasteur) el 1 de abril de 2016 con No. de Acceso CNCM I-5075.

Las composiciones inmunogénicas de virus inactivado (muerto) se pueden producir de acuerdo con métodos conocidos en la materia, incluyendo la incubación con formalina tal como se describe en el presente.

En modalidades particulares, los aislados de TLV atenuados y/o inactivados son un componente de una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna de TLV) que incluye el virus atenuado y/o inactivado, un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más adyuvantes u otros agentes inmunoestimulantes.

En modalidades particulares, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser agua o un tampón, o también un estabilizante de la composición.

En ciertas modalidades, las vacunas se preparan como soluciones líquidas, emulsiones o suspensiones inyectables. En el ejemplo de una vacuna de peces, la administración puede ser mediante la inmersión de peces en agua. De acuerdo con esto, se puede preparar una emulsión líquida o concentrado emulsionable para la adición al agua en la que se mantienen los peces. Las formas sólidas (por ejemplo, polvo) adecuadas para la disolución o suspensión en vehículos líquidos o para mezclar con alimentos sólidos, antes de su administración, también se pueden preparar. En modalidades particulares, la vacuna puede ser un cultivo liofilizado para reconstitución con un diluyente estéril. Por ejemplo, 0.9% de solución salina. Antes del secado (por ejemplo, liofilización), se pueden agregar a la vacuna una variedad de ingredientes, tales como conservadores, antioxidantes o agentes reductores, una variedad de excipientes, etc. Dichos excipientes también se pueden agregar al virus seco después del paso de secado.

En modalidades particulares, la composición inmunogénica incluye un adyuvante u otro inmunoestimulante. Los adyuvantes son bien conocidos en la materia. Ejemplos particulares no limitantes incluyen dipéptidos de muramilo, avidinas, hidróxidos de aluminio, fosfatos de aluminio, aceites, emulsiones oleosas, saponinas, sulfatos de dextrano, glucanos, citocinas, copolímeros de bloque, oligonucleótidos inmunoestimulantes y otros conocidos en la materia, que pueden mezclarse con el TLV atenuado y/o inactivado.

En otras modalidades, la composición inmunogénica descrita (vacuna) comprende adicionalmente por lo menos un estabilizante para protegerlo de la degradación, mejorar la vida útil o mejorar la eficiencia de liofilización. Los ejemplos no limitantes de estabilizantes para uso con la vacuna descrita incluyen SPGA (Bovarnik et al., 1950, *J. Bacteriology*, volumen 59, página 509), leche descremada, gelatina, albúmina de suero bovino, carbohidratos, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, lactosas, proteínas tales como albúmina o caseína o sus productos de degradación, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos.

La composición inmunogénica de TLV atenuado y/o inactivado descrita (vacuna) se puede usar en métodos de vacunación contra TLV infectando por lo menos un sujeto con la vacuna de TLV atenuado descrita en el presente, y/o exponiendo al sujeto al TLV inactivado.

En modalidades particulares, la vacuna se administra a los peces de forma individual por vía oral, así como a través de su alimentación o mediante administración oral forzada, o mediante inyección, tal como por vía intramuscular o intraperitoneal

En modalidades alternativas, la vacuna se puede administrar simultáneamente a toda una población de peces contenida en un cuerpo de agua rociando, disolviendo y/o sumergiendo la vacuna en el agua. Dichos métodos de vacunación de poblaciones se pueden utilizar en diversos entornos, tales como estanques, acuarios, hábitats naturales, granjas de peces y reservas de agua dulce.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o modalidades particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como que limitan a las características o modalidades específicas descritas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento y Caracterización del Virus de la Tilapia

Se desarrolló una línea celular de aletas de Tilapia y se utilizó para aislar el virus de ARN de peces recolectados durante los eventos de mortalidad de 2012. El virus se designó temporalmente como Virus de la Tilapia - TLV. El virus fue aislado de la siguiente manera: Las

muestras de los órganos congelados de Tilapia enferma se descongelaron, mezclaron, homogeneizaron, filtraron a través de un filtro de 0,2 μm y se inocularon en células de aleta de Tilapia (TFC) sin tratamiento. Los cultivos infectados con TFC se incubaron a 28°C y se monitorizaron diariamente para determinar el efecto citopático (ECP). El CPE visible se observó 4-7 días después de la inoculación e incluyó la formación de placa clara (Figura 2). Ningún CPE fue evidente en cultivos de control de TFC infectados de manera simulada. La inoculación secundaria de cultivos TFC sin tratamiento con sobrenadantes de cultivos de TFC que muestran CPE se repitió durante 20 pasos con resultados de CPE similares.

La línea celular Tilapia propaga el virus aislado a títulos más altos. El análisis mediante microscopía electrónica de cultivos de células infectadas muestra las estructuras del virión dentro de las células (Figura 1). El virus de TLV tiene forma esférica y muestra variaciones en tamaño y morfología pleomórfica. En las células infectadas, las partículas virales aparecen en las vacuolas citoplásmicas y tienen un diámetro promedio de ~ 65 nm.

La caracterización primaria del virus muestra que la propagación viral depende de la temperatura y ocurre entre 23°C y 33°C. El virus se propaga en el cultivo de células de Tilapia y causa efecto citopático (CPE) a temperaturas >24°C pero no a 15°C (Figura 2). Esta observación está de acuerdo con las observaciones de campo de la ocurrencia de la enfermedad. A lo largo de los pasajes del virus en cultivo de células que son capaces de mantener el CPE y propagar el virus.

Para cumplir con los postulados de Koch y establecer que el TLV es de hecho el agente etiológico de la enfermedad de un modelo de enfermedad que se estableció en TLV-aislados de cultivo de tejidos cual que se utilizó para infectar Tilapia sin tratamiento saludable. Los peces inyectados exhibieron signos de enfermedad consistentes con los informes de campo. El pez se salió de la alimentación, mostró letargo, se volvió demacrado y finalmente murió. La mortalidad varió de 30% a 100%. Además, el TLV se aisló e identificó de los peces que murieron en el estudio, cumpliendo los postulados de Koch para que el TLV fuera el agente etiológico.

La caracterización adicional del virus se llevó a cabo mediante secuenciación genómica viral. La secuenciación del virus reveló múltiples secuencias asociadas con cultivos infectados que no se solapaban en una sola secuencia, lo que sugiere un genoma segmentado. De las doce secuencias determinadas y presentadas en el presente, dos (cóntigos 8 y 16) muestran homología con secuencias conocidas dentro de Genbank (del virus del lago Tilapia (Eyngor et al 2014; Número de acceso de Genbank KJ605629.1); las secuencias restantes no comparten homología con ninguna otra secuencia de Genbank. Sin embargo, el análisis de BlastX identificó un dominio putativo conservado en uno de los fragmentos virales (cóntigo 4) que pertenece a la subunidad PB1 de la ARN polimerasa dependiente del ARN de la influenza. La secuencia completa

(con U representada como T) que se establece como SEQ ID NO: 1 (los codones de inicio y parada se predicen a 38 nt y 1595, respectivamente). La traducción conceptual de 520 aminoácidos de la secuencia (en marco +2) se expone como SEQ ID NO: 2.

Otras secuencias determinadas y productos de traducción putativos incluyen: Cóntigo 7 (SEQ ID NO: 3) y su traducción de marco 2 (SEQ ID NO: 4); Cóntigo 5 (SEQ ID NO: 5), y su traducción de fase 6 (SEQ ID NO: 6); Cóntigo 6 (SEQ ID NO: 7) y su traducción de fase 6 (SEQ ID NO: 8); Cóntigo 8 (SEQ ID NO: 9) y su traducción de fase 6 (SEQ ID NO: 10); Cóntigo 14 (SEQ ID NO: 11) y su traducción de fase 5 (SEQ ID NO: 12); Cóntigo 15 (SEQ ID NO: 13) y su traducción de fase (SEQ ID NO: 14); Cóntigo 12 (SEQ ID NO: 15) y su traducción de fase 5 (SEQ ID NO: 16); Cóntigo 16 (SEQ ID NO: 17) y su traducción de fase (SEQ ID NO: 18); Cóntigo 20 (SEQ ID NO: 19), y su traducción de su fase 1 (SEQ ID NO: 20) y fase 2 (SEQ ID NO: 21); Cóntigo 21 (SEQ ID NO: 22) y su traducción de fase 5 (SEQ ID NO: 23); y la secuencia de ácido nucleico del cóntigo 19 (SEQ ID NO: 24).

La secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 2 se asemeja a la ARN polimerasa PB1 del virus Ortomixo. Usando el software de análisis de secuencias TREX-MAFFT, se ensambló un árbol filogenético, comparando las secuencias de aminoácidos del virus del ortomixo PB1 conocidas (tales como del virus de la influenza) al del TLV. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 3, lo que sugiere que El TLV aislado puede ser un patógeno emergente en la acuicultura de especies de Tilapia y un nuevo género dentro de la familia *Ortomixoviridae*.

Ejemplo 2: Detección de Virus de la Tilapia

Este ejemplo demuestra la detección de TLV en cultivos infectados u órganos infectados (hígado, bazo, riñón, cerebro) derivados de peces Tilapia enfermos:

Se detecta una infección por TLV mediante la detección de ARN de TLV en una muestra infectada mediante PCR. El ARN de la muestra se produce a partir TFC viral- infectado o de órganos derivados de peces Tilapia enfermos, utilizando mini kit Aurum Total RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BIO-RAD Cat No. 732 a 6820), y el ADNc se genera a partir del ARN aislado utilizando el kit de ADNc Transcriptase Verso de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific Cat No. AB 1453/A). Después se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR de acuerdo con los protocolos estándar utilizando el ADNc como modelo, y con un conjunto de cebadores para identificar el cóntigo 4 (SEQ ID NOS 25 y 26) (como se muestra en la Figura 8). El cóntigo 4 contiene un dominio putativo conservado que pertenece a la subunidad PB1 de la ARN polimerasa dependiente del ARN de la influenza.

La correlación específica entre los 12 cóntigos identificados se muestran en la Tabla 1. La Tabla 1 es un resumen comparativo de los 16 cóntigos de TLV observados. El TLV purificado en gradiente de sacarosa se secuenció utilizando la tecnología de secuenciación de próxima generación. El análisis genómico reveló 16 cóntigos distintos (en un rango de 400-1620 pb) que no se asemejan a las secuencias conocidas que aparecen en el GenBank. Para determinar si estas secuencias estaban de hecho asociadas con el TLV, se diseñaron cebadores específicos para amplificar cada una de las secuencias y el RT-PCR se llevó a cabo usando los conjuntos de cebadores en modelos generados a partir de TFC infectados y no infectados. De los 16 Cóntigos, 12 mostraron ser de origen viral, apareciendo sólo en cultivos infectados (ver Tabla 1). Los cuatro Cóntigos que fueron positivos para cultivos infectados y no infectados, se asume que son secuencias de Tilapia endógenas no publicadas (en negritas).

Tabla 1. Resumen de los Resultados de RT-PCR de 16 Cóntigos Ensayados con Cebadores Específicos Diseñados para Cada Ensayo con Modelos de TFC Infectado y No Infectado

	Marcador de Cebadores	Longitud de Fragmento de PCR (bp)	TFC no infectadas	TFC infectadas con TLV
1	Con 4	550	-	+
2	Con 7	311	-	+
3	Con 5	451	-	+
4	Con 8	413	-	+
5	Con 14	451	-	+
6	Con 15	358	-	+
7	Con 12	215	-	+
8	Con 16	156	-	+
9	Con 75	109	+	+
10	Con 20	212	-	+
11	Con 21	350	-	+

12	Con 62	234	+	+
13	Con 78	254	+	+
14	Con 86	423	+	+
15	Con 6	175	-	+
16	Con 19	150	-	+

La detección de TLV se demuestra también en la Figura 7, que es un gel de electroforesis que muestra la detección de TLV en cultivos infectados usando el cebador Con19, y que demuestra que TLV tiene un genoma de ARN que no pasa por una etapa de ADN durante su ciclo de propagación. Con19 se amplificó en RT-PCR solo cuando se ensayó en cultivos infectados después de una reacción de transcriptasa inversa (Figura 7, carril 1). Las muestras de células no infectadas y de ADN extraído de células infectadas y no infectadas ensayadas con cebadores de Con19 fueron negativas (Figura 7 carriles 2, 4 y 5). La presencia de ADN genómico y ADNc en las extracciones probadas se validó utilizando cebadores que amplifican un gen de Tilapia endógeno (Figura 7 carriles 6-9). El ARN se extrajo de TFC infectada y no infectada usando Mini Kit Aurum Total RNA (BIO-RAD Cat No. 732-6820). El ADNc total se generó usando un kit Reverse Transcriptase Verso cDNA (Thermo Scientific Cat No. AB 1453/A). El ADN se produjo a partir de TFC no infectado e infectado usando DNeasy (QIAGEN Cat No. 69504).

Como se indicó, además de mostrar la correlación específica de los cóntigos con TLV, la Figura 7 también muestra que el TLV posee genomas de ARN que no atraviesan una etapa de ADN durante su ciclo de vida (comparar los carriles 5, 6, 8 y 9).

Ejemplo 3: Generación y Caracterización de la Cepa de Vacuna de TLV Atenuado

Para generar una cepa de virus atenuado, un aislado de TLV se pasó continuamente sobre las células de aleta de Tilapia 20 paspos, y se expuso a radiación UV a intensidades incrementadas (Figura 4). A la dosis sub-letal de 6.8mJ/cm² los clones de virus se recolectaron y se propagaron como un solo clon viral.

Para ensayar los clones putativos atenuados, los peces Tilapia se vacunaron con dos virus clonados y un control con placebo mediante inmersión durante 1 hora. Los grupos vacunados fueron: (1) control con placebo: medio desprovisto de antígeno viral; (2) TLV p10 (clon 6) - virus pasado 10 veces en cultivo, irradiado con UV y clonado; y (3) TLV p20 (clon 4) - TLVp10 pasado 10

veces más en cultivo irradiado con UV y clonado. Los peces fueron monitoreados durante 35 días para mortalidad u otros eventos adversos asociados con la enfermedad (Figura 5).

La supervivencia en el grupo placebo fue del 100% sin anomalías observadas durante el período de estudio. El grupo expuesto a TLV p10 (clon 6) mostró una mortalidad de aproximadamente 20% asociada con la exposición al virus de TLV. Los peces vacunados con TLV p20 (clon 4) no mostraron ningún signo de enfermedad y fueron comparables en los patrones de alimentación y comportamiento con el grupo de control con placebo. El TLV p20 (clon 4), también referido como clon 4 de TLV, se depositó en el CNCM (Instituto Pasteur) el 1 de abril de 2016 como número de registro CNCM I-5075. La caracterización de la secuencia parcial de estos clones reveló deleciones en por lo menos los segmentos 4 y 5 del genoma de TLV (mostrado aquí como SEQ ID Nos. 49 y 50, respectivamente). Se apreciará que las porciones específicas de los mutantes de estas secuencias pueden usarse para la detección de la cepa atenuada y distinguirla de la cepa silvestre.

Para determinar la eficacia de las vacunas, los peces que sobrevivieron a la porción de seguridad fueron con un título alto de virus TLV silvestre que se había pasado 4 veces en células de aleta de Tilapia cultivadas. Una porción del grupo de placebo no se desafió con el virus silvestre para descartar cualquier mortalidad no asociada a lo largo de la porción de eficacia del estudio.

Los resultados del desafío de la eficacia se muestran en la Figura 6. El grupo placebo desafiado mostró un patrón de mortalidad que es evidente de la infección por TLV. El pez se volvió letárgico y dejó de alimentarse, la coloración de la piel de los peces se oscureció y la mortalidad comenzó el día 12 después de la exposición, alcanzando un máximo a los 20 días y alcanzando un 100% de mortalidad durante el período de prueba de eficacia. El grupo de placebo no desafiado transcurrió sin incidentes y no mostró signos de enfermedad. Los peces vacunados con TLV p10 (clon 6) exhibieron un inicio de la mortalidad comenzando en el día 20 después de la exposición, y alcanzando un máximo con una mortalidad del 28%. Los peces vacunados con TLV p20 (clon 4) no mostraron signos de enfermedad y fueron comparables en su comportamiento con el grupo de placebo no desafiado. Se observó un nivel de mortalidad de 2.9% (un solo pez) durante el período de observación.

Estos resultados indican que el TLV p20 (clon4) muestra un perfil de vacunación favorable tanto para los parámetros de seguridad como de eficacia probados.

Ejemplo 4: Generación y Caracterización de la Cepa de Vacuna de TLV Inactivado

Para generar la cepa de vacuna de TLV inactivado, el TLV se expone al 0.2% de formaldehídos y se pasa a través del virus expuesto en células no infecciosas. La capacidad de las cepas aisladas inactivadas para conferir resistencia a la infección por TLV se prueba luego en peces

vivos mediante inyección con y sin adyuvantes comerciales. Los resultados se muestran en la Figura 9. Como se muestra en la figura, la tasa de mortalidad de peces Tilapia (10gr) desafiados por inyección IP de TLV, se redujo de 91.7% (11/12) de mortalidad del grupo de control, a 33% (8/24, supervivencia porcentual relativa = RPS = 63.4), cuando se inyectaron, 28 días antes del desafío, con emulsión que contiene TLV inactivado (formaldehído al 0.2%) con adyuvante incompleto de Freund - IFA (1:1). En contraste, no se logra ninguna inmunoprotección al inyectar a los peces Tilapia (10gr) con TLV (0.2% formaldehído) solo o con emulsión que contiene placebo - Medio de células no infectadas con adyuvante incompleto de Freund - IFA (1:1), 100% de mortalidad (26/26 y 24/24 respectivamente).

En vista de las muchas modalidades posibles a los que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, debe reconocerse que las modalidades ilustradas sólo son ejemplos preferidos de la invención y no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención. Por el contrario, el alcance de la invención se define mediante las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, reivindicamos todo lo que entre dentro del alcance y espíritu de estas reivindicaciones como nuestra invención.