



SECUENCIACIÓN GENÉTICA DE LA SUBCEPA *Mycobacterium bovis* BCG MÉXICO 1931

ORDUÑA-ESTRADA PATRICIA¹; BARRIOS-CAMACHO HUMBERTO¹; CEVALLOS-GAOS MIGUEL ANGEL²; PONCE DE LEÓN SAMUEL³; LÓPEZ-VIDAL YOLANDA¹. ¹ Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. ² Genómica evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Cuernavaca, Morelos. ³ Dirección General, BIRMEX. México, D.F.

La BCG es la única vacuna utilizada actualmente para prevenir la tuberculosis, fue desarrollada en el Instituto Pasteur por Albert Calmette y Camille Guèrin entre 1908-1921 a partir de una cepa de *M. bovis* atenuada por 230 subcultivos en medio de papa glicerizada adicionada con bilis de buey. (6)

En 1924 la cepa BCG se envió a otros países, y el resultado de una diversificación fenotípica y genotípica de la cepa. La cual tiene variaciones tanto en su morfología como en la protección que confieren contra la tuberculosis en diferentes modelos animales y en humanos. La presencia de estos cambios y además el diferenciarlas de otras micobacterias que producen tuberculosis ha llevado a buscar métodos que permitan caracterizarlas e identificarlas. (3)

Los métodos moleculares han sido de gran utilidad para la identificación y diferenciación de las cepas BCG. Los trabajos que más han contribuido en esta área son los realizados por los grupos de Mahairas G, Brosch R y Behr M, los cuales describieron regiones ausentes (RD) y duplicadas (DU) en las diferentes cepas BCG en comparación con *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, con la identificación de estas regiones se logró la construcción del árbol genealógico de las cepas BCG. (2, 5, 7). Sin embargo, la cepa BCG México no fue incluida ya que desde los años 70s la vacuna dejó de producirse en el país.

De los trabajos realizados también se encuentra la secuenciación de la BCG Pasteur 1173P2, la cual generó información detallada acerca de las subcepas BCG, como regiones duplicadas en su genoma y la plasticidad del genoma con respecto a otras subcepas BCG (variación en regiones DU1 y DU2). (4)

La secuenciación de la cepa BCG Pasteur arrojó que ésta posee un cromosoma circular de 4, 374, 522 pb, codificando para 3954 genes. Además se encontró que es 30kb más grande que *M. bovis*. La secuenciación de la cepa se realizó a partir de librerías tipo shotgun con una cobertura de 4 veces el genoma, la secuenciación la realizaron utilizando secuenciadores ABI 3700, las secuencias fueron ensambladas usando los programas PHRAP y GAP4. Finalmente la anotación y base de datos se hizo con Artemis y BCGList. (4)

La vacuna BCG México se dejó de producir en el país desde 1970, a partir de ese año fue sustituida por la vacuna BCG Danesa 1331. En 1998 se decidió no continuar más con su producción. La caracterización de las cepas BCG México permitirá situarla en la genealogía de las cepas BCG existentes y que la Organización

Mundial de la Salud recomiende a México su uso y producción.

Objetivo: Secuenciar el genoma de la BCG México.

Materiales y Métodos: las cepas BCG Pasteur, Phipps, Tice, Danesa y los seed lots de México 1931, 1988 y 1997 Se utilizaron. El perfil genético de BCG México fue obtenido por PCR y PFGE. El PCR se utilizó para identificar regiones duplicadas (DU) y ausentes (RD) en BCG: RD1, 2, 14, 16, 18, IS6110, RD Dinamarca/Glaxo, DU1 y DU2 tipos I-IV. La secuenciación de la subcepa BCG México se realizó por pirosecuenciación (GSFLX 454 de Roche).

Resultados: Los perfiles electroforéticos de BCG México 1988 y 1997 fueron idénticos al de BCG Danesa (RD1, 2, Dinamarca/Glaxo, DU2 tipo III); la BCG México 1931 presenta el mismo perfil que BCG Phipps y Tice (RD1, 2, y 18; DU2 tipo IV). Por PFGE se detectaron 18/12 bandas en BCG Danesa y México 1965, 17/12 en Pasteur, 15/10 en Phipps, y 14/10 en Tice con AsnI y Dral, respectivamente, sumando ≈2,500 kb. El perfil con AsnI muestra una banda de 220kb únicamente en BCG México, Tice, y Phipps. De la secuenciación de BCG México se obtuvieron 1521 contigs, 166 utilizados para el armado del genoma, representado el 97% (4 245 876 bases) en comparación con BCG Pasteur (4 374 522 bases).

Conclusiones: BCG México 1931 presenta un perfil genético similar a BCG Phipps y Tice, el perfil obtenido la sitúa en el grupo IV de la genealogía refinada de subcepas BCG. La secuenciación permitió cubrir casi todo el genoma e identificar diferencias con BCG Pasteur.

- 1) **Altschul SF**, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997. Vol 25: 3389-3402
- 2) **Behr M**, Wilson M, Gill W, Salamon H, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999. Vol 284: 1520-1523
- 3) **Behr MA**. BCG-different strains, different vaccines? *The Lancet* 2002. Vol 2 (86-92).
- 4) **Brosch R**, Gordon S, Garnier T, Eiglmeier K et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *PNAS*, 2007. Vol 104(13): 5596-5601.