

Aus dem Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
des Fachbereichs Veterinärmedizin
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

**Development of an indirect ELISA for the diagnosis of
ovine dicrocoeliosis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alessandro Broglia
Tierarzt aus Italien

Berlin 2006

Journal-Nr 3004

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. R. Schuster
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. P. Lanfranchi
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. T.Hiepe

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dicrocoelium dendriticum; ELISA; sheep disease; parasitosis; diagnostic techniques;
immunodiagnosis

Tag der Promotion: 22.06.2006

TABLE OF CONTENTS

FIGURE LIST.....	i
TABLE LIST.....	iii
1. INTRODUCTION.....	1
2. LITERATURE REVIEW.....	3
2.1. Taxonomy of <i>Dicrocoelium</i> spp.....	3
2.2. Species.....	3
2.3. Morphology.....	4
2.4. Life cycle.....	4
2.5. Epidemiology.....	5
2.5.1. Environmental factors.....	5
2.5.2. Intermediate hosts.....	6
2.5.3. Definitive host.....	7
2.6. Pathogenesis, clinical findings and lesions.....	9
2.7. Diagnosis.....	11
2.7.1. Direct methods.....	11
2.7.2. Indirect methods.....	12
2.7.2.1. <i>The indirect ELISA (Enzyme-Linked</i>	
<i>Immunosorbent Assay)</i>	13
2.7.2.2. <i>Enzyme-Assisted Immunoelectroblotting</i>	14
2.8. Treatment and control of dicrocoeliosis.....	17
3. MATERIALS AND METHODS.....	20
3.1. Study area.....	20
3.2. Experimental infection.....	22
3.3. Enzyme -Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	23
3.3.1. Antigen preparation.....	23
3.3.2. Setting ELISA parameter.....	24
3.3.2.1. <i>Titration of antigen</i>	24
3.3.2.2. <i>Titration of serum</i>	24
3.3.2.3. <i>Conjugate and substrate</i>	24
3.3.2.4. <i>Implementation of ELISA test</i>	25
3.3.2.5. <i>Cut-off definition</i>	26
3.3.3. Cross-reaction with other parasitic infections.....	26
3.3.3.1. <i>Cross-reaction with <i>Fasciola hepatica</i> and</i>	
<i>Paramphistomum spp</i>	26

3.3.3.2.	<i>Cross-reaction with nematode parasite infection</i>	27
3.4.	Enzyme Immune Transfer Blotting (EITB)	28
3.4.1.	Sample treatment.....	28
3.4.2.	SDS PAGE.....	29
3.4.3.	Blotting.....	30
3.4.4.	Immunoassay.....	31
3.4.5.	Determination of protein molecular weight.....	32
3.5.	Field serum samples of sheep flocks from Trentino (Italy)	33
3.5.1.	Serum samples.....	35
4.	RESULTS	37
4.1.	Experimental infection	37
4.1.1.	Ants collection.....	38
4.1.2.	Establishment rate.....	39
4.2.	ELISA test	41
4.2.1.	Determination of protein concentration of antigen solution.....	41
4.2.2.	Antigen and serum dilution.....	41
4.2.3.	Cut off definition.....	41
4.2.4.	Temporal dynamics of IGg response of experimentally infected lambs.....	43
4.2.5.	Cross reaction with other helminths.....	46
4.2.5.1.	<i>Cross -reaction with F. hepatica and Paramphistomum spp</i>	46
4.2.5.2.	<i>Cross-reaction with nematode parasite infection</i>	48
4.3.	EITB test	50
4.3.1.	Proteic fractions <i>D. dendriticum</i> antigens of by SDS-PAGE.....	50
4.3.2.	Antibody response dynamics in experimentally infected lambs.....	51
4.3.3.	Comparative immunoblot with sera of lambs infected with <i>F. hepatica</i>	53
4.3.4.	Comparative immunoblot with sera of lambs infected with others nematodes.....	54
4.4.	Experimental screening of dicrocoeliosis in sheep flocks in North East Italy (Trentino Province)	55
4.4.1.	Detection of <i>D. chinensis</i> in red deer (<i>Cervus elaphus</i>)in province of Trento.....	57
5.	DISCUSSION	59
6.	CONCLUSIONS	67
7.	SUMMARY	69
8.	ZUSAMMENFASSUNG	70
9.	REFERENCES	71

10. APPENDIX.....	85
10.1. Reagents.....	85
10.1.1. Reagents for antigen preparation.....	85
10.1.2. Reagent for ELISA test.....	85
10.1.3. Reagents for SDS-PAGE.....	86
10.1.4. Reagents for Immunoblot.....	87
10.2. Tables.....	89
11. ACKNOWLEDGEMENTS.....	91
12. CURRICULUM VITAE.....	92
13. SELBSTANDIGKEITSERKLÄRUNG.....	93

SUMMARY

Dicrocoeliosis is a parasitic disease caused by trematodes belonging to the genus *Dicrocoelium*. These small liver flukes are found in the bile ducts of the definitive host (ruminants, but also equids, lagomorphs, humans), and usually produce no symptoms; only in massive infections can dicrocoeliosis be diagnosed clinically. For this reason dicrocoeliosis often remains undetected and its diagnosis is mostly based on *post-mortem* examination of the liver or on coprological assays for *in vivo* diagnosis. However, the latter method has scant sensitivity and because of the long prepatency of *Dicrocoelium* spp. only permits late diagnosis.

In the present study, an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique is developed as a potential tool for early serological diagnosis, with higher sensitivity and specificity than current diagnostic techniques.

Antigen used in the ELISA test was prepared from excretory/secretory and somatic products of *D. dendriticum*. Serum samples from experimentally infected lambs and from the field were investigated using the test.

The ELISA test detected antibodies from day 30 post infection, whereas coprological samples were only positive two months post infection. Cross-reactions with other helminths were tested; the test lacked specificity when using somatic antigen, and some cross reactions were detected in animals naturally infected by *Fasciola hepatica*.

The antigens obtained were also processed by electrophoresis on polyacrylamide gel sheets and an immunoblot analysis was performed in order to characterise the protein fractions and their antigenic role in sera of infected sheep.

In a field test 892 sera from sheep of Trentino Province (northeastern Italy) were screened by the ELISA test for dicrocoeliosis. A high proportion of positives were found, from 80 to 100%; this is in accordance with previous surveys carried out in Italy.

It is concluded that indirect ELISA is a useful method for the diagnosis of dicrocoeliosis in sheep, especially for sero-epidemiological surveys.

ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung eines indirekten ELISA zum serologischen Nachweis der Dikrozölíose beim Schaf

Die Dikrozölíose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Leberegel der Gattung *Dicrocoelium* verursacht wird.

Diese kleinen sog. Lanzettegel dringen in das Gallengangssystem des Endwirtes (Wiederkäuer, aber auch Hasenartige, Equiden, Menschen) ein und verursachen zumeist keine Symptome. Nur beim massiven Befall können klinische Veränderungen festgestellt werden. Daher wird eine Infektion zumeist nicht erkannt und die Diagnose erfolgt hauptsächlich durch die Untersuchung der Leber *post mortem* oder durch den koprologischen Nachweis *in vivo*. Mit der letztgenannten Methode ist aufgrund der langen Präpatenzzeit eine Diagnose erst relativ spät möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, einen indirekten Enzymimmuntest (ELISA) zu entwickeln, mit dem ein früher serologischer Nachweis mit einer höheren Sensitivität und Spezifität als mit den herkömmlichen Tests möglich ist.

Das für den ELISA verwendete Antigen wurde aus exkretorischen/sekretorischen und somatischen Bestandteilen von *D. dendriticum* hergestellt und es wurden Seren von experimentell infizierten Lämmern und Feldseren untersucht.

Schon ab dem 30. Tag nach der Infektion wurden Antikörper mit dem ELISA festgestellt, wohingegen ein koprologisch positiver Nachweis erst 2 Monate nach der Infektion möglich war. Bei der Prüfung des Tests auf Spezifität wurden Kreuzreaktionen mit anderen Erregern bei Verwendung von somatischem Antigen und vereinzelt auch bei Feldinfektionen mit *Fasciola hepatica* nachgewiesen.

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dem Immunoblot wurden die Antigenfraktionen auf ihre immunogenen Eigenschaften untersucht.

892 Feldseren von Schafen aus der Provinz Trento (Nordosten Italiens) wurden mit dem ELISA untersucht, wobei zwischen 80 und 100% der Tiere seropositiv waren, was die Ergebnisse anderer Studien zum Vorkommen der Dikrozölíose in Italien bestätigt.

Nach den eigenen Untersuchungsergebnissen ist der indirekte ELISA eine geeignete Methode zum Nachweis der Dikrozölíose beim Schaf im Rahmen sero-epidemiologischer Studien.

CURRICULUM VITAE

Name: **ALESSANDRO**
Surname: **BROGLIA**
Date of birth: **08th July 1975**
Place of birth : **Monza, Italy**
Nationality: **Italian**

Studies

1989-1994	<ul style="list-style-type: none">• Liceo Scientifico Statale <i>F. Enriques</i>", Lissone, Italy.
1994-2000	<ul style="list-style-type: none">• Veterinary Medicine Degree, University of Milan (Italy), Faculty of Veterinary Medicine.
20 November 2000	<ul style="list-style-type: none">• Professional qualification "<i>Esame di Stato</i>" in Italy.

Professional experiences

1997-1999	<ul style="list-style-type: none">• Assistant in the multimedia room of the library of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Milan.
September 1999-february 2000	<ul style="list-style-type: none">• Veterinary assistant in the Experimental Farm of the Veterinary Medicine Faculty of Universitat Autònoma de Barcelona (Spain).
March 2000-april 2001	<ul style="list-style-type: none">• Veterinary consultant for Natural Park "Paneveggio-Pale di S.Martino" (Eastern Italian Alps).
Since September 2001	<ul style="list-style-type: none">• PhD student at Institut for Parasitology and International Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Free University, Berlin
January 2005-April 2005	<ul style="list-style-type: none">• Scientific employee at Federal Institute for Risk Assessment, Berlin.
May 2003-present	<ul style="list-style-type: none">• Project coordinator for NgO Africa70 – Veterinary Without Borders, Sahrawi refugee camps (Algeria).

Monza, 27.12.2005

Signature