

Immuno-electrophoretic Analysis of *Brucella suis*

By classical serological methods, 2-4 antigenic components are reported¹⁻³ in strains of *Brucella suis* organisms. With the Ouchterlony method, from 1-11 antigenic components have been described⁴⁻¹⁰; and by the immuno-electrophoretic method, 2 bands have been found in *Br. suis*¹¹. The present report describes the immuno-electrophoretic analysis of 5 *Br. suis* antigen preparations. The purpose of this study has been to explore the relationship between the complexity of each antigen preparation and the antibody response in infected humans and rabbits.

Material and methods. Several antigen preparations were obtained from *Br. suis* strain 1330, cultured for 3 days on trypticase soy agar. Aqueous extract of acetone-dried brucella (AD)⁸, phenol extract of viable brucells (F) and aqueous extract by cryolysis (C) were used. These were lyophilized to a final concentration containing 1.5% proteins. In addition, an aqueous ether extract (EA), obtained following the method of FOSTER and RIBI⁹, and a

heat extract (H) of phenol-killed brucella prepared according to REDFEARN¹⁰, were also studied.

Rabbit immunosera were prepared by 18 s.c. inoculations of acetone-dried bacteria (anti *Br. s.* 72) and lyophilized phenol-killed *brucella* (anti *Br. s.* 73). Rabbit immunoserum anti *Br. s.* was a mixture of equal volumes of anti *Br. s.* 72 and *Br. s.* 73 immunosera. Infected rabbit serum anti *Br. s.* 58 was prepared by 2 challenge doses at an 8-week interval of $5 \cdot 10^8$ viable *brucella*.

Immuno-electrophoresis was performed according to the SCHEIDEGGER¹² micromethod, with slight modifications as previously described¹³.

Results and discussion. Figure 1 is a diagrammatic representation of bands obtained. None of the antisera reacted with trypticase soy antigen by the Ouchterlony method and immuno-electrophoresis. The electrophoretic mobility relative to human albumin is listed in the Table.

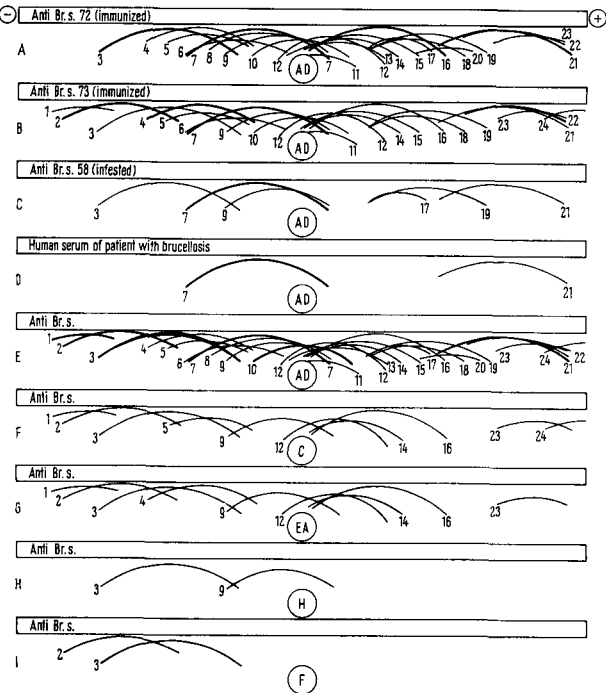


Fig. 1. (A-D) Immuno-electrophoretic patterns of acetone-dried extract developed with several antisera. (E-I) Immuno-electrophoresis of extract AD, C, EA, H and F developed by immunoserum anti *Br. s.*

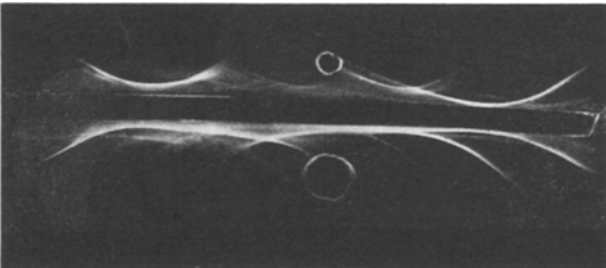


Fig. 2. Photographic illustration of immuno-electrophoretic pattern between AD extract and anti *Br. s.* immunoserum.

Relative mobility of antigenic compounds of *Br. suis* antigen preparations in immuno-electrophoresis and antibodies to the antigenic components found in infected rabbits

Band designation	Relative mobility (Ux/U albumin)	Antigenic components					Antibodies in infected rabbits
		AD	H	C	EA	F	
1	0.07	+		+	+		
2	0.16	+		+	+	+	
3	0.27	+	+	+	+	+	+
4	0.33	+			+		
5	0.35	+		+			
6	0.44	+					
7	0.46	+					+
8	0.48	+					
9	0.52	+	+	+	+		+
10	0.58	+					
11	0.64	+					
12	0.66	+		+	+		
13	0.66	+					
14	0.66	+		+	+		
15	0.70	+					
16	0.76	+		+	+		
17	0.82	+					+
18	0.85	+					
19	0.88	+					+
20	0.93	+					
21	1.05	+					+
22	1.08	+					
23	1.13	+		+	+		
24	1.29	+		+			

¹ S. G. WILSON and A. A. MILES, *Br. J. exp. Path.* 13, 1 (1932).
² A. L. OLITZKI and J. GUREVICH, *Zentbl. Bakt. ParasitKde. I.* 128, 112 (1933).
³ C. RENOUX and L. W. MAHAFFEY, F.A.O./W.H.O. *Joint Advisory Panel on Brucellosis*, Feb. 10 (1955).
⁴ A. L. OLITZKI and D. SULITZEANU, *Proceedings of the Third International Meeting of Biological Standardization* (Opatija, 1957), p. 321.
⁵ L. CARRERE, J. ROUX, and A. SERRE, *Annls Inst. Pasteur, Paris* 15, 588 (1958).
⁶ A. L. OLITZKI and D. SULITZEANU, *Br. J. exp. Path.* 40, 432 (1959).
⁷ J. PARNAS and H. BURDAY, *Pathologia Microbiol.* 24, 341 (1961).
⁸ A. L. OLITZKI and D. SULITZEANU, *Br. J. exp. Path.* 39, 219 (1958).
⁹ J. W. FOSTER and E. RIBI, *J. Bact.* 84, 258 (1962).
¹⁰ M. S. REDFEARN and D. T. BERMAN, *Bull. Wild Hlth Org.* 23, 133 (1960).
¹¹ J. ROUX and A. SERRE, *Annls Inst. Pasteur, Paris* 104, 238 963(1).
¹² J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 7, 163 (1955).
¹³ A. CHORDI and I. G. KAGAN, *J. Immun.* 93, 439 (1964).

Immunoelectrophoresis of AD antigen developed with Br. s. immunoserum showed 24 different antigenic components. Figure 2 is a photographic reproduction of this system. These 24 bands are only the soluble antigenic components. The discrepancy between the two bands found by ROUX and SERRE¹¹ and the maximum of 24 found by us, we believe to be due to the differences in individual animals' responses to the methods of immunization and to minor differences in the technique of immunoelectrophoresis.

The antigenic components with which we have been working include the principle soluble components important in the classical type of serological diagnosis of brucellosis infections. In this study rabbits infected with viable *Br. suis* microorganisms produced antibodies to components Nos. 3, 7, 9, 17, 19 and 21. Human sera from patients infected with *Br. melitensis* exhibited antibodies to antigenic components Nos. 7 and 21. It appears that antigen preparations H (heat extract), C (extract by cryolysis), EA (FOSTER and RIBI¹⁰) and F (phenol extract)

lack essentially 4 or 5 of the 6 principle antigens. Antigen AD (acetone-dried *brucella*) contained all the components important in serodiagnosis¹⁴.

Resumen. Se encontraron 24 diferentes componentes antigénicos. Los conejos infestados producían anticuerpos detectables contra 6 componentes. El extracto acuoso de *brucellas* desecadas por acetona mostró ser el más adecuado para el diagnóstico serológico.

R. DIAZ and A. CHORDI

Department of Microbiology, University of Navarra, Pamplona (Spain), January 15, 1966.

¹⁴ We thank Dr. A. Foz, University of Barcelona, Spain, for the kind supply of strain *Br. suis* 1330.

Note sur l'activité du nitrothiamidazole¹ dans l'anguillulose

L'entérite rebelle à *Strongyloïdes stercoralis* est très répandue en zone tropicale. Souvent les malades viennent consulter pour des douleurs intestinales avec diarrhée et l'examen coprologique permet de dépister la présence de larves rhabditoïdes².

DUPEYRON et CUSSET³ ont pu mettre en évidence dans la même région, que l'anguillulose venait en deuxième position après l'anquilostomiase et avant l'amibiase. Les mêmes auteurs soulignent que dans nos régions «l'anguillulose ne mérite pas à coup sûr la réputation d'habitude bénigne que certains auteurs lui accordent en quelques lignes». Nos constatations personnelles rejoignent les leurs.

C'est la raison pour laquelle, ayant essayé avec succès le nitrothiamidazole (CIBA 32.644-Ba) ou Ambilhar® dans d'autres parasitoses intestinales (bilharziose intestinale, amibiase), vésicales (bilharziose vésicale)⁴ et ainsi que contre la dracunculose, il nous a paru intéressant de l'expérimenter dans l'anguillulose pour laquelle la thérapeutique a été longtemps assez décevante.

Nous avons utilisé le CIBA 32.644-Ba sous forme de comprimés dosés à 500 mg. Tous les traitements ont été faits par voie orale.

Conditions de travail. Nous rapportons les 12 premiers malades les plus intéressants chez lesquels nous avons trouvé la symptomatologie la plus complète de l'anguillulose et sans ambiguïté. Tous nos malades ont présenté depuis plusieurs mois, certains depuis des années, des diarrhées intermittentes accompagnées de douleurs généralement coliques.

En zone tropicale de nombreuses parasitoses provoquent des diarrhées ou des alternances de diarrhée et de constipation. De plus l'anguillulose est souvent associée à d'autres parasites intestinaux (notamment les ankylostomes), dont l'imbrication complique le rôle pathogène exact que l'on doit attribuer aux larves d'anguillules.

Nous n'avons retenu ici que les cas où les phénomènes diarrhéiques douloureux nous paraissaient avoir pour signature la présence unique de larves de strongyloïdes,

dans les examens de selles répétés à plusieurs reprises et pendant plusieurs jours. Nos analyses de selles ont été faites immédiatement après défécation, pour éviter de confondre larves d'anguillules et larves d'ankylostomes.

Tous nos malades étaient atteints d'une asthénie assez importante, s'accompagnant de phénomènes de neurasthénie chez deux d'entre eux, plus aptes à comprendre leur état. A l'interrogatoire nous avons également noté des amaigrissements, de l'anorexie et des syndromes thoraciques diffus. Presque tous nos malades ont signalé des lombalgies, accompagnant les douleurs abdominales, qui ont d'ailleurs rétrocedé après le traitement.

Trois malades ont signalé des démangeaisons avec petite éruption légèrement papuleuse permettant de penser à la période d'invasion, de pénétration des larves à travers la peau. Mais c'est l'examen répété des selles fraîches qui en définitive a guidé notre diagnostic, notre action thérapeutique et nos contrôles.

Traitement et résultats. Le caractère tenace de l'anguillulose est bien connu et les résultats d'un traitement risquent d'être compromis par l'importance que revêt le péril fécal en zone tropicale. Cependant en attendant les progrès de lutte contre le péril fécal, pour éviter les réinfestations quasi permanentes, il est capital de pouvoir débarrasser, même momentanément, des malades atteints d'anguillulose. La plupart de nos malades sont venus de la campagne pour résider en ville et ont ainsi eu moins d'occasion de se recontaminer.

Doses: 2 malades ont reçu 25 mg/kg/jour pendant 4 jours consécutifs; 2 malades 30 mg/kg/jour pendant 4 jours consécutifs; 4 malades 25 mg/kg/jour pendant 5 jours consécutifs; 4 malades 25 mg/kg/jour pendant 7 jours consécutifs. Les premiers malades furent traités pendant 7

¹ CIBA 32.644-Ba commercialisé sous le nom d'Ambilhar®, rapport CIBA 1965, Bâle, Suisse.

² G. RAFFIER, Acta trop. 22, 350 (1965); Méd. trop. 26, 39 (1966).

³ G. DUPEYRON et J. CUSSET, Méd. trop. 25, 631 (1965).

⁴ Activité de l'Ambilhar® dans la Bilharziose, essai d'éradication, rapport conférence O.C.C.G.E. Babo-Dioulasso (Hte. Volta), Mars 1966.