

Variaciones en la lisis por bacteriófagos de la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis*

Variations in the lysis of *Brucella melitensis* Rev 1 by bacteriophages

Laura Hernández Andrade^a, Efrén Díaz Aparicio^a, Francisco Suárez Güemes^b

RESUMEN

Brucella melitensis Rev 1 es la vacuna utilizada en cabras y borregas a nivel mundial. El objetivo de este trabajo fue establecer las variaciones de una cepa vacunal de *B. melitensis* Rev 1. Se realizó un estudio bacteriológico a ocho lotes de vacuna Rev 1 incluyendo como controles las cepas de referencia *B. melitensis* Elberg, *B. melitensis* 16 M, *B. melitensis* cepa de campo (133) y *B. abortus* 144. Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales, y para la fagotipificación las cepas se ajustaron a una concentración de 0.9×10^9 unidades formadoras de colonia. Se probaron los fagos Tb, Wb, Iz y R/C, a una concentración de 10^4 , se incubaron 24 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ y posteriormente se determinó la lisis producida por los bacteriófagos. La actividad bioquímica concordó con lo descrito; todos los lotes al primoaislamiento mostraron disociación, presentando colonias rugosas. Los resultados de la fagotipificación mostraron que las cepas provenientes de los ocho lotes de la vacuna Rev 1 fueron lisadas por todos los bacteriófagos, a diferencia de las cepas de referencia de *B. melitensis* usadas como control, las cuales solamente fueron lisadas por el fago Iz; no así la cepa de *B. abortus* 144 la cual fue lisada por Tb, WB, parcialmente por Iz y no presentó lisis por R/C. Se concluye que, existen diferencias en los lotes de producción de la vacuna Rev 1, por lo que se recomienda realizar la fagotipificación dentro de las pruebas de control de calidad.

PALABRAS CLAVE: Bacteriófagos, *Brucella melitensis* Rev 1, Control de calidad.

ABSTRACT

Brucella melitensis Rev 1 is the vaccine used in goats and ewes worldwide. The purpose of this research was to establish the variations of *B. melitensis* Rev 1 vaccine strain. Eight Rev 1 vaccine serials were subjected to a bacteriological study using *B. melitensis* Elberg, and *B. melitensis* 16 M, reference strains, *B. melitensis* (133) field strain, and *B. abortus* 144 as controls. Conventional biochemical assays were performed, and for phage typing purposes all strains were adjusted to a concentration of 0.9×10^9 colony forming units. Phages Tb, Wb, Iz, and R/C were tested at the 10^4 concentration. They were incubated for 24 h at 37 °C under a CO₂ atmosphere, then the bacteriophage-caused lysis was determined. Biochemical activity was consistent with previous descriptions. On the first isolation, all vaccine serials showed dissociation with rough colonies. Phage typing results showed that strains from all Rev 1 vaccine strains were lysed by all bacteriophages, unlike *B. melitensis* reference strains used as controls, which were only lysed by phage Iz. *B. abortus* 144 showed different results, since it was lysed by Tb, WB, partially lysed by Iz, and it was not lysed by R/C. It was concluded that –as far as phage susceptibility is concerned– differences exist among Rev 1 vaccine production serials; thus it is recommended to include phage typing among quality control tests.

KEY WORDS: Bacteriophage, *Brucella melitensis* Rev 1, Quality control.

INTRODUCCIÓN

En 1953, Herberg y Elberg desarrollaron la vacuna Rev 1 de *Brucella melitensis* a partir de la cepa de campo 6056, por medio de un proceso de mutación

INTRODUCTION

In 1953, Herberg and Elberg developed the *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine from the 6056 field strain, using a deletion process towards streptomycin

Recibido el 6 de febrero de 2003 y aceptado para su publicación el 27 de mayo de 2003.

^a CENID-Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera México Toluca Km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa 05110. México, D.F. Tel 5570-3886. laurah@micro.inifap.conacyt.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

hacia resistencia a la estreptomycin⁽¹⁾. Fue distribuida como semilla vacunal a diferentes laboratorios en el mundo, y puede ser distinguida de las cepas de campo principalmente porque a las 72 h de incubación produce colonias muy pequeñas de cabeza de alfiler, las que después de 96 h miden 1 a 1.2 mm, aunque algunas cepas producen colonias gigantes que crecen hasta 2 mm⁽²⁾. Resiste concentraciones de 2.5 µg/ml de estreptomycin y es inhibida por 5 UI de penicilina⁽²⁾.

Las cepas atípicas de Rev 1 se han presentado en pocos casos, uno de ellos fue el de la cepa *B. melitensis* Rev 1 "FSA" (Foreign South African) que se ha considerado una variante de la Rev 1, la cual presenta colonias más grandes comparadas con las cepas de campo, y algunas diferencias en cuanto a su susceptibilidad a los colorantes tionina y fucsina⁽³⁾.

Entre los procedimientos taxonómicos usados para las especies de *Brucella*, se encuentran: la producción de ácido sulfhídrico, pruebas de crecimiento en colorantes, lisis por bacteriófagos y susceptibilidad a la penicilina y estreptomycin. La tolerancia de la Rev 1 a los colorantes es menor que la de cepas de campo de *B. melitensis*; estas diferencias son menos marcadas si los cultivos son incubados en una atmósfera de CO₂. La producción de ácido sulfhídrico por la Rev 1 es mínima, similar a la producida por otras cepas de campo de *B. melitensis*. La prueba de utilización de la urea es negativa^(4,5,6).

Existe un gran número de bacteriófagos para el género *Brucella*, que no son capaces de lisar bacterias de otro género, por lo que son de utilidad para la identificación a nivel de género y especie; existe una clasificación⁽⁵⁾ que los agrupa en cinco grupos. El grupo 1 para el bacteriófago Tbilisi (Tb); en la concentración normal de la prueba (10⁴) produce lisis de cultivos de *B. suis* y es capaz de replicarse en *B. abortus*, en el caso de los cultivos de *B. melitensis*, *B. canis* y *B. ovis* no son lisados, ni cultivos de *B. abortus*, *B. neotomae* o *B. suis* en fase rugosa. El grupo 2 incluye el bacteriófago Firenze (Fi) cepa 75/13, que lisa a *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis*. El grupo 3 incluye los diferentes bacteriófagos Weybridge (Wb), que se replica y

resistencia⁽¹⁾. It has been distributed as vaccine seed among different laboratories throughout the world. It can be distinguished from field strains, mainly because after a 72-hour incubation period tiny, pinpoint colonies are produced. After 96 h, colonies measure 1 to 1.2 mm in diameter, even though some strains produce gigantic colonies of up to 2 mm⁽²⁾. It resists streptomycin concentrations of 2.5 µg/ml, and it is inhibited by 5 IU penicillin⁽²⁾.

Atypical Rev 1 strains have been found in a few cases. One of these cases was *B. melitensis* Rev 1 "FSA" (Foreign South African) strain, which has been considered as a Rev 1 variant that produced larger colonies than those of field strains. Some differences regarding thionine and fuchsin dye susceptibility have also been found⁽³⁾.

Taxonomic procedures used for *Brucella* spp, include hydrogen sulfide (H₂S) production, growth-on-dye tests, bacteriophage lysis, and penicillin/streptomycin susceptibility. Rev 1 strain is less stain tolerant than *B. melitensis* field strains; this difference is less evident if cultures are incubated under a CO₂ atmosphere. Similar to other *B. melitensis* strains, Rev 1 produces minimum amounts of H₂S. Urea utilization test is negative^(4,5,6).

There is a great number of bacteriophages specific for the *Brucella* genus that cannot lyse other bacterial genres. Thus, they can be used for genus/species identification purposes. One classification system⁽⁵⁾ categorizes these bacteria in five different groups. Group 1 is for bacteriophage Tbilisi (Tb) that at the regular test concentration (10⁴) results in the lysis of *B. suis* cultures. This particular bacteriophage can be replicated in *B. abortus*; *B. melitensis*, *B. canis* and *B. ovis* are not lysed by this particular phage, and this is also valid for *B. abortus*, *B. neotomae* and *B. suis* in their rough phase. Group 2 includes bacteriophage Firenze (Fi) strain 75/13, that lyses *B. abortus*, *B. neotomae* and *B. suis*. Group 3 includes all different Weybridge (Wb) bacteriophages, that replicate and form plaques on *B. abortus*, *B. neotomae* and *B. suis* cultures. Some of them produce plaques over *B. melitensis* but their efficiency is low. None of the bacteriophages in this group has the ability of

forma placas en los cultivos de *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis*; algunos de ellos forman placas sobre *B. melitensis*, pero su eficiencia es baja; ninguno de los bacteriófagos de este grupo es capaz de lisar cepas rugosas (R) de las especies de *Brucella* incluyendo a *B. canis* y *B. ovis*. El grupo 4 comprende a los bacteriófagos Berkeley: BK₀, Bk₁ y Bk₂ que causa lisis en cepas de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae* y *B. suis*. El grupo 5 incluye a los bacteriófagos líticos para brucelas rugosas, todos derivados del bacteriófago R, el bacteriófago R/C es de los más estables y el más usado, es lítico para *B. canis*, *B. ovis* y para las cepas no lisas de *B. suis* y *B. melitensis* las que son inhibidas en altas concentraciones.

El fago Izatnagar (Iz) se replica en cultivos lisos de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* y ha sido publicado que se replica en algunas brucelas rugosas⁽⁷⁾.

La acción de los bacteriófagos es mediada por estructuras fibrosas cortas unidas a la cola, la cual interactúa con proteínas o glicoproteínas que forman parte del complejo proteína-polisacárido de la membrana externa de las bacterias⁽⁸⁾. En el procedimiento de identificación es conveniente usar preparaciones de bacteriófagos estandarizados, en la dilución corriente de prueba, que es definida como la concentración mínima del bacteriófago capaz de producir lisis completa de la cepa propagadora⁽⁹⁾.

En las pruebas de control de calidad realizadas a diferentes lotes de vacuna Rev 1 comercial, que nuestro grupo ha venido utilizando en experimentos de evaluación de la protección de diferentes vacunas contra la brucelosis en las cabras, se ha visto variación con relación a disociación y reacción ante la utilización de bacteriófagos, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar las variaciones a la lisis por bacteriófagos, y disociación en diferentes lotes comerciales de la vacuna de *Brucella melitensis* Rev 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio bacteriológico a lotes de vacuna comercial de *Brucella melitensis* Rev 1, de

lysing rough (R) strains of *Brucella* species including *B. canis* and *B. ovis*. Group 4 includes the Berkeley bacteriophages, i.e.: BK₀, Bk₁ and Bk₂, that cause the lysis of *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae* and *B. suis*. Group 5 includes the lysis-causing bacteriophages for rough brucellae, all of them derived from bacteriophage R. Bacteriophage R/C is one of the most stable phages, and it is most popularly used. It causes the lysis of *B. canis*, *B. ovis*, and the non-smooth strains of *B. suis* and *B. melitensis*, that are inhibited at high concentrations.

The Izatnagar (Iz) phage replicates in smooth cultures of *B. melitensis*, *B. suis*, and *B. abortus*, and it reportedly replicates in some rough brucellae⁽⁷⁾.

Bacteriophage action is mediated by short fibrous structures attached to the tail, that interact with the proteins or glycoproteins included in the polysaccharide-protein complex of bacterial external membranes⁽⁸⁾. During the identification procedure, it is wise to use standardize phage preparations at the current test dilution, that is defined as the minimum bacteriophage concentration that is able to cause full lysis of the strain in which the bacteriophage is replicated⁽⁹⁾.

The quality control tests performed on the different commercial Rev 1 vaccines that our research group has been using experimentally to evaluate the protection of goats, variations regarding dissociation and reaction to bacteriophages have been found, so that the purpose of this research was to determine bacteriophage-caused lysis variations, as well as dissociation in different commercial *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine serials.

MATERIALS AND METHODS

Several *Brucella melitensis* Rev 1 commercial vaccine serials were bacteriologically studied. Four of these serials corresponded to reduced dose vaccines, and for additional serials were used at the regular dose rate. All serials were produced during the same year, on different dates. Serials

los cuales cuatro correspondieron a dosis reducida y cuatro a dosis normal, que fueron producidos a lo largo del mismo año en fechas diferentes. Los lotes evaluados no corresponden a los que actualmente se encuentran en forma comercial. Se usaron como control las cepas de referencia: *B. melitensis* Rev 1 (Elberg), *B. melitensis* 16 M, *B. melitensis* de campo biotipo 1 (133) y *B. abortus* 544.

Las cepas vacunales fueron inoculadas en agar tripticasa soya (TSA), se incubaron a 37 °C durante 48 h. A partir de este cultivo se verificó la pureza de las cepas, por medio de una tinción de gram y el tamaño de las colonias fue medido. Se realizaron las pruebas bioquímicas comunes para el género *Brucella*: citrato, triple azúcar hierro, urea de Christensen, prueba de oxidasa, producción de H₂S en TSA, utilizando tiras de papel impregnadas con acetato de plomo al 10 %^(6,9).

La prueba de susceptibilidad a colorantes se realizó en base de agar sangre, utilizando diferentes concentraciones para los colorantes: tiónina en concentración de 1/25,000, 1/50,000 y 1/100,000; fucsina 1/50,000 y 1/100,000; safranina 1/10,000. Las placas de colorantes se sembraron con un cultivo de 48 h en solución salina fisiológica 0.15 M ajustado a una densidad óptica de 0.165, a una longitud de onda de 600 nm, que corresponde aproximadamente a 0.9 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc/ml)^(6,9).

Para la fagotipificación, las cepas también se ajustaron a una concentración de 0.9 x 10⁹ ufc/ml y fueron sembradas en base de agar sangre para los bacteriófagos Tb, Wb e Iz; en el caso del fago R/C las cepas fueron sembradas en base de agar sangre adicionado con 5 % de suero fetal bovino. Sobre las cepas de brucela se depositaron de 10 a 15 µl del bacteriófago a probar, a la dilución corriente de prueba 10⁴. Se incubaron 24 h a 37 °C en atmósfera de 10 % de CO₂, y posteriormente se observó la lisis producida por los bacteriófagos⁽⁹⁾. La prueba de susceptibilidad a 5 UI de penicilina y 5 µg de estreptomycin, se realizó en medio TSA.

Para verificar si las cepas estaban en fase lisa, se hizo la prueba de acriflavina al 0.1 %, donde se

evaluated are not the same currently available in the market. Reference strains *B. melitensis* Rev 1 (Elberg), *B. melitensis* 16 M, field *B. melitensis* strain biotype 1 (133), and *B. abortus* 544 strains were used as controls.

Vaccine strains were inoculated into Trypticase Soy Agar (TSA), then incubated at 37 °C for 48 h. From this culture, the purity of the strains was verified using gram stain. Colony size was measured. Typical biochemical tests for the *Brucella* genus were performed: citrate, triple sugar iron, Christensen's urea, oxidase, H₂S production in TSA, using paper strips embedded in 10% lead acetate^(6,9).

Dye susceptibility test was performed on blood agar, using different dye concentrations: 1/25,000, 1/50,000 and 1/100,000 thionine; 1/50,000 and 1/100,000 fuchsin; and 1/10,000 safranin. A 48-hour culture diluted in 0.15 M saline was seeded in the dye-containing plates, at an optical density of 0.165, with a wavelength of 600 nm, which corresponds to approximately 0.9 x 10⁹ colony forming units (cfu/ml)^(6,9).

For phage typing purposes, strains were adjusted to a 0.9 x 10⁹ cfu/ml concentration, and then seeded on blood agar for bacteriophages Tb, Wb and Iz. In the case of phage R/C strains were seeded on blood agar with 5 % added bovine fetus serum. Ten to fifteen microliters of the test bacteriophage were placed over the *Brucella* strains at a current test dilution of 10⁴. Plates were incubated for 24 h at 37 °C under a 10 % CO₂ atmosphere. Bacteriophage-caused lysis was then observed⁽⁹⁾. Penicillin (5 IU)/streptomycin (5 µg) susceptibility test was performed on TSA medium.

In order to assure that the strains were actually in the smooth phase, the 0.1 % acriflavine test was performed. This test can result in either a homogeneous suspension, or in the formation of lumps. Crystal violet stain was performed⁽¹⁰⁾. For this purpose, the *Brucella* strains were serially diluted then seeded as to obtain individual colonies. Colonies were then stained with a 1:40 crystal violet: ammonium oxalate dilution^(6,9).

observa si se produce una suspensión homogénea, o si hay la formación de grumos. Se realizó la tinción de cristal violeta⁽¹⁰⁾, para lo que las brucelas fueron sembradas por dilución para obtener colonias individuales, las cuales fueron teñidas con cristal violeta-oxalato de amonio diluido 1/40^(6,9).

RESULTADOS

Las cepas de referencia utilizadas como control reaccionaron en forma típica en las pruebas bioquímicas, crecimiento en colorantes y susceptibilidad a antibióticos. Las cepas de los ocho lotes de vacuna de *B. melitensis* Rev 1 dieron resultados congruentes en cuanto a su actividad

RESULTS

Reference strains used as controls showed typical reactions to all biochemical, on-dye-growth, and antibiotic susceptibility tests. Strains in all eight *B. melitensis* Rev 1 vaccine serials yielded consistent results, as far as their metabolic activity is concerned (Table 1). Using Gram's stain small rods, typical of *Brucella* were observed. Colonies were 1.3 to 1.5 mm in diameter. Colonies were always larger than those of the control strains.

The dye susceptibility test showed that, unlike Rev 1 Elberg strain, all eight Rev 1 strains evaluated have no susceptibility to safranin or fuchsin at a 1:50,000 concentrations (Table 2). *B. melitensis* 16

Cuadro 1. Resultados a las pruebas bioquímicas, de las cepas vacunales y de referencia

Table 1. Results of biochemical tests with vaccine and reference strains

| Strain | Tests | | | | | |
|--|-------|------------------|----------------------|---------|-----|---------|
| | Urea | H ₂ S | CO ₂ Req. | Citrate | TSI | Oxidase |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 reduced dose* | + | - | - | - | - | - |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 regular dose* | + | - | - | - | - | - |
| <i>B. melitensis</i> 16 M | + | - | - | - | - | - |
| <i>B. melitensis</i> field strain (133), biotype 1 | + | - | - | - | - | - |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 Elberg | + | - | - | - | - | - |
| <i>B. abortus</i> 144 | - | + | + | - | - | - |

TSI = triple sugar iron

* 4 serials

Cuadro 2. Resultados del crecimiento de de las cepas vacunales y de referencia a los colorantes fucsina y tionina

Table 2. Growth results of vaccine and reference strains in the face of fuchsin and thionine dyes

| Strain | Fuchsin | Fuchsin | Thionine | Thionine | Thionine |
|--|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| | 1/100,000 | 1/50,000 | 1/100,000 | 1/50,000 | 1/25,000 |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 reduced dose* | + | + | + | - | - |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 regular dose* | + | + | + | - | - |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 Elberg | + | - | +/- | - | - |
| <i>B. melitensis</i> 16 M | + | + | + | + | + |
| <i>B. melitensis</i> field strain | + | + | + | + | + |
| <i>B. abortus</i> 144 | + | + | - | - | - |

* 4 serials

metabólica (Cuadro 1). Con relación a la tinción de gram, se observaron bacilos pequeños característicos de *Brucella*, y las colonias midieron entre 1.3 a 1.5 mm, siendo siempre más grandes que las de las cepas testigo.

En la prueba de susceptibilidad a colorantes se encontró que a diferencia de la cepa Rev 1 Elberg, las ocho cepas evaluadas de Rev 1 no fueron susceptibles a safranina, ni a fucsina en concentración 1/50,000 (Cuadro 2). La cepa de referencia *B. melitensis* 16 M y la cepa de campo (133), no fueron inhibidas por ninguno de los colorantes probados a ninguna concentración.

La susceptibilidad de las cepas vacunales a los antibióticos no se vio modificada, ya que fueron sensibles a penicilina y resistentes a estreptomycin.

Mediante la prueba de acriflavina y la tinción de cristal violeta se determinó que las cepas de los ocho lotes vacunales estaban en fase rugosa, a diferencia de las cepas usadas como control que son cepas en fase lisa.

Los resultados de la fagotipificación mostraron que las cepas evaluadas de Rev 1 fueron lisadas por los fagos Wb, Tb, Iz y R/C. La cepa Rev 1 Elberg, la 16 M y la cepa de campo (133) de *B. melitensis* biotipo 1, solamente fueron lisadas por el fago Iz. La cepa de *B. abortus* 144 fue lisada por Tb y WB, parcialmente por Iz, y no presentó lisis por R/C (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

La identificación de la cepa Rev 1 de *B. melitensis* por los métodos convencionales no representa ninguna dificultad, y la fagotipificación es una técnica que se puede realizar simultáneamente a las pruebas de crecimiento en colorantes.

No es común la variación espontánea en algunas de las características de *Brucella* en cultivo, esto usualmente resulta de mutaciones que involucran la modificación de características individuales. Probablemente la mutación más frecuente es la producción de variantes no lisos de microorganismos

M reference strain and *B. melitensis* (133) field strain were not inhibited by any of the dyes tested, at any concentration.

Antibiotic susceptibility of vaccine strains remained unchanged, since they were sensitive to penicillin and resistant to streptomycin.

Both the acriflavine test and the crystal violet stain determined that the strains of all eight vaccine serials were in the rough phase, unlike the control strains that are in the smooth phase.

Phage typing results showed that Rev 1 strains were lysed by Wb, Tb, Iz and R/C phages, while *B. melitensis* Rev 1 Elberg, 16 M, and biotype 1 (133) strains were only lysed by bacteriophage Iz. *B. abortus* 144 strain was lysed by TB and WB, partially lysed by Iz, and non lysed by R/C (Table 3).

DISCUSSION

The identification of *B. melitensis* Rev 1 strain using conventional methods is not at all difficult, and phage typing is a technique that can be used simultaneously with the on-dye-growth tests.

Spontaneous variation of some culture traits of *Brucella* is uncommon, but this typically results from mutations involving the modification of

Cuadro 3. Resultados de la fagotipificación de las cepas vacunales y de referencia

Table 3. Phage typing results of vaccine and reference strains

| Cepa | Phages | | | |
|--|--------|----|----|-----|
| | Wb | Tb | Iz | R/C |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 reduced dose* | L | L | L | L |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 regular dose* | L | L | L | L |
| <i>B. melitensis</i> Rev 1 Elberg | NL | NL | L | NL |
| <i>B. melitensis</i> 16 M | NL | NL | L | NL |
| <i>B. melitensis</i> field strain | NL | NL | L | NL |
| <i>B. abortus</i> 144 | L | L | L | NL |

* 4 serials

L= lysis; NL= no lysis

en fase lisa (disociación), la mutación contraria también puede ocurrir, pero con menor frecuencia. En este estudio las cepas vacunales probadas, presentaron una morfología rugosa, y además una diferencia en cuanto a la susceptibilidad a fucsina, el cual se ha mencionado con cierta frecuencia en aislamientos de campo de *B. melitensis*^(7,11). Se ha sugerido que las variaciones de *B. melitensis* a la fucsina, desde el punto de vista molecular, está dada por la actividad de las proteínas del grupo 2 de la membrana externa⁽¹²⁾.

Un hallazgo importante en este estudio con respecto a la fagotipificación, fue que las cepas provenientes de los ocho diferentes lotes de vacuna fueron lisadas por todos los bacteriófagos, y no únicamente por el bacteriófago Iz, como era de esperarse. Se ha encontrado que *B. melitensis* aún en fase rugosa no es lisada por el bacteriófago R/C⁽¹³⁾ a diferencia de estas cepas, las cuales fueron lisadas por este fago. Se puede pensar que estas cepas sufrieron un cambio en los receptores específicos hacia los bacteriófagos. Estos resultados difieren de los publicados en otros estudios, donde la posible falta de receptores impiden la acción de lisis de los bacteriófagos a las diferentes especies de *Brucella*, tanto lisas como rugosas.

El fago Iz, fue capaz de lisar a las cepas de los ocho lotes de *B. melitensis* Rev 1, lo cual ha sido mencionado para algunas cepas rugosas de *B. suis* y de *B. melitensis*⁽¹³⁾. Lo anterior difiere de lo acotado por Rigby *et al.*⁽⁷⁾, quienes mencionan que este bacteriófago no lisa a brucelas rugosas, como *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* 115.

En *B. abortus* cepa lisa se ha publicado la capacidad de adsorción del bacteriófago, pero no su penetración y replicación, mostrando una resistencia a la lisis⁽¹¹⁾, sin embargo, no se han mencionado cepas que sean lisadas por un gran número de fagos como las cepas de este estudio.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Con base a los resultados obtenidos, se demuestra la necesidad de incluir a la fagotipificación como una prueba a realizar en el control de calidad de

individual traits. Probably the most frequent mutation is the production of non-smooth variants of smooth-phase organisms (dissociation). The opposite mutation can also occur, but it is less frequent. In this study, the vaccine strains tested showed rough morphology, and they also showed a difference regarding the susceptibility to fuchsin. This has been mentioned with relative frequency for certain *B. melitensis* field isolates^(7,11). It has been suggested that variations of *B. melitensis* regarding fuchsin susceptibility –from the molecular stand point– is dictated by the activity of external membrane group 2 proteins⁽¹²⁾.

As far as phage typing is concerned, an important finding in this study was that all eight vaccine serial strains were lysed by all of the bacteriophages, and not only by Iz, as expected. It has been found that *B. melitensis* –even in its rough phase– is not lysed by bacteriophage R/C⁽¹³⁾ unlike these strains, that were lysed by such bacteriophage. It can be hypothesized that these strains presented a change in bacteriophage-specific receptors. These results differ from those published elsewhere, where the possible lack of receptors prevent the lytic action of bacteriophages on different *Brucella* species, both smooth and rough.

Phage Iz was able to lyse all eight *B. melitensis* Rev 1 vaccine strains. This has also been mentioned for some *B. suis* and *B. melitensis* rough strains⁽¹³⁾. This differs from Rigby *et al.*⁽⁷⁾, who reported that this particular bacteriophage does not cause the lysis of rough brucellae, such as *B. abortus* RB51 and *B. melitensis* 115.

Regarding *B. abortus* smooth strain, bacteriophage adsorption ability but no penetration or replication showing resistance to lysis⁽¹¹⁾– have been reported. Nevertheless, strains lysed by a great number of bacteriophages (as is the case of the strains reported herein) have not been reported.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Our results show the need of including phage typing as one additional quality control test of *B. melitensis* Rev 1 vaccine seed. This will allow for the detection

la semilla para la preparación de vacuna de *B. melitensis* Rev 1, lo que permitirá detectar cambios no identificados por las pruebas tradicionales. Los patrones de susceptibilidad a bacteriófagos es uno de los más importantes para la definición de las especies de *Brucella*. Para la identificación es conveniente usar preparaciones de bacteriófagos estandarizados a la dilución corriente de prueba. Cambios en el comportamiento a la fagotificación pueden indicar alteraciones en el comportamiento de las cepas, por otro lado se ha mencionado variación con relación a virulencia, como es el caso de la cepa de *B melitensis* Rev 1 FSA, que es tan patógena como una cepa de campo.

of changes not identified by traditional assays. Bacteriophage susceptibility patterns have a paramount importance for the definition of *Brucella* species. For identification purposes, it is wise to use standardized bacteriophage preparations at the current assay dilution. Phage type behavioral changes might indicate strain behavior alterations. On the other hand, virulence variations have been reported, such as the case of *B melitensis* Rev 1 FSA strain, which is as pathogenic as a field strain.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Alton GG, Elberg SS. Rev1 *Brucella melitensis* Vaccine. *Vet Bull* 1967;37:793-800.
2. Elberg SS. Rev1 *Brucella melitensis* vaccine Part II 1968-1980. *Vet Bull* 1981;51:67-73.
3. Pieterse PM, Gummow B, Pefanis S, Venter GC, Herr S. The characteristics of a variant strain of *Brucella melitensis* Rev 1. *Onderstepoort J Vet Res* 1988;55:15-17.
4. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 6th report. In: World health organization technical report series No. 740, Geneva WHO. 1986.
5. Corbel MJ, Brinley-Morgan W. Genus *Brucella*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, MD: The Williams and Wilkins Co; 1984:377-388.
6. Corbel MJ, Gill WP, Thomas EL. Methods for the identification of *Brucella*. Research section. Diseases of breeding. Department central veterinary laboratory. New Haw, Weybridge. 1983.
7. Rigby CE, Cerqueira CM, Kelly AH, Surujballi OP. Properties and partial genetic characterization of Nepean phage and other lytic phages of *Brucella* species. *Can J Vet Res* 1989;53:319-325.
8. Corbel MJ. Recent advances in *Brucella* phage research. *Veter Bull* 1984;54:65-74.
9. Marin AC, Blasco MJM. Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis animal. En: Diagnóstico de brucelosis animal. México DF: INIFAP;2001:28-55.
10. White PG, Wilson JB. Differentiation of smooth and non-smooth colonies of *Brucellae*. *J Bact* 1951;61:239-240.
11. Corbel MJ, Morris JA. Studies on a smooth resistant variant of *Brucella abortus* II. Mechanism of phage resistance. *Br J Exp Pathol* 1975;56(1):1-7.
12. Menachem B, Mayer I, Cohen A. Isolation, Identification and characterization in Israel of *Brucella melitensis* Biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *J Clin Micro* 1990;1057-1059.
13. Corbel MJ, Thomas EL. Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Res Vet Sci* 1985;38:35-40.