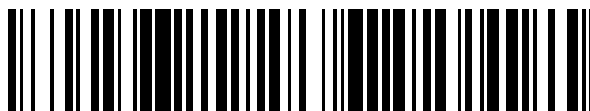


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 755**

51 Int. Cl.:

A61P 31/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2015** **PCT/IL2015/050158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015** **WO15121858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2015** **E 15749196 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3104883**

54 Título: **Vacunas contra el virus de la tilapia del lago**

30 Prioridad:

13.02.2014 IL 23097014

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

05.08.2019

73 Titular/es:

**THE STATE OF ISRAEL, MINISTRY OF
AGRICULTURE & RURAL DEVELOPMENT,
KIMRON VETERINARY INSTITUTE (50.0%)
P.O.B. 6
5025001 Beit-Dagan, IL y
RAMOT AT TEL AVIV UNIVERSITY LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BACHARACH, ERAN y
ELDAR, AVI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 721 755 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra el virus de la tilapia del lago

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a vacunas para la protección de peces contra enfermedades virales. En particular, la presente invención se refiere a composiciones de vacunas para la prevención de una enfermedad inducida por el virus de la tilapia del lago (TiLV) en peces, particularmente tilapias. Esta invención también se refiere a métodos para

10 usar las vacunas para proteger a las tilapias de una enfermedad inducida por TiLV.

Antecedentes de la invención

15 Durante los últimos años, las cantidades de peces capturados en el Mar de Galilea (Lago Kinneret) en Israel han sufrido una disminución persistente. Curiosamente, aunque el lago alberga unas 27 especies de peces (19 de las cuales son endémicas), que abarca a los miembros de las familias: *ciclidae*, *cyprinidae*, *mugillidae* y *claridae*, la reducción de la captura de tilapias fue particularmente llamativa. Para el principal pez comestible del lago, *Sarothredon galilaeus*, el rendimiento anual disminuyó de 316 toneladas en 2005 a 51, 20 y 45 toneladas en 2007, 2009 y 2010, respectivamente. Al ser un pez de pastoreo, *S. galilaeus* contribuye a mantener el equilibrio ecológico

20 entre poblaciones unicelulares. Por lo tanto, más allá de cualquier impacto económico, la disminución significativa de las poblaciones de peces de San Pedro, así como las de otras tilapias de lago, tal como *Tilapia zilli* (tilapia común), *Oreochromis aureus* (tilapia de Jordania), *Astatotilapia flavijosephi*, y *Tristamella simmonisintermedia*, representa una amenaza definitiva para todo el ecosistema. Las razones del declive no estaban claras.

25 De manera similar, a partir del verano de 2009, se registraron episodios de pérdidas masivas de tilapia en piscifactorías en todo Israel. Estos brotes se distinguieron por oleadas de mortalidades, que se propagaban de forma centrípeta de un estanque a otro. Curiosamente, la morbilidad y mortalidad de los peces se mantuvo restringida a las tilapias (*Sarothredon* y *Oreochromis* spp. e híbridos). Se encontró que varias especies criadas en comunidad con las tilapias, tal como las carpas (*Cyprinus carpio*), salmonetes grises (*Mugil cephalus*) y otras, eran completamente

30 asintomáticos, incluso después de la cohabitación a largo plazo. Además, una vez que la ola inicial de mortalidad ha cesado, no se registraron más brotes en el mismo estanque. Al igual que en el caso del lago, no se identificó ninguna razón aparente para las mortalidades. La monitorización de rutina de las toxinas no reveló ninguna anomalía y no se registraron variaciones ecológicas importantes; La detección meticulosa de patógenos no contribuyó a resolver el enigma.

35 Sin embargo, una mayor vigilancia ha llevado al reconocimiento de un fenómeno en el que, tanto en aguas abiertas como en estanques de cría, los peces bien nutridos pero debilitados son percibidos por la decoloración negra, las abrasiones de la piel y las degeneraciones oculares. El análisis histológico de peces enfermos reveló la presencia de centros melano-macrófagos aumentados (MMC), lo que indica un transcurso patológico en curso.

40 Los inventores han identificado y aislado el agente causal de la enfermedad de las tilapias, que es un virus de ARN novedoso, aún no identificado. El virus, en lo sucesivo denominado virus de la tilapia del lago (TiLV), se detectó en 25 brotes sospechosos, recogido de tilapia cultivada en diversas partes de Israel, así como de peces salvajes en el Mar de Galilea.

45 La vacunación contra la infección viral mediante la inmunización por inmersión en el baño ofrece varias ventajas sobre otras vías de inmunización. Entre estas ventajas están el menor coste por pez inmunizado, la inmunización masiva de grandes cantidades de peces, la reducción del estrés, las tasas significativamente más altas de supervivencia de los peces y la ausencia de reacciones adversas a la vacunación. Además, la vacunación por inmersión en baño es un método eficaz para la vacunación masiva de peces más pequeños que no se pueden

50 inyectar. Como alternativa, la inyección IP de vacunas para peces disponibles comercialmente se emplea comúnmente en piscifactorías de agua dulce o marinas debido a su fiabilidad y alta eficacia a pesar del alto coste por pez inmunizado y el estrés para los peces.

55 Contrariamente a las vacunas humanas, los productos veterinarios (es decir, las vacunas para peces) tienen que ser, ante todo, rentables. Las vacunas vivas atenuadas se consideran productos biológicos de "bajo coste" que pueden producirse en instalaciones relativamente sencillas y no requieren el uso de productos caros. Además, como las vacunas atenuadas imitan una infección natural, y después de la inmunización se induce una fuerte inmunidad celular y humoral, son una excelente opción para la medicina en peces.

60 Las vacunas comerciales están disponibles para una amplia diversidad de enfermedades virales y bacterianas. Estas incluyen vacunas muertas, atenuadas y subunidades.

65 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar cepas de TiLV atenuadas vivas que puedan usarse para la preparación de una vacuna.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para la preparación de composiciones de vacunas para la inmunización de las tilapias contra TiLV. Ferguson et al. "Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report", JOURNAL OF FISH DISEASES., vol. 37, n.º 6, 26 de junio de 2013 (26-06-2013), 583-589 describen un brote de mortalidad grave en una cepa particular de *Oreochromis niloticus* y caracteriza los cambios histopatológicos inducidos por la enfermedad. Los autores concluyen que la patogenia de la enfermedad y la causa de la muerte siguen siendo desconocidas y especulan que la enfermedad podría ser causada por un virus. Sin embargo, no se identifica ningún virus. SHLAPOBERSKY et al., "Viral encephalitis of tilapia larvae: Primary characterization of a novel herpes-like virus", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 399, n.º 2, 10 de abril de 2010 (10-04-2010), 239-24 se refieren a un virus de tipo herpes que causa encefalitis viral en larvas de tilapia. Bigarre et al.: "Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water", JOURNAL OF FISH DISEASES., vol. 32, n.º 8, 1 de agosto de 2009 (01-08-2009), pages 667-673, describen la infección por nodavirus de la tilapia criada en agua dulce.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. En un primer aspecto, la presente solicitud proporciona una composición de vacuna que comprende una cepa atenuada de virus de la tilapia del lago (TiLV) para su uso en la protección de peces tilapia contra la infección por TiLV, donde dicho TiLV se deposita en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia), con el Número de acceso de depósito CNCM 1-4817.

En algunas realizaciones, la cepa atenuada se obtiene mediante pases secuenciales en cultivo tisular.

En algunas otras realizaciones, la cepa atenuada se obtiene mediante pases en un huésped.

En una realización específica, la cepa atenuada se obtiene mediante al menos 12 pases secuenciales en cultivo tisular. En otra realización específica, la cepa atenuada se obtiene mediante al menos 17 pases secuenciales en cultivo tisular. En una realización específica adicional, la cepa atenuada se obtiene mediante al menos 20 pases secuenciales en cultivo tisular.

En algunas realizaciones adicionales, la composición de vacuna de la invención comprende además un vehículo, diluyente o adyuvante aceptable.

En otra realización de la invención, el pez tilapia es un miembro de la familia *Cichlidae*. En una realización específica, el pez tilapia se selecciona de la especie *Sarotherodon*, *Tilapia*, y *Oreochromis*.

En otro aspecto adicional, la composición de la vacuna está en una cantidad suficiente para inducir inmunidad a la infección posterior por TiLV.

En algunas realizaciones, la composición de vacuna se administra en una forma adecuada para la administración oral al pez por vía oral a través del alimento. En una realización específica, la composición de vacuna está recubierta por un revestimiento protector.

En algunas otras realizaciones, la composición de vacuna se administra a dicho pez por inyección. En algunas realizaciones adicionales, la composición de vacuna se administra a dicho pez disolviendo o sumergiendo la composición de vacuna en el cuerpo de agua. En algunas realizaciones adicionales, la inmunidad se induce en los peces por cohabitación. En algunas realizaciones adicionales, la composición de vacuna se administra a dichos peces pulverizando la composición sobre los peces que se extraen temporalmente del cuerpo de agua.

En aún un aspecto adicional, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende una cepa atenuada de virus de la tilapia del lago (TiLV) para su uso en la prevención o tratamiento de infección por TiLV en peces tilapia, donde dicho TiLV se deposita en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia), con el Número de acceso de depósito CNCM 1-4817.

Todas las características y ventajas anteriores y otras de la invención se comprenderán adicionalmente a través de la siguiente descripción ilustrativa y no limitativa de realizaciones de la misma, con referencia a los dibujos adjuntos. En los dibujos, a veces se usan los mismos números para indicar los mismos elementos en diferentes dibujos.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han identificado recientemente un virus de ARN pequeño, no descrito anteriormente, que es el agente causante de una enfermedad mortal que afecta tanto a las tilapias salvajes en el Mar de Galilea como a las tilapias criadas en piscifactorías de todo Israel. Como el virus se encontró inicialmente en las tilapias salvajes en el Mar de Galilea, se le dio el nombre de virus de la tilapia del lago (TiLV). El vínculo entre la (i) enfermedad recién aislada, la (ii) enfermedad "misteriosa" y la (iii) disminución de la población de peces se logró mediante el cumplimiento de los postulados de Koch.

La evidencia final de que el virus aislado es la causa de la enfermedad se basó en los siguientes datos. (i) El virus se aisló con éxito de peces infectados, pero no de especímenes sin tratar. (ii) La inoculación del virus que se propagó en el cultivo celular en peces sin tratar indujo una enfermedad mortal. (iii) El cultivo de extractos de especímenes de peces infectados experimentalmente produjo el mismo virus, que se propagó una vez más en los cultivos celulares. (iv) Se aplicaron con éxito tres ciclos de esta técnica de ping-pong. (v) La cohabitación de peces infectados por TiLV con peces sin tratar también indujo la enfermedad (transmisión "natural"). (vi) Se identificó ARN viral específico en peces enfermos y en cultivos celulares infectados, pero no en peces sin tratar o en cultivos no infectados.

Las siguientes características de este virus y su enfermedad asociada son notables: (i) El nuevo virus de ARN emergente es muy contagioso. (ii) Se transmite a través del agua. (iii) El resultado de la infección depende en gran medida de las condiciones ambientales y ecológicas. (iv) El cultivo del virus es factible en un amplio rango de temperaturas. (v) Aparentemente, el TiLV tiene un rango de huésped bastante estrecho, infectando solo a las tilapias, mientras que otras especies que se crían con tilapias no se ven afectadas. (vi) Las secuencias de fragmentos de ARN viral analizadas hasta ahora no tienen similitudes significativas con ningún genoma viral conocido y, (vii) la inmunidad adquirida se obtiene en peces que sobreviven a la exposición primaria.

El TiLV se propagó en la línea E-11 establecida, lo que indujo un efecto citopático a los 5 a 10 días posteriores a la infección. La microscopía electrónica reveló partículas icosaédricas desnudas de 55 a 70 nm. La selección de bibliotecas representativas ha permitido la identificación de una secuencia específica de TiLV, lo que permite diseñar una herramienta de PCR para el diagnóstico. El cribado por PCR confirmó que el mismo virus está presente tanto en el Mar de Galilea como en las piscifactorías de todo Israel.

Tres métodos principales se utilizan comúnmente para infectar a los peces en el laboratorio: cohabitación, inmersión en baño y exposición por inyección. Aunque la cohabitación y la inmersión en el baño se asemejan más a la exposición natural, la tasa de infectividad por estas rutas rara vez es relativamente baja.

El papel del TiLV en la inducción de una enfermedad se demostró mediante una infección intraperitoneal experimental con cultivos virales de bajos pases *in vitro* purificados en placas, o por cohabitación con peces enfermos, dando todos como resultado una enfermedad mortal con más del 80 % de mortalidad.

Los ensayos de cohabitación demostraron que la enfermedad es contagiosa y que, en condiciones controladas, las mortalidades se producen pocos días después de la infección, lo que lleva a la muerte del 80-100% de los peces. Los peces que sobrevivieron a la mortalidad inicial fueron inmunes a nuevas infecciones, lo que demuestra el aumento de una inmunidad adaptativa.

Se identificaron los parámetros para obtener una enfermedad por inyección e induciendo una enfermedad más natural, inducida no inyectable. Particularmente, las tilapias sanas libres de patógenos específicos (SPF) (*Oreochromis nilotica*), se expusieron tanto con extractos de peces enfermos como sobrenadantes de cultivos de células infectadas. Las rutas tanto de inyección como de cohabitación se ensayaron con condiciones ambientales que simulan condiciones naturales reales (es decir, temperatura de 26-28 °C). El comportamiento de los peces infectados se monitorizó a lo largo del tiempo antes de un análisis histológico más detallado. Las muestras de órganos, de peces infectados de forma natural y experimental, se procesaron con técnicas estándar (fijación con formalina, corte y tinción) y se analizaron mediante microscopía óptica.

Vacunas de cepa atenuada

Las vacunas atenuadas vivas utilizan organismos vivos que se han debilitado para que sean avirulentos, lo que significa que no pueden causar enfermedades. La atenuación se puede lograr de varias maneras:

- Organismos relacionados de origen natural que son avirulentos en los peces, incluidos organismos de rango de huésped restringido o cepas avirulentas de origen natural.
- Rondas múltiples de crecimiento de organismos virulentos en condiciones que debilitan el organismo, tal como en el cultivo tisular o en condiciones físicas adversas.
- Mutagénesis química.
- Manipulación genética del organismo para reducir la virulencia.

En general, se acepta que las cepas atenuadas pueden servir como cepas de vacunas eficientes, ya que imitan una infección natural: provocan respuestas celulares y de anticuerpo fuertes y, a menudo, confieren inmunidad prolongada con solo una dosis. Los microorganismos atenuados se utilizaron con éxito para inmunizar peces contra varias enfermedades. Dado que los peces juveniles se crían en piscifactorías en grandes masas, uno de los métodos más sencillos y económicos para protegerlos contra enfermedades virales es la inmunización a través del agua.

Las cepas virales atenuadas se obtienen típicamente mediante la selección de cepas avirulentas recolectadas directamente de peces, o por los extensos pases secuenciales de cepas virulentas en cultivo tisular. Los pases se pueden realizar en condiciones virales óptimas (en términos de temperatura, huésped, líneas celulares, composición

química del medio, etc.) o en condiciones subóptimas (es decir, crecimiento a temperaturas cada vez más subóptimas o huésped). En cualquier caso, este procedimiento va seguido de un proceso de selección/caracterización que tiene el objetivo de identificar mutantes virales que son altamente inmunogénicos pero que demuestran una virulencia reducida. Estos mutantes se definen como "cepas no virulentas de origen natural", en
 5 contraste con las cepas atenuadas que son el resultado de la mutagénesis química (que utiliza sustancias mutagénicas tales como 5-fluorouracilo o hidroxilamina) o el uso de manipulación genética (recombinante viral, genética inversa, etc.).

Las cepas virales atenuadas vivas pueden prepararse por cualquiera de los métodos anteriores. En una realización
 10 específica, el agente viral se obtiene mediante pases secuenciales en cultivo tisular. En otra realización, el agente viral se obtiene mediante pases en un huésped.

Los términos "virus" y "cepa viral" y "cepa" se refieren, sin limitaciones, a cepas estrechamente relacionadas del
 15 aislado específico descrito en el presente documento, concretamente, cualquier cepa, que comparte características similares de genotipo y/o fenotipo con esta cepa viral aislada. Esto incluye formas ligeramente modificadas o variantes del virus, que conservan las mismas actividades funcionales, concretamente, adiciones, eliminaciones o alternancias de aminoácidos o nucleótidos.

El término "cepa avirulenta" como se usa en el presente documento, se refiere, sin limitaciones, a un virus que
 20 carece de todas las capacidades de producción de enfermedad. Dichos virus avirulentos son virus atenuados que se utilizan en todos los tipos de inmunizaciones, incluidas las inmunizaciones activas y pasivas. También se incluyen los homólogos avirulentos naturales cuya capacidad para causar TiLV está disminuida.

El término "huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a un pez, específicamente un miembro de
 25 la familia *Cichlidae*, que es susceptible a la infección por TiLV.

Para determinar el número de pases requeridos para obtener una cepa de TiLV atenuada, los inventores probaron
 varios números de pases (12, 17 y 20).

Grupos de 30 peces sanos libres de patógenos específicos (SPF) (10 gramos cada uno) se expusieron a las
 30 diferentes cepas de vacunas de la invención, a través de baño o inyecciones i.p. Estos grupos se expusieron a la enfermedad que se induce por la cepa de tipo silvestre a través de la cohabitación con peces enfermos, 30-45 días después de la vacunación. Se determinaron las tasas de supervivencia de los peces vacunados y se calculó el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) como se detalla en el Ejemplo 2. Los resultados obtenidos demuestran la
 35 eficacia de las cepas de vacuna P17 y P20, lo que induce una inmunización significativa de los peces vacunados. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con condiciones de temperatura de 25-28 °C, que es la temperatura de la enfermedad de origen natural.

Las enfermedades virales de los peces son típicamente dependientes de la temperatura. Por ejemplo, la septicemia
 40 hemorrágica viral (VHS) se produce a una temperatura inferior a 12 °C, mientras que la infección por el virus del herpes de la carpa Koi (KHV) requiere temperaturas que varían entre 20-28 °C. Por lo tanto, los peces pueden infectarse a temperaturas no permisivas y desarrollar una respuesta inmune sin enfermedad clínica. Este enfoque ha demostrado ser exitoso en la prevención de la enfermedad en varios casos, incluyendo, septicemia hemorrágica viral (VHSV), KHV y necrosis nerviosa viral (VNN).
 45

En una realización, las tilapias se infectan como se describe anteriormente en el presente documento y se
 mantienen a una temperatura de 22 o 31 °C durante 3-5 días, antes de transferirse a temperaturas de 31 o 22 °C, respectivamente.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una
 50 cepa atenuada de virus de la tilapia del lago (TiLV) para su uso en la protección de peces tilapia contra la infección por TiLV, donde dicho TiLV se deposita en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia), con el Número de acceso de depósito CNCM 1-4817.

El término "vacuna", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia capaz de producir una
 55 respuesta inmune contra una infección causada por TiLV. Las vacunas pueden contener virus vivos o inactivados o muertos (aniquilados) o combinaciones de los mismos.

Los términos "inmunización" o "respuesta inmunitaria", como se usan en el presente documento, se refieren a una
 60 inmunidad que puede provocar respuestas inmunitarias humores y/o mediadas por células con respecto a una infección viral, o interferir con la actividad, propagación o crecimiento del virus. Los peces inmunizados por la vacuna de la presente invención pueden experimentar un crecimiento y propagación limitados o nulos del virus infeccioso.

La descripción se refiere además a un método para inmunizar peces tilapia contra la infección viral causada por
 65 TiLV, comprendiendo dicho método la administración a peces susceptibles de una composición de vacuna que comprende TiLV atenuado vivo. La vacuna se administra en una cantidad suficiente para inducir inmunidad a una

infección posterior por TiLV.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención demuestra una protección significativa en el modelo de exposición por cohabitación (valores RPS que varían entre el 55-62 %). Estos resultados son muy similares a las vacunas disponibles en el mercado, tal como la vacuna contra el virus de la anemia del salmón (SAV), que induce un RPS promedio del 65 %.

La eficacia de las composiciones de vacuna de la presente invención se ensayó utilizando un modelo de exposición que se parece mucho a la modalidad natural de infección, la cohabitación. Los datos generados resaltan la viabilidad industrial de la inmunización de las tilapias contra la enfermedad inducida por TiLV.

Cabe señalar que las composiciones de vacuna de acuerdo con la presente invención son adecuadas para cualquier tipo de pez que sea susceptible al TiLV, y específicamente a los miembros de la familia *Cichlidae*, conocidos comúnmente como tilapiine cichlids. Los ejemplos de tilapias de importancia económica incluyen el grupo de especies contenidas dentro de los géneros *Oreochromis*, *Sarotherodon* y *Tilapia*. El uso de híbridos de 2-4 especies de tilapia también es bastante popular en ciertos países, y por consiguiente, las especies son infinitas, debido a todos los híbridos posibles. Por lo tanto, cualquier híbrido de cualquier especie de pez tilapia es adecuado para la inmunización de acuerdo con la presente invención.

La vacuna se define en el presente documento en su sentido amplio para referirse a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable capaz de estimular una respuesta inmune protectora en peces inoculados con la vacuna.

La inmunización eficaz o la dosis o dosificación de vacunación se define en el presente documento como la cantidad que inducirá la inmunidad total o parcial en un pez vacunado contra una exposición posterior por una cepa virulenta.

La vacuna eficaz se define en el presente documento como una vacuna que ofrece una protección igual o superior a aproximadamente el 50% contra las infecciones por TiLV.

La atenuación, o inactivación, se define como la pérdida de virulencia de un patógeno. La pérdida de virulencia es gradual en caso de atenuación. La disponibilidad de vacunas específicas (ya sea cepas atenuadas o preparaciones muertas) es un pilar fundamental para la sostenibilidad de la acuicultura en zonas infectadas. Técnicamente, la vacunación se puede realizar a través de la administración oral (a través de los alimentos), a través de la vía acuática (es decir, la dispersión de la vacuna en el cuerpo de agua o a través de peces previamente vacunados que propagan el virus atenuado a los peces no vacunados), inyección (administración parenteral, incluidos los procedimientos intradérmicos, intramusculares y por intra-cavidad) o el método de pulverización con aire.

En una realización, la vacunación de grandes poblaciones de peces con el virus muerto o con el virus vivo atenuado se logra mediante la administración oral a través del alimento. La vacuna puede incorporarse dentro del alimento recubierto por revestimientos protectores.

En otra realización, la vacunación se puede realizar mediante inyección, ya sea como administración individual, que también es factible en gran escala, y se realiza mediante profesionales de vacunación (a mano) o, preferiblemente, con la ayuda de máquinas semiautomáticas.

En una realización adicional, la vacunación de grandes cantidades de peces se realiza mediante la administración simultánea del virus vivo atenuado a toda la población de peces presente en un cuerpo de agua disolviendo o sumergiendo el virus o la composición de vacuna en el cuerpo de agua.

Otra opción para vacunar grandes poblaciones de peces con la vacuna atenuada aprovecha su posibilidad de replicación (limitada) en el huésped final. Por consiguiente, en otra realización adicional, la composición de vacuna se administra a un número limitado de sujetos, en los que el virus atenuado se replica, se desprende y se propaga a otros peces que se crían en comunidad con el pez vacunado.

En una realización adicional, la vacunación masiva de peces se lleva a cabo rociando los peces, que se extraen temporalmente del agua durante un corto periodo, con la vacuna.

La inmunidad de acuerdo con la invención se puede inducir en peces susceptibles por cohabitación de peces infectados por TiLV con peces sin tratar.

La inmunización de los peces puede tener lugar en cualquier entorno natural o no natural, tal como estanques, lagos, acuarios, piscifactorías y hábitats de agua dulce.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden administrarse eficazmente en cualquier momento después de que los peces adquieran una competencia inmunológica, que para la tilapia es aproximadamente de dos a catorce días después de la eclosión.

Se considera que la inmunidad ha sido inducida en una población de peces, como lo demuestra una disminución en la cantidad de peces infectados o un aumento en la cantidad de peces supervivientes en comparación con un grupo de control no vacunado.

- 5 Los agentes virales o cepas virales se preparan para administrarse a peces por formulación en una cantidad o dosificación inmunológicamente eficaz. La dosis puede incluir además vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica, tales como agua, solución salina fisiológica, aceite (emulsión), liposomas, agentes de recubrimiento o de encapsulación.
- 10 La presente descripción incluye además el uso de cepas virales atenuadas vivas para la preparación de una composición de vacuna para inmunizar peces tilapia contra la infección causada por TiLV. La composición comprende como principio activo, un virus vivo atenuado.

- En otro aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende una cepa atenuada de virus de la tilapia del lago (TiLV) para su uso en la prevención o tratamiento de infección por TiLV en peces tilapia, donde dicho TiLV se deposita en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia), con el Número de acceso de depósito CNCM 1-4817.
- 15

- La descripción también incluye el uso de una cepa atenuada de TiLV en la preparación de una composición de vacuna para inmunizar peces tilapia contra la infección causada por TiLV. La composición comprende como principio activo, un virus vivo atenuado.
- 20

La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos y materiales específicos.

25 Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivos celulares

- 30 Se utilizaron ocho líneas celulares de peces establecidas: (1) la línea CHSE-214 (ATCC CRL 1681) del Salmón Chinook *Oncorhynchus tshawytscha*; (2) la línea BF-2 (ATCC CCL 91); derivada de pez sol *Lepomis macrochirus*; (3) la línea BB (ATCC CCL 59) de bagre cabeza de toro marrón *Ictalurus nebulosus*; (4-5) EPC y KF-1 de carpa común *Cyprinus carpio*; (6) la línea RTG-2 (ATCC CCL 55) de trucha arco iris *Salmo gairdneri*; (7) la línea FHM (ATCC CCL 42) de carpa cabezona *Pimephales promelas*; y (8) E-11 de cabeza de serpiente rayada *Ophicephalus striatus*.
- 35

- La línea celular de tilapia original utilizada para el cultivo del virus, denominada Til 13, se preparó como se describe anteriormente en otro lugar (Stenglein et al., 2012). Brevemente, se sacrificaron 50 g de peces anestesiados mediante una sobredosis de anestesia, y se extrajeron los cerebros de forma aséptica. Después, los cerebros se trocearon con tijeras, se homogeneizaron manualmente y se pasaron a través de molinos de malla de 100 µm; después, las células se lavaron y sembraron en matraces sellados de 12,5 ml (Becton-Dickinson, San Francisco, EE.UU.) a 25 °C. El medio de cultivo inicial contenía medio Leibovitz (L-15) al 80 % (Gibco, EE.UU.), suero de ternera fetal inactivado al 10 % (Gibco, EE.UU.) y suero de tilapia inactivado al 10 %; el medio se complementó con L-glutamina (300 mg/l), HEPES (1 %), penicilina (100 µg/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml). Durante los primeros 21 días de incubación, el 50 % del medio se cambió cada semana. A partir de entonces, las monocapas alrededor de cada masa se tripsinizaron y se transfirieron a nuevos matraces de 25 ml (Cellstar; Greiner bio-one, Alemania) con medio acondicionado (medio anterior al 50 % más medio nuevo al 50 %). Los cultivos de células primarias se sometieron a pase cada dos semanas; después de 35 pases, la línea se consideró estable; en este punto, se omitió el suero de tilapia, se detuvo el acondicionamiento, y las células se dividieron cada 2-3 semanas.
- 40
- 45
- 50

Virus y cultivo de virus

- 55 Se obtuvieron un total de 25 aislados de TiLV de brotes sospechosos que ocurrieron desde mayo de 2011 hasta marzo de 2013 en seis granjas diferentes en Israel, ubicadas en diversas partes de Israel (Alto Galilee, valle del Jordán y la costa mediterránea), así como de diversas especies de tilapias salvajes en el mar de Galilea. Los brotes de peces criados se definieron como un aumento repentino e inexplicable de la mortalidad (2 % al día, o más) durante al menos tres días consecutivos. Si dos salas se vieron afectadas en la misma granja simultáneamente, se clasificaron como un solo brote. Por lo tanto, cada aislamiento representa un brote clínico distinto. Se aislaron virus de peces salvajes a partir de peces de captura comercial que mostraban lesiones oculares; cada uno de estos aislados representa una captura diferente. Para minimizar los riesgos de contaminación, los cerebros y las vísceras (riñones, hígados, bazo y corazones) de los peces sospechosos se extrajeron asépticamente y se homogeneizaron manualmente con 9 volúmenes de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min, y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,22 µm (Stardet, Alemania). Los filtrados se almacenaron a -80 °C hasta su uso.
- 60
- 65

Prueba de sensibilidad a la infección por virus

Monocapas, que cubrían del 85 al 95 % de los matraces de 25 cm² (Cellstar; Greiner bio-one, Alemania) se lavaron dos veces con HBSS y después se inocularon 500 µl del filtrado del virus en el cultivo celular. Después de la incubación a 25 °C durante 1 h, el matraz se lavó con HBSS, se complementó con medio L-15 (FBS al 2 %) y se incubó a 25 °C. Se observaron los CPE diariamente durante 21 días.

Valoración del virus

El sobrenadante de cultivo que contenía el virus original (cepa TiLV 4/2011 obtenida del cerebro de peces de San Pedro) se cultivó en células E-11 y se diluyó en serie en aumentos de 10 veces con HBSS; se inocularon 50 µl de cada dilución en monocapas E-11 en placas de 96 pocillos. Se utilizaron cuatro pocillos para cada muestra diluida. Las placas se incubaron a 25 °C y se observaron diariamente para detectar CPE. Después de 7 días, el 50 % de la dosis infecciosa de cultivo tisular (TCID₅₀ ml⁻¹) se calculó por el método de Reed & Muench (1938). La cuantificación absoluta de los virus se obtuvo mediante PCR en tiempo real (véase a continuación).

Valoración del crecimiento viral

Dado que el crecimiento de los virus de los peces rara vez se considera dependiente de la temperatura, esto refleja la capacidad del patógeno para causar la enfermedad en un intervalo restringido de temperaturas. Esta propensión varía según la especie de pez y el virus. Para determinar el grado de crecimiento a diferentes temperaturas, la cepa TiLV 4/2011 se inoculó en una MOI (multiplicidad de infección) de 1,0 (evaluada mediante cuantificación absoluta por PCR en tiempo real) en los cultivos monocapa de E-11 en una placa de 24 pocillos a 15, 20, 25 y 30 °C durante 21 días. Los cultivos infectados se recogieron mediante raspado, se congelador-descongelaron, se centrifugaron (3000 x g 10 min), y se diluyeron en serie en aumentos de 10 veces con HBSS. Los recuentos de TCID₅₀ se determinaron como se describe anteriormente. La cuantificación absoluta de los virus se obtuvo mediante PCR en tiempo real (véase a continuación).

Purificación del virus del medio de cultivo

Las células E-11 cultivadas se infectaron con la cepa TiLV 4/2011, originalmente aisladas de *galilaeus* (pez de San Pedro) enfermos extraídos del lago Kinneret en junio de 2011. El medio recogido de las células infectadas con TiLV se eliminó de las células y los residuos celulares mediante centrifugación durante 10 min a 3.000 x g. Para concentrar aún más las partículas de virus y separarlas de las partículas de densidad inferior, el sobrenadante se estratificó en 2 ml de tampón de sacarosa-TE al 30% (peso/vol.) y se centrifugó durante 2 h en un rotor T865 a 65.000 rpm (Sorvall Discovery 90SE). Para una purificación adicional, el sedimento se resuspendió en tampón TE y se estratificó en un gradiente de etapa de sacarosa. Cada capa del gradiente consistió en 3 ml de sacarosa en TE con concentraciones del 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 % [p/vol. (de abajo hacia arriba)]. La ultracentrifugación se realizó en un rotor TST41.14 durante 2 horas a 40.000 rpm (Sorvall Discovery 90SE). Las bandas se visualizaron, se aspiraron de los tubos y se volvieron a sedimentar por centrifugación durante 2 h en un rotor T865 a 65.000 rpm (Sorvall Discovery 90SE). El sedimento final se resuspendió en 3 ml de PBS. Se tomó una alícuota de 100 µl para la inoculación de células E-11 y la monitorización de los efectos citopáticos (CPE). Los sedimentos se congelaron a -80 °C hasta la investigación adicional.

Aislamiento de ácidos nucleicos a partir de viriones purificados

Los ácidos nucleicos (ARN y ADN) se extrajeron de sedimentos de viriones purificados utilizando peqGOLD Trifast [(Pqlab, Alemania), para ARN] o el kit de preparación de plantillas de PCR de alta pureza [(Roche, Alemania), para ADN].

PCR en tiempo real cuantitativa

El ensayo de PCR en tiempo real de un solo paso se diseñó como un ensayo de hidrólisis de sonda de PCR de un solo tubo (TaqMan) para la detección y cuantificación de TiLV en tejidos infectados o en monocapas cultivadas.

Los cebadores oligonucleotídicos específicos y la sonda fluorogénica se diseñaron para dirigirse a un fragmento específico de 250 pb del fragmento de 450 pb previamente identificado entre los transformantes de la biblioteca de *E. coli*. Se utilizó un protocolo idéntico al descrito anteriormente con el cebador directo ME1 GTTGGGCACAAGGCATCCTA, el cebador inverso ME2 TATCACGTGCGTACTCGTTTCAGT y la sonda FAM AGGGAACGGCTATTG (todos escritos en la dirección 5'-3'; Hylab, Israel).

Los reactivos (qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix) se adquirieron en Quanta biosciences (ND, EE.UU.). Las mezclas de PCR se realizaron con los siguientes parámetros de ciclos térmicos: transcripción inversa a 50 °C durante 10 min, inactivación enzimática a 95 °C durante 1 min, 45 ciclos a 95 °C durante 10 segundos (desnaturalización), recocido y extensión a 60 °C durante 30 s. El ensayo por PCR se siguió de una etapa de curva de fusión con una velocidad de calentamiento de 0,5 °C/s (durante 10 s) y una medición continua de fluorescencia.

Todos los productos de PCR fueron del peso molecular previsto, lo que indica que se han producido amplificaciones específicas. Se incluyeron controles positivos y negativos que consistían en ADNc de TiLV y una mezcla de reacción sin plantilla en cada serie de PCR.

5 **Análisis de datos de PCR en tiempo real**

Para cuantificar las concentraciones de ADNc de TiLV, se generaron curvas estándar mediante el análisis de productos de PCR diseñados para un fragmento de 250 pb a diluciones en serie del plásmido que contenía el ADN de TiLV de 450 pb. La cuantificación viral absoluta se informó al fragmento de TiLV de 250 pb, mediante la evaluación y el análisis de la variación de ΔC_t (cantidad final de plantilla de ADNc = 25 ng/pocillo). La cuantificación relativa (RQ) de los viriones por célula se obtuvo utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, al normalizar la concentración de TiLV a la del ARNm de β -actina (cebadores inversos y directos 5'-GGGTCAGAAAGACAGCTACGTT-3' y 5'-CTCAGCTCGTTGTAGAAGGTGT-3' (Hassanin et. al., 2009), y considerando la expresión ajustada en el grupo de control como referencia (RQ = 1). La cuantificación se realizó por duplicado para la muestra, y todos los valores se presentan como medias $\pm$ errores estándar de las medias (SEM).

La expresión de β -actina, así como la de EF-1 α , se mantuvo constante a lo largo de los diversos experimentos ($p > 0,05$), mientras que la de ADNr 18S fue menor ($p < 0,05$), lo que indica la idoneidad de la β -actina como gen normalizador.

Los datos se analizaron con el software Applied Biosystems StepOne™ v2.0 y se expresaron como RQ. Se realizó una estadística descriptiva (media $\pm$ desviación estándar de la media) para describir RQ tanto en los experimentos *in vivo* como *in vitro*.

25 Procedimientos experimentales

Reproducción experimental de la enfermedad

La especie de tilapias *Oreochromis niloticus* (cepa Chitrellada) se crió en una instalación de SPF (ambiente libre de patógenos tratado con UV) a una temperatura constante de 28 °C. Los peces fueron alimentados a un régimen diario del 2 % peso/peso; debido a los cambios diarios constantes de agua, los parámetros del agua ($O_2 > 5$ ppm; $NH_4^+ < 1$ ppm; $NaCl < 1$ ppt) se mantuvieron invariables.

Todas las infecciones experimentales se llevaron a cabo con el aislamiento de TiLV 4/2011. El aislamiento 4/2011 es una cepa de campo (pase 1) que se amplificó mediante un pase para establecer una reserva de semilla de alto título (pase 2) que se dividió en alícuotas y se mantuvo congelada a -80 °. Antes de su uso, el virus se descongeló y se cultivó de nuevo (pase 3).

La cepa viral aislada 4/2011 se depositó en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia) con el número de acceso CNCM I-4817 el 8 de noviembre de 2013.

Ejemplo 1:

Reproducción experimental de la enfermedad

Para la reproducción artificial de la enfermedad, se inyectaron por vía intraperitoneal $2,6 \times 10^5$ de TCID₅₀ (50% de dosis infecciosa en cultivo tisular) a cada pez (cada uno con un peso de 30-35 g). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado de grupos (30 peces por grupo). Durante los experimentos, los peces se mantuvieron en acuarios de 200 litros que se dividieron en tres compartimentos mediante rejillas permeables al agua que permitieron la circulación de agua (pero no de peces) en todo el acuario; el grupo control siempre se mantuvo en medio. Los ensayos de cohabitación se llevaron a cabo en las mismas condiciones, y los peces infectados se ubicaron en el medio. Los peces que sobrevivieron a la infección intraperitoneal primaria (IP) se agruparon. Tres semanas después, los peces se dividieron en dos duplicados de grupos (cada uno de 20 peces) y se infectaron una vez más mediante inyección IP. Los grupos de control se inyectaron con cultivos de E-11 no infectados.

Una prueba definitiva de que el virus aislado es la causa de la enfermedad se obtuvo mediante una serie de 3 experimentos en serie de "cultivo e infección" en los que se utilizaron cultivos de cerebros de peces enfermos para la reinfección de peces no tratados. Esta serie de infecciones se completó inyectando a los peces un solo virus aislado en placas.

Para imitar más fielmente las condiciones de la granja y evaluar el papel de la propagación del virus y los pases en poblaciones susceptibles (peces mantenidos en ambientes cerrados, como en cría intensiva), se realizó una serie de cinco infecciones sucesivas como se indica a continuación: un grupo de peces infectados experimentalmente (clínicamente enfermos) se pusieron en el primer compartimento del acuario, mientras que un grupo de peces sin tratar se colocó en el segundo compartimento. Una vez que el primer grupo de peces sin tratar ha contraído la enfermedad (20 % de mortalidad), se introdujo un nuevo grupo de peces sin tratar (en el tercer compartimento) y se

eliminó el grupo original, lo que permitió la introducción de un nuevo grupo en su lugar. Estas infecciones en "ping-pong" en serie se realizaron un total de cinco veces.

Las condiciones de salud de los peces fueron controladas cuidadosamente durante los periodos de crecimiento y experimentación: los signos externos y las tasas de mortalidad se monitorizaron dos veces al día, durante un total de 21 días. Las cuestiones éticas, el cuidado de los animales, la manipulación experimental y las normas de seguridad se ajustan a las directrices establecidas por el Subcommittee on Laboratory Animal Care en los Israeli Veterinary Services.

Ejemplo 2:

Vacunas vivas atenuadas en pase

Se exploraron tres variantes de cepas atenuadas vivas como posibles vacunas candidatas. Todas las variantes consistieron en el aislado de TiLV 4/2011 que se sometió a pase en serie *in vitro*; los pases se realizaron en matraces de 25 cm² de acuerdo con la metodología descrita anteriormente en el presente documento, aprovechando la línea celular, Til 13.

Las diferencias entre los tipos de vacunas consistieron en el número de pases: la primera cepa de vacuna, denominada P12, se sometió a pase 12 veces, la segunda cepa, denominada P17, se sometió a pase 17 veces, mientras que la tercera, llamada P20, se sometió a pase 20 veces. Los últimos pases (12, 17 y 20, según la cepa) se realizaron en matraces de 175 cm². Después, los matraces se congelaron y descongelaron y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (3000 x g 10 minutos). Los virus localizados en el sobrenadante se cuantificaron mediante la dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 % (TCID₅₀ ml⁻¹), calculada por el método de Reed y Muench (1938), así como por PCR en tiempo real. Cada una de las vacunas se diluyó con PBS para contener (en 100 µl de la dosis final) TCID₅₀ de 1,3x10².

Los estudios de seguridad, incluida la determinación de la posible virulencia residual y la posible reversión a la virulencia, se abordaron mediante (i) la inyección (en tres grupos de 100 peces, cada uno) de dosis de diez veces (es decir, TCID₅₀ de 1,3x10³) de las variantes de virus P12, P17 y P20, y (ii) la inyección (en tres grupos de 100 peces, cada uno) 5 pases de retorno de cada variante (en 100 µl de la dosis final) de TCID 50 de 1,3x10². La mortalidad y las reacciones adversas se monitorizaron durante 30 días. La mortalidad y los efectos secundarios (adhesiones y melanización de las vísceras) se registraron 6 y 12 semanas después de la vacunación (n = 15 por grupo, por muestreo) utilizando una escala de Speilberg modificada (Midtlyng y Lillehaug, 1998).

El pez y el entorno para infectar a los peces vacunados eran, esencialmente, idénticos a los descritos previamente en el Ejemplo 1 en "Reproducción experimental de la enfermedad". Brevemente, a los grupos de *Oreochromis niloticus* SPF Chitrellada (30 peces por grupo, cada uno con un peso de 30-35 g) se les inyectaron 100 µl de PBS que contenía los virus de TiLV P12, P17 o P20. Para aliviar las manipulaciones, los peces se sedaron por Metacaína (MS222, PHARMAQ Ltd, Reino Unido). La vacunación se realizó mediante inyección intraperitoneal manual de dosis de 100 µl. Posteriormente, los peces vacunados se mantuvieron en el primer compartimento del acuario (véase la descripción del acuario en el Ejemplo 1), mientras que los peces sin tratar (número y tamaño idénticos) se mantuvieron en el segundo compartimento. Tres semanas después de la vacunación, los peces infectados se introdujeron en el tercer compartimento. Los peces infectados consistían en 30 peces sin tratar que se infectaron por cohabitación de 6 h con peces enfermos mantenidos en un acuario donde la virulencia se aumento en 4 pases del virus de tipo silvestre. Los tanques se monitorizaron diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad o mortalidad. A los peces de control se les inyectaron 100 µl de medios de cultivo no diluidos derivados de cultivos de Til-13 no infectados. Los datos de mortalidad registrados se utilizaron para calcular el porcentaje relativo de supervivencia (RPS), según se descrito por Amend (1981):

$$RPS = 1 - [(Mortalidad (\%) \text{ en el grupo tratado}) / (Mortalidad (\%) \text{ en el grupo de control})] \times 100.$$

Resultados: Protección específica contra TiLV mediante vacunación

Se determinó que la cepa de vacuna P12 contenía TCID₅₀ ml⁻¹ de 7,0 x 10⁷, que corresponde a 5,2 x 10⁷ partículas virales enumeradas por PCR en tiempo real, mientras que la de la vacuna P17 contenía un TCID₅₀ ml⁻¹ de 1,2 x 10⁸, correspondiente a 8,0 x 10⁷ de PCR en tiempo real. Para la cepa de vacuna P20, TCID₅₀ ml⁻¹ consistió en 8,9 x 10⁷, lo que corresponde a 8,7 x 10⁷ de partículas virales de PCR en tiempo real.

Las mortalidades específicas inducidas por las exposiciones a la cepa de tipo silvestre comenzaron los días 2 a 4 y duraron de 5 a 7 días. Todos los peces muertos dieron positivo para TiLV. Los signos pre-agónicos incluyeron letargo evidente y leve melanosis. Aparte de un ligera congestión, no se observaron otras lesiones graves en los órganos internos.

Las tasas de supervivencia y los valores de porcentaje relativo de supervivencia (RPS) de los diferentes grupos de peces vacunados se muestran en la Tabla 1. En los peces vacunados con P17, se determinó que el valor de RPS

era del 58 % (variaciones entre los diferentes grupos = 56-61 %; $P>0,05$); el RPS de los peces vacunados con P20 - 59 % (intervalo entre grupos = 55-62 %; $P>0,05$) fue similar al obtenido con P17. Se encontró que las tasas de supervivencia absoluta de estos grupos eran del 62 y el 64 %, respectivamente, mientras que las tasas de mortalidad en el grupo control y en los peces vacunados con P11 fueron del 63 %.

5 Los datos de seguridad señalaron que, para los prototipos de vacunas P17 y P20, ni cinco pases de retorno ni un aumento de diez veces en la cantidad de vacunas dieron lugar a efectos no deseados (enfermedad o mortalidad).

10 *Tabla 1: Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) (%) de Oreochromis niloticus vacunado contra TiLV expuesto por las vacunas P12, P17 y P20*

	Supervivencia	Mortalidad (%)	RPS (%)
Pez de control	3	97	-
Pez vacunado con P12	37	63	-
Pez vacunado con P17	62	28	58
Pez vacunado con P20	64	26	56

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende una cepa atenuada de virus de la tilapia del lago (TiLV) para su uso en la protección de peces tilapia contra la infección por TiLV, donde dicho TiLV se deposita en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia), con el Número de acceso de depósito CNCM 1-4817.
2. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cepa atenuada se obtiene mediante pases secuenciales en cultivo tisular.
3. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cepa atenuada se obtiene mediante pases en un huésped.
4. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un vehículo, diluyente o adyuvante aceptable.
5. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el pez tilapia es un miembro de la familia *Cichlidae*.
6. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el miembro de la familia *Cichlidae* se selecciona de la especie *Sarotherodon*, *Tilapia* y *Oreochromis*.
7. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición de vacuna se administra en una cantidad suficiente para inducir inmunidad a una infección posterior por TiLV.
8. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición de vacuna se administra al pez por vía oral a través del alimento.
9. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la composición de vacuna está recubierta por un revestimiento protector.
10. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición de vacuna se administra a dicho pez por inyección.
11. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición de vacuna se administra a dicho pez disolviendo o sumergiendo la composición de vacuna en el cuerpo de agua.
12. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se induce inmunidad en dichos peces por cohabitación.
13. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición de vacuna se administra a dicho pez pulverizando la composición sobre los peces que se extraen temporalmente del cuerpo de agua.
14. Una composición de vacuna que comprende una cepa atenuada de virus de la tilapia del lago (TiLV) para su uso en la prevención o tratamiento de infección por TiLV en peces tilapia, donde dicho TiLV se deposita en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur (Francia), con el Número de acceso de depósito CNCM 1-4817.