Corso di Laurea in Medicina Veterinaria

Anno Accademico 2014/2015 Sessione I

Laureando Alessandra Tedone

Relatore Antonio Camarda

Email Relatore antonio.camarda@uniba.it

Titolo Tesi di Laurea in italiano

NUOVO PROTOCOLLO DI PCR PER L'IDENTIFICAZIONE DI TREPONEMA PARALUISLEPORIDARUM ECOVAR LEPUS.

Titolo Tesi di Laurea in inglese

NEW PCR METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF TREPONEMA PARALUISLEPORIDARUM ECOVAR LEPUS.

Riassunto in italiano

Il *Treponema paraluisleporidarum* ecovar Lepus è l'agente eziologico della sifilide della lepre, una malattia venerea caratterizzata da manifestazioni cliniche localizzate principalmente a livello genitale, molto simili a quelle riscontrate nel coniglio e provocate dal *Treponema paraluisleporidarum* ecovar Cuniculus. Entrambe le ecovarianti che fanno parte della stessa specie, appartengono al genere *Treponema*, e sono annoverate tra le specie non coltivabili. Del *T.* Lepus sono presenti poche informazioni in letteratura probabilmente anche a causa della scarsa disponibilità di sistemi diagnostici in grado di consentire la sua identificazione e la diagnosi di malattia. Attualmente gli unici metodi utilizzati per la diagnosi della malattia si basano su test sierologici che sfruttano la cross reattività antigenica tra *Treponema pallidum* e *T.* Cuniculus. Inoltre, non esiste, ad oggi, un test che permetta di discriminare in maniera efficace le due ecovar del T. paraluisleporidarum. Scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo diagnostico di PCR in grado di identificare con certezza *T.* Lepus. Per questo sono stati disegnati primer specifici, saggiati *in silico,* che hanno restituito i risultati attesi. Ciascuna coppia di primer non ha dato false positività. I test *in vitro* sono stati effettuati utilizzando due estratti di DNA totale ottenuti a partire da porzioni di testicoli di lepre europea a cui è stata in precedenza diagnosticata clinicamente la sifilide. I test hanno restituito i risultati attesi, confermando prima l'appartenenza dei patogeni al genere Treponema e, successivamente, l'appartenenza degli stessi alla ecovar Lepus. Le prove volte ad escludere eventuali cross reazioni con *T.* Cuniculus hanno costantemente dato risultati negativi. Infine, test di specificità in vitro hanno escluso la possibilità di ottenere falsi positivi nei confronti dei principali patogeni della lepre e del coniglio. Questa metodica rappresenta un primo passaggio verso la messa a punto di un metodo affidabile e discriminante per la diagnosi certa della sifilide sia nelle lepri che nei conigli.

Abstract in inglese

Treponema paraluisleporidarum ecovar Lepus is the etiologic agent of syphilis in hares, a venereal disease characterized by genital lesions. A similar disease is reported in rabbits, caused by *Treponema paraluisleporidarum* ecovar Cuniculus. To date, little information about this disease is available in literature, and effective diagnostic systems for the identification of such pathogens are not common. To date, the diagnosis of the disease is based on *T. pallidum* serological tests, which are also used to identify *T.* Cuniculus in rabbits, but a test to discriminate the ecovars Lepus and Cuniculus is not available. The aim of this study is to develop a PCR-based diagnostic technique to identify *T.* Lepus from biological samples. For this purpose, specific primers have been designed and their specificity has been checked *in silico* and *in vitro*. Total DNA was extracted from testicles of European hare, clinically suspected for syphilis, and it has been used for the *in vitro* tests. As expected, the assays confirmed the presence of the pathogens and its identification as *T. paraluisleporidarum* ecovar Lepus, too. The same PCR protocol was checked against *T.* Cuniculus, returning a negative result. Finally, the *in silico* tests confirmed the negativity of PCR for Rabbit and Hare pathogens other than *Treponema spp*. This method represents a first step towards the development of an affordable and discriminating method for the reliable diagnosis of syphilis in both hares and rabbits.