

Articoli/Articles

QUANDO LA STORIA INCONTRA LA MEDICINA
MOLECOLARE: STORIA MOLECOLARE DELLA
TUBERCOLOSI UMANA

LAURA OTTINI, MARIO FALCHETTI

Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma, I.

SUMMARY

*WHEN HISTORY MEETS MOLECULAR MEDICINE:
MOLECULAR HISTORY OF HUMAN TUBERCULOSIS*

Tuberculosis represents one of the humankind's most socially devastating diseases. Despite a long history of medical research and the development of effective therapies, this disease remains a global health danger even in the 21st century. Tuberculosis may cause death but infected people with effective immunity may remain healthy for years, suggesting long-term host-pathogen co-existence. Because of its antiquity, a supposed association with human settlements and the tendency to leave typical lesions on skeletal and mummified remains, tuberculosis has been the object of intensive multidisciplinary studies, including paleo-pathological research. During the past 10 years molecular paleo-pathology developed as a new scientific discipline allowing the study of ancient pathogens by direct detection of their DNA. In this work, we reviewed evidences for tuberculosis in ancient human remains, current methods for identifying ancient mycobacterial DNA and explored current theories of Mycobacterium tuberculosis evolution and their implications in the global development of tuberculosis looking into the past and present at the same time.

Introduzione

Per la sua antichità, per la presunta associazione con gli insediamenti umani e i modi di sussistenza delle popolazioni, la tubercolosi, “la

Key words: Tuberculosis - Mycobacterium tuberculosis complex -

Mycobacterium tuberculosis - Paleopathology - Ancient DNA.

peste bianca” del XIX secolo, è sempre stata oggetto di studi multidisciplinari di carattere storico e antropologico, epidemiologico e demografico, biologico e medico. La propensione della tubercolosi a lasciare caratteristiche lesioni su resti scheletrici e mummificati ne fa, in particolare, oggetto di studio della paleopatologia, disciplina che, avvalendosi di metodiche d’indagine sempre più sofisticate, dalla tomografia computerizzata alle tecnologie molecolari, consente lo studio delle malattie in antico direttamente nei resti umani del passato. Nel corso del tempo sono state improntate cure sempre più efficaci per combattere la tubercolosi, tanto che dalla metà del XX secolo la si riteneva una malattia debellabile e addirittura si pensava che sarebbe stata definitivamente sconfitta. Questa previsione si è rivelata completamente sbagliata in quanto la tubercolosi sta riemergendo in forma epidemica su scala mondiale. Si stima che circa due miliardi di persone, quasi un terzo della popolazione mondiale, siano state infettate dal bacillo della tubercolosi e nel 2007 oltre un milione di persone sia deceduto per questa malattia. Il riemergere della tubercolosi è principalmente legato alla comparsa di ceppi resistenti agli antibiotici, alle migrazioni e al diffondersi di condizioni di immunodepressione (*HIV*, terapie immunosoppressive, malattie croniche). Solo il 10% degli individui infetti sviluppa una malattia attiva, generalmente coloro che hanno un sistema immunitario meno efficiente, come bambini, anziani o chi soffre di malnutrizione, di altre patologie o è sottoposto a stress psicofisico. La maggior parte degli individui sviluppa un’infezione latente, e ciò indica una lunga convivenza tra l’ospite umano e il batterio patogeno¹.

Per comprendere come la tubercolosi da malattia antica possa essere ancora oggi una minaccia per la salute umana, bisogna guardare a come si sia evoluto nel tempo il rapporto tra la società umana e le malattie infettive. Vari modelli indicano che lo sviluppo delle malattie infettive sia correlato alla numerosità e alla densità delle popolazioni umane. Il lungo stadio di cacciatore-raccoglitore nell’evolu-

zione delle società umane, caratterizzato da popolazioni di piccole dimensioni, ha probabilmente rappresentato una fase di lenta diffusione dei patogeni più aggressivi e avrebbe favorito, invece, la diffusione di patogeni la cui trasmissione poteva avvenire anche decenni dopo l'acquisizione dell'infezione. Nella tubercolosi la maggior parte degli ospiti ha un'infezione cronica, che dura anche tutta la vita, la malattia può essere latente o avere fasi di attività che poi si esauriscono. La tubercolosi presenta due modalità di infezione, una precoce, che riguarda tipicamente la trasmissione verticale madre-figlio, per cui i bambini possono sviluppare una malattia attiva con alta mortalità, e una tardiva, che è tipicamente orizzontale e può portare gli adulti a sviluppare una malattia attiva quando diventano suscettibili per l'abbassamento delle difese immunitarie².

Il passaggio, nel Neolitico, dal nomadismo alla formazione di comunità agricole sedentarie, favorì la diffusione delle malattie infettive poiché le popolazioni divennero numericamente più consistenti e gli insediamenti più affollati. Lo sconvolgimento ecologico, derivante dalla coltivazione, e la crescita dell'ineguaglianza economica e sociale hanno ulteriormente aumentato il rischio di malattie infettive. Altri importanti fattori di rischio per la diffusione delle malattie infettive sono stati la domesticazione degli animali, la progressiva stratificazione sociale, una dieta meno variata e i cambiamenti climatici locali. La rapida urbanizzazione delle società umane e l'occupazione di nuove aree rappresentano due potenti fattori nell'evoluzione delle malattie infettive. In particolare, la confluenza delle civiltà euroasiatiche tra il VI secolo a.C. e il XVI secolo d.C. portò alla formazione di un unico insieme di malattie condivise nel Vecchio Mondo. Le esplorazioni e lo sviluppo dei commerci tra il XV e il XVI secolo rese inevitabile lo scambio di malattie a livello transcontinentale. A partire dalla seconda metà del XVIII secolo, il processo di industrializzazione portò ad una trasformazione sociale e ambientale ancora più grande. Gli abitanti delle città furono costretti a convivere con rifiuti indu-

striali e con l'inquinamento dell'aria e dell'acqua. Le baraccopoli che sorsero nelle città industriali divennero il punto focale della povertà e della diffusione delle malattie infettive. La diffusione della tubercolosi venne facilitata in questa fase dalle pessime condizioni di lavoro e dal sovraffollamento. Negli ultimi decenni i progressi culturali e tecnologici hanno favorito il controllo delle malattie infettive attraverso l'immunizzazione e l'uso degli antibiotici. Ciò ha portato ad un forte aumento della speranza di vita media, alla nascita e all'emergere di malattie cronico-degenerative. D'altra parte, su scala globale, queste condizioni non sono diffuse in maniera uniforme e permangono vaste aree in cui le malattie infettive non sono ben controllate e, in realtà, la tubercolosi sta riemergendo come problema di salute pubblica anche nei Paesi sviluppati³.

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC)

La tubercolosi è causata da un gruppo di specie batteriche strettamente correlate, chiamato complesso del *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC). *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. caprae* sono i membri del complesso del MTBC. Oggi, il principale agente eziologico della tubercolosi umana è il *M. tuberculosis*. Il *M. bovis* ha uno spettro di ospiti più ampio ed è la principale causa di tubercolosi negli animali. Tutt'ora *M. bovis* è causa della tubercolosi nei Paesi in cui non sono presenti efficaci programmi di eradicazione, essendo il latte non pastorizzato e i prodotti caseari infetti la principale via di trasmissione. Anche altri membri del MTBC possono infettare occasionalmente l'uomo, come il *M. canettii*, il *M. africanum* e alcune specie correlate a particolari animali come i volatili (*M. microti*) o le capre (*M. caprae*)⁴.

Lo sviluppo della reazione polimerasica a catena (*polymerase chain reaction*, PCR) per amplificare il DNA e la possibilità di sequenziare il genoma del micobatterio hanno rivoluzionato le modalità di

diagnosi e le conoscenze sulla variabilità genetica del micobatterio stesso, permettendo di esplorare il *pattern* genetico globale delle specie, di comprendere le relazioni evolutive tra i ceppi micobatterici e di identificare patogeni in resti umani antichi⁵. In particolare, il sequenziamento completo dei genomi di *M. tuberculosis* e *M. bovis*, ha permesso di caratterizzare alcuni marcatori genetici usati come *loci target* diagnostici per i saggi di PCR. I *loci target* sono raggruppamenti di brevi sequenze ripetitive palindromiche del DNA dei membri del MTBC, che, per le loro caratteristiche strutturali sono specificamente presenti e costantemente rilevabili nel genoma di un dato ceppo o di una specie di micobatterio, ma non sono osservabili in altri ceppi o specie. La loro funzione è sconosciuta e probabilmente la maggior parte di esse non viene trascritta⁶. Un primo gruppo di sequenze ripetitive sono le sequenze di inserzione, che includono le regioni IS6110 e IS1081, normalmente presenti in copie multiple all'interno delle cellule. Un secondo gruppo è costituito dagli alleli polimorfici del *locus* DR (*direct repeat*), in cui brevi sequenze DR si alternano a regioni spaziatrici non ripetitive; i ceppi differiscono non solo per la variabilità nel numero di sequenze DR, ma anche per la presenza o meno di specifici spaziatori. Il saggio di analisi del *locus* DR è chiamato *spoligotyping*. Ceppi differenti mostrano generalmente delezioni e, dal momento che la perdita delle regioni spaziatrici è unidirezionale, l'analisi di queste alterazioni può suggerire una tendenza evolutiva. Il saggio di *spoligotyping* permette di distinguere chiaramente il *M. bovis* dal *M. tuberculosis* e le differenti famiglie di ceppi sono definite da *pattern* allelici caratteristici⁷. Ulteriori saggi di tipizzazione si basano sull'amplificazione delle VNTR (*variable number tandem repeats*) e delle MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive units*), sequenze ripetute in tandem di 40-100 bp. Per identificare facilmente i vari ceppi, è disponibile un protocollo standardizzato per la tipizzazione MIRU-VNTR e un relativo database internazionale⁸. Altre classificazioni si basano

sull'analisi delle delezioni genomiche, che rientrano nei polimorfismi a lunga sequenza (*large sequence polymorphisms*, LSPs), e sui polimorfismi a singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNP). Gli SNPs si comportano come mutazioni informative dal punto di vista filogenetico perché la scarsa variabilità del DNA del *M. tuberculosis* rende molto improbabili mutazioni ricorrenti e indipendenti. Inoltre, la mancanza di trasferimento genico orizzontale impedisce al *M. tuberculosis* di riacquisire le regioni genomiche che sono state perse e riduce la probabilità di SNPs ricorrenti e indipendenti. Perciò SNPs e LSPs sono marcatori ideali per ricostruire la filogenesi⁹.

MTBC e popolazioni umane

Le analisi molecolari hanno dimostrato che la specie *M. tuberculosis* comprende 6 ceppi filogeografici, ciascuno associato ad una specifica popolazione umana. In ambienti urbani cosmopoliti diversi (San Francisco, Montreal e Taiwan), con tassi diversi di trasmissione della tubercolosi, è stato osservato che uno specifico ceppo micobatterico colpiva più facilmente i pazienti appartenenti ad una popolazione simpatica piuttosto che quelli appartenenti ad una popolazione allopatrica. I casi di tubercolosi nei pazienti allopatrici riguardavano individui con ridotta resistenza immunitaria. Queste osservazioni suggeriscono che uno specifico ceppo micobatterico si sia adattato ad una particolare popolazione umana, ovvero tale ceppo può aver raggiunto una sorta di equilibrio con quella data popolazione tale da consentirgli di sopravvivere. Venendo a contatto con individui di altre popolazioni, con cui non è stato stabilito alcun tipo di convivenza, il ceppo viene sopraffatto a meno che le difese dell'ospite non siano compromesse. Il fatto che siano le caratteristiche della popolazione ospite a determinare l'ampiezza della manifestazione clinica della tubercolosi in una comunità, è del resto coerente con il notevole grado di conservazione del genoma del *M. tuberculosis*. La forte associazione tra il luogo di

nascita dell'ospite e il genotipo del parassita è una delle conseguenze evolutive della lunga associazione uomo-patogeno¹⁰. Quindi, i bacilli tubercolari si differenziano per distribuzione geografica, ospite preferenziale, virulenza e relativa infettività per l'uomo. Le specie che infettano l'uomo sono geneticamente eterogenee e possono essere correlate alle antiche migrazioni umane fuori dall'Africa, così come ai movimenti delle popolazioni umane in Europa, India e Cina risalenti a qualche centinaio di anni fa¹¹.

In base all'analisi dei polimorfismi genetici del MTBC si può ipotizzare che il complesso sia derivato clonalmente da un organismo simile al *M. canetti*, il quale potrebbe essere appartenuto ad un gruppo più ampio di organismi del MTBC genotipicamente divergenti, denominato "*Mycobacterium prototuberculosis*". L'antenato del complesso micobatterico emerse circa 40.000 anni fa dal suo progenitore nell'Africa dell'Est, regione da cui nello stesso periodo si diffusero le popolazioni umane moderne. Dati genetici indicano, infatti, che un forte "collo di bottiglia" evolutivo si verificò nel MTBC 20.000-35.000 anni fa. A ciò è seguito, 10.000-20.000 anni più tardi, lo sviluppo di due ceppi principali, uno dei quali passò dagli uomini agli animali. I rappresentanti di questo antico gruppo sono tutt'ora identificabili nell'Africa dell'Est e rappresentano patogeni umani. Ciò suggerisce che MTBC possa essersi evoluto con il genere umano almeno dal tempo dei primi ominidi, tra 2.6 e 2.8 milioni di anni fa.

L'antenato comune più recente di ogni specie può cambiare nel tempo, dal momento che i ceppi si estinguono e le popolazioni si evolvono, ma l'analisi molecolare del DNA antico del *M. tuberculosis* può consentire di caratterizzare ceppi che retrodatano l'antenato comune più recente. L'osservazione di lesioni non specifiche compatibili con la tubercolosi riscontrate in uno scheletro di *Homo erectus* di 500.000 anni fa, indicano appunto l'esistenza di un ulteriore antenato.

Negli anni più recenti, con la crescita esplosiva della popolazione umana e la rivoluzione industriale, i ceppi di *M. Tuberculosis* patogeni per l'uomo si sono espansi notevolmente. Ciò a testimonianza di un parallelismo sorprendente tra l'evoluzione demografica degli esseri umani e quella di uno dei loro principali patogeni¹².

Storia naturale della tubercolosi

La tubercolosi comunemente colpisce i polmoni ma in realtà può colpire qualsiasi organo. Nell'alveolo polmonare i bacilli tubercolari, inalati attraverso aerosol, vengono inglobati dai macrofagi e normalmente sono tenuti sotto controllo dalla risposta immunitaria cellulo-mediata dell'ospite. Questo fenomeno porta alla formazione di granulomi e, eventualmente, di lesioni calcificate. I bacilli possono rimanere dormienti ma vitali per decenni. Se sopraggiunge una compromissione del sistema immunitario, i micobatteri possono riattivarsi e provocare l'insorgere della tubercolosi nel polmone. In un numero ridotto di casi la diffusione dei micobatteri ad altri tessuti attraverso il sistema linfatico e sanguigno, esita in una tubercolosi miliare o extra-polmonare (*extra-pulmonary tuberculosis*, EPTB). Negli adulti immunocompetenti la EPTB primitiva si verifica nel 15-20% dei casi. La presentazione clinica più comune della EPTB è l'infezione dei linfonodi, che si manifesta con un aumento del loro volume. La linfadenite cervicale e le lesioni cutanee in passato erano conosciute come scrofola o *lupus vulgaris*. Versamento pleurico, meningite, lesioni a carico del tratto genito-urinario, dello scheletro, dell'occhio e dell'addome rappresentano altre manifestazioni cliniche della EPTB. La tubercolosi gastro-intestinale può risultare inoltre dall'ingestione di saliva o di prodotti animali infetti e porta ad un'ulteriore trasmissione dell'infezione per via oro-fecale¹³.

M. tuberculosis attraverso l'apparato circolatorio tende a localizzarsi nei tessuti emopoietici, più estesi nei giovani rispetto agli adulti. Così, la tubercolosi nei bambini può causare lesioni distruttive ed

espansive all'interno delle ossa tubulari delle mani e dei piedi (*spina ventosa*), nel cranio e in altre ossa piatte del corpo. Negli adulti le lesioni scheletriche caratteristiche sono la formazione del gibbo (morbo di Pott), lesioni focali della spina dorsale, con conseguente collassamento delle vertebre e secondaria fusione e anchilosi. Altri siti colpiti da lesioni focali sono le articolazioni sacro-iliache e le superfici di giunzione soprattutto delle ossa lunghe degli arti¹⁴. Una reazione periostale a livello delle ossa tubulari, osteoartropatia ipertrofica e osteomielite rappresentano altre lesioni caratteristicamente associate alla tubercolosi.

La tubercolosi scheletrica, che nel 40% dei casi interessa la colonna vertebrale, è in realtà relativamente rara, in quanto si verifica solo nel 3-5% dei casi lasciati al loro decorso naturale. Questo vuol dire che nella maggior parte dei casi di tubercolosi non ci sono lesioni scheletriche e quindi l'incidenza nel passato era senza dubbio più alta di quanto suggerito dalla frequenza delle lesioni ossee rinvenute in resti umani antichi¹⁵.

La tubercolosi nella storia

I primi riferimenti storici alla tubercolosi si ritrovano in un papiro medico risalente al 1550 a.C. in Egitto, in un inno sanscrito (Rig Veda) del 1550 a.C. in India, e in un testo medico del 2700 a.C. in Cina. I medici egizi non avevano individuato la tubercolosi come entità a se stante, ma nei papiri medici è riportata la descrizione di alcune manifestazioni cliniche come la tosse, l'adenite cervicale e l'ascesso freddo sterno-costale o vertebrale. Nella mitologia vedica la tubercolosi è chiamata *yakshma*, ossia consunzione, e ne vengono descritti numerosi sintomi come mal di testa, dolori articolari e febbre. Lo stesso termine di consunzione ricorre nei testi medici cinesi. La tubercolosi fu descritta da Ippocrate (400 a.C.) nelle *Epidemie* e fu documentata da Galeno all'epoca dell'Impero romano. In numerosi testi, che vanno dall'epoca Medievale sino al

XVIII secolo, la malattia è indicata come consunzione, male del re, *lupus vulgaris* o tisi¹⁶. Durante la Rivoluzione Industriale, la tubercolosi raggiunse in Europa livelli epidemici, e tra il XVII e il XVIII secolo fu responsabile di una morte su quattro.

La comprensione della patogenesi della tubercolosi iniziò con il lavoro di Théophile Laennec all'inizio del XIX secolo, e progredì ulteriormente con la dimostrazione della trasmissibilità dell'infezione da *M. tuberculosis* fatta da Jean-Antoine Villemin nel 1865 e con l'identificazione del bacillo tubercolare come agente eziologico della malattia da parte di Robert Koch nel 1882. A partire da Koch, inizia l'era del trattamento razionale della malattia e della prevenzione. Clemens von Pirquet sviluppò il test cutaneo della tubercolina nel 1907, usato tre anni dopo per verificare la presenza di un'infezione tubercolare latente in bambini asintomatici.

La presenza della tubercolosi nell'America pre-colombiana è oggetto di discussione. Si ipotizza che la malattia raggiunse l'America attraverso gli animali o con i primi nomadi che attraversarono lo stretto di Bering almeno 10.000 anni fa. Un'altra ipotesi suggerisce che i ceppi più virulenti dei bacilli tubercolari si siano originati in Europa e si siano diffusi in America durante l'espansione coloniale a partire dal XV secolo¹⁷.

La paleopatologia della tubercolosi

La diagnosi della tubercolosi scheletrica non è semplice da effettuare, a meno che non sia coinvolta la colonna vertebrale. Le lesioni legate alla tubercolosi scheletrica che possono essere rinvenute in sedi diverse dalla colonna possono essere indistinguibili da quelle dovute ad altre patologie. Per cui è buona norma studiare non solo le singole lesioni, ma soprattutto la loro distribuzione nello scheletro e la distribuzione a livello della popolazione esaminata. Come detto precedentemente, i micobatteri sono distribuiti nel corpo dalla circolazione sanguigna e tendono a fermarsi a livello del midollo

ematopoietico presente nell'osso trabecolare del corpo vertebrale, piuttosto che a livello corticale o a livello della cavità midollare della diafisi. La resistenza dell'ospite, la virulenza del bacillo e la quantità iniziale dell'inoculo determinano l'entità della malattia¹⁸. La tubercolosi a livello scheletrico è caratterizzata prevalentemente dalla distruzione del tessuto osseo, con lesioni che sembrano aree di riassorbimento con scarsa presenza di strutture proliferative di reazione. Nelle ossa lunghe il processo è localizzato o a livello delle metafisi o a livello delle epifisi. La formazione di osso di reazione periostale è molto limitato, ad eccezione del caso della *spina ventosa* in cui si verifica la deposizione di nuovo osso sotto al periostio, per cui le ossa metacarpali e le falangi assumono un aspetto fusiforme. Per quanto riguarda le giunture, le più colpite di frequente sono l'anca e il ginocchio. Le giunture vengono distrutte mediante la sostituzione della membrana sinoviale con tessuto tubercolare granuloso; ciò dà luogo a lesioni periarticolari distruttive di forma ovale e dai bordi ben marcati, che colpiscono in maniera identica le due opposte superfici della giuntura stessa. Nel caso di guarigione, le aree colpite vengono rimodellate, a livello vertebrale il contorno osseo appare a pareti lisce e viene ristabilita la densità ossea normale¹⁹.

Numerose condizioni patologiche possono essere erroneamente scambiate per tubercolosi, specialmente quando colpiscono la colonna vertebrale. In particolare si tratta di alcune forme di osteomielite piogena, di alcune forme di artrite, di tumori ossei e di fratture vertebrali. Rispetto all'osteomielite piogena cronica, la tubercolosi produce un più elevato grado di distruzione vertebrale e un più ampio spettro di deformazioni scheletriche (gibbo), non si ha formazione di osso se non in stadi molto avanzati della malattia. Nell'osteomielite da brucella si ha una forte reazione periostale a livello delle ossa lunghe, in quella di origine tifoide le lesioni si concentrano nella regione lombare, e in quella da lesioni fungine si ha il coinvolgimento delle strutture posteriori delle vertebre, raro nella tubercolosi. Per quanto

riguarda le forme di artrite, la demolizione del tessuto osseo è meno prominente ma più veloce nell'artrite settica, mentre l'artrite reumatoide colpisce le giunzioni più frequentemente in maniera bilaterale rispetto alla tubercolosi. La cifosi può essere anche associata a tumori ossei e a fratture vertebrali. La tubercolosi da origine ad una cifosi con angolo acuto in quanto sono coinvolte più vertebre vicine, da una a quattro, mentre nei tumori l'angolo è ottuso e sono coinvolte più di due vertebre non contigue. Le fratture vertebrali riguardano di solito una vertebra e la cifosi non è angolare²⁰.

Anche se si sospetta che la tubercolosi fosse presente già nell'*Homo Erectus*, in cui è stata osservata una lesione a carico della superficie endocranica dell'osso frontale coerente con una diagnosi di leptomeningite tubercolosa²¹, i primi focolai certi sono stati osservati nel bacino del Mediterraneo e nel Nord Europa. In Italia sono state scoperte le prime convincenti evidenze di tubercolosi, cioè le tipiche lesioni a livello della colonna vertebrale descritte in precedenza, su resti scheletrici umani del Neolitico. Un esempio è lo scheletro di una donna di circa trent'anni, risalente ai primi secoli del sesto millennio a.C., trovato in una grotta di Arma dell'Aquila in Liguria. Un altro caso risale ai primi secoli del quarto millennio a.C.: si tratta dei resti ossei di un maschio adolescente provenienti da un sito di Arena Candida in Liguria²². Nel Nord Europa la prima evidenza di tubercolosi è stata trovata in Polonia, nel sito neolitico di Zotla risalente al 5000 a.C.

Frequenti sono i ritrovamenti in Europa di lesioni scheletriche attribuibili alla tubercolosi in individui risalenti all'età romana e, soprattutto, al tardo Medioevo; ciò testimonierebbe la crescente diffusione di questa patologia parallelamente al diffondersi dell'urbanizzazione e all'aumento delle dimensioni e della densità delle popolazioni.

Casi più tardivi si riscontrano in Asia, dove la tubercolosi era presente nel nord-est della Thailandia nell'età del ferro, come testimoniato da reperti rinvenuti in un sito datato VI secolo a.C. In Cina,

in Giappone e in Corea le testimonianze di tubercolosi risalgono a circa 2000 anni fa. Per quanto riguarda l'America, tracce di possibili lesioni tubercolari in epoca precolombiana sono state osservate nel Cile del nord, e la maggior parte di esse risalgono al periodo compreso tra il 500 e il 1000 d.C., epoca in cui erano presenti società pienamente agropastorali²³.

DNA antico e biomarcatori

La presenza del *M. tuberculosis* in resti umani può essere accertata ricercandone sia il DNA sia specifiche molecole, ad esempio acidi grassi presenti nella parete cellulare che fungono da biomarcatori diretti. Il DNA è una molecola instabile e la sua conservazione dipende dalle condizioni ambientali cui è stato esposto piuttosto che dall'età cronologica. Nei campioni antichi di norma predominano il DNA residuo dell'ospite e il DNA della microflora commensale e saprofita, piuttosto che il genoma del patogeno. Devono perciò essere prese accurate precauzioni durante la rimozione dei campioni dai siti archeologici per ridurre al minimo, il rischio di contaminazioni con DNA moderno. Ad oggi, sono stati stabiliti criteri stringenti per lavorare con il DNA antico. In particolare, è fondamentale quantificare il numero di molecole di DNA antico prima di procedere all'analisi di amplificazione, clonaggio e sequenziamento. Inoltre, è importante che i risultati ottenuti siano ripetuti e verificati in laboratori indipendenti, perché campioni diversi e differenze anche piccole nei protocolli possono dare luogo a un successo o a un fallimento. Ad esempio, nel caso della ricerca di micobatteri, la pulitura della superficie esterna di un osso, come una costa adiacente al polmone o alla pleura, eseguita al fine di ridurre la possibilità di contaminazione o per allontanare potenziali inibitori della PCR, può invece inavvertitamente portare alla perdita del DNA del MTBC. Infatti, il legame del micobatterio alla lesione non è saldo, quindi i campioni dovrebbero essere prelevati da siti anatomici appropriati secondo la storia natu-

rale dell'infezione, tenendo conto che la distribuzione del patogeno nell'ospite non è uniforme e varia in base allo stadio e all'intensità dell'infezione stessa oltre che all'efficienza del sistema immunitario dell'ospite²⁴. Oltre che in reperti ossei con lesioni tipiche di tubercolosi, il DNA del *M. tuberculosis* può essere infatti rilevato anche in campioni ossei senza segni evidenti di malattia. Il DNA del MTBC è ricco in guanidina e citosina ed è quindi intrinsecamente più stabile del DNA dei mammiferi (ospite); inoltre, la parete cellulare dei micobatteri, ricca in lipidi, è idrofobica ed estremamente resistente al danno e alla degradazione. Nel complesso comunque la conservazione del DNA del MTBC dipende dalle condizioni ambientali cui sono stati esposti i resti ossei nel corso del tempo²⁵.

Per la prima volta nel 1993, l'uso della PCR consentì di rinvenire il DNA dell'agente causale della tubercolosi in resti scheletrici umani che mostravano lesioni tipiche della tubercolosi ossea. I resti provenivano dall'Europa, dalla Turchia e dal Borneo in un periodo compreso tra il IV e il XVII secolo d.C. Uno studio dell'anno successivo riuscì ad amplificare DNA di *M. tuberculosis* dal tessuto polmonare di una mummia peruviana del X secolo d.C., e nel 1995 un frammento di DNA specifico di *M. tuberculosis* fu amplificato da una lesione vertebrale di una bambina colpita da morbo di Pott e vissuta nel X-XI secolo nel Cile del Nord. Successivamente, DNA di *M. tuberculosis* fu amplificato per la prima volta da una mummia egiziana del Nuovo Regno (1550-1085 a.C.) con segni di tubercolosi polmonare e scheletrica, e subito dopo in un altro individuo con morbo di Pott risalente a 5400 anni fa. Per la prima volta nel 1998, l'analisi di biomarcatori diretti (acidi micolici) affiancò l'amplificazione del DNA di *M. tuberculosis* ottenuta da un frammento di pleura calcificata di individuo vissuto nel VII secolo d.C. e rivenuto nel Negev²⁶, al fine di ottenere una conferma indipendente della presenza della tubercolosi. Tutti i micobatteri, compreso il *M. tuberculosis*, hanno infatti acidi grassi a lunga catena, gli acidi micolici, componenti

caratteristici della parete cellulare. Gli acidi grassi si possono rilevare con la cromatografia liquida ad alta resa e le tecniche attuali permettono di distinguere il MTBC dalle altre specie²⁷.

DNA antico e studi di popolazione

Il DNA antico del MTBC è stato rilevato, come sopra accennato, in numerosi studi che hanno riguardato spesso casi singoli, o limitati a pochi individui, appartenuti a varie popolazioni di epoche diverse e senza che fosse dipinto un quadro specifico della popolazione di appartenenza. D'altra parte, lo studio del DNA antico del MTBC a livello delle popolazioni è particolarmente utile perché rende possibile lo studio dell'interazione ospite-patogeno sul piano molecolare in assenza di trattamenti terapeutici efficaci. Numerosi studi sono stati condotti in popolazioni risalenti a diverse epoche. Uno studio recente è stato condotto su resti scheletrici di circa 9000 anni fa rinvenuti nel sito sommerso di Atlit Yam, nel Mediterraneo orientale, ma senza ottenere risultati conclusivi²⁸. Gli studi morfologici e molecolari, condotti sugli antichi Egizi, hanno invece potuto dimostrare che le infezioni tubercolari erano relativamente frequenti dal periodo pre-dinastico (circa 3500-2650 a.C.) al Periodo Tardo (circa 1450-500 a.C.). La maggior parte delle tombe esaminate era situata nella parte ovest di Tebe e l'incidenza relativamente alta della patologia può essere ricondotta al denso affollamento della città al tempo della sua prosperità. La presenza di un ceppo ancestrale di *M. tuberculosis* è stata osservata nei materiali di epoca pre-dinastica, la presenza di *M. africanum* è stata osservata in individui vissuti all'epoca del Regno Medio (2050-1650 a.C.), mentre ceppi moderni del *M. tuberculosis* sono presenti nei campioni risalenti al Periodo Tardo. La frequenza di infezione, pari a circa 22-28%, non variò di molto nel corso di 2500 anni. Nella popolazione esaminata la maggioranza dei casi (82%) mostrava corrispondenza tra amplificazione del DNA antico di MTBC e presenza di lesione ossee tipiche

della tubercolosi. E' importante sottolineare che anche il 22% di casi con lesioni ossee non specifiche e il 18% dei campioni apparentemente normali mostravano l'amplificazione del DNA di MTBC. Questi ultimi risultati si spiegano col fatto che, come detto in precedenza, la tubercolosi polmonare può portare ad una diffusione sistemica dei micobatteri per via ematica senza il coinvolgimento delle ossa²⁹. Altri studi di popolazione condotti su campioni scheletrici di epoca medievale, rinvenuti in Lituania e Ungheria meridionale, e di età moderna, rinvenuti in Ungheria e Germania, hanno permesso di rilevare nuovamente una buona corrispondenza tra amplificazione del DNA antico di MTBC e presenza di lesione ossee tipiche della tubercolosi con frequenze più basse di amplificazione nei casi con lesioni ossee non specifiche o in campioni apparentemente normali. In particolare, nella serie lituana, è stata osservata una prevalenza della malattia pari al 25%³⁰.

Un interessante studio, condotto su una serie di 263 mummie naturali scoperte in una cripta sigillata della chiesa domenicana di Vác in Ungheria e risalenti al XVIII-XIX secolo, ha permesso di esaminare la tubercolosi in un momento storico in cui la malattia aveva raggiunto livelli epidemici poco prima dell'avvento della rivoluzione industriale in quest'area. Notizie sugli individui sepolti erano disponibili grazie ai registri della chiesa e agli archivi della città. Si trattava per lo più di soggetti appartenenti al clero e a famiglie della classe media, professionisti o abili artigiani. Gli studi radiografici e molecolari hanno permesso di distinguere gli individui morti probabilmente a causa della patologia da quelli che nonostante l'infezione vissero a lungo. In particolare, è interessante il caso di una donna di 95 anni che mostrava alla tomografia una sola lesione calcificata al polmone sinistro positiva per la presenza del DNA del MTBC. Campioni prelevati dal polmone destro e dall'addome della donna erano invece negativi all'analisi molecolare. Questi risultati suggeriscono che probabilmente la donna sia stata affetta da una forma

latente di tubercolosi. Complessivamente il 55% dei casi analizzati mostrava la presenza del DNA del MTBC. A tale riguardo è interessante il caso di un gruppo familiare, madre e due figlie, in cui sono stati identificati due ceppi differenti di *M. tuberculosis*. Ciò suggerirebbe che il contagio potesse avvenire più facilmente attraverso i contatti con la comunità piuttosto che in ambiente domestico³¹.

Negli studi sopra descritti si trova la conferma di come *M. tuberculosis* sia il principale agente eziologico della tubercolosi nell'uomo. Delle altre specie del complesso del MTBC, *M. africanum* è stato trovato in individui vissuti 4000 anni fa in Egitto, e, di recente, sono trovate testimonianze di infezioni sostenute da *M. bovis*. Tracce di questo micobatterio sono state trovate per la prima volta in pastori seminomadi siberiani dell'età del ferro, risalenti al periodo compreso tra il IV secolo a.C. e il IV secolo d.C.. Sia gli animali domestici che quelli selvatici possono fungere da serbatoio di infezione per *M. bovis*, per cui sembra probabile che una convivenza stretta e continuativa con un gregge infetto, come quella sperimentata dai pastori seminomadi siberiani, sia lo scenario più verosimile per il rilevamento di questo organismo. Del resto, il primo riscontro di DNA antico del MTBC riguarda un bisonte del pleistocene di 18000 anni fa³².

Conclusioni

Oggi il tentativo di controllo globale della tubercolosi è messo a dura prova dalla diffusa resistenza del *M. tuberculosis* ai farmaci e dalla co-infezione *M. tuberculosis* - *HIV*. In ogni Paese sottoposto a sorveglianza è stata documentata infatti l'esistenza di ceppi resistenti ad un singolo farmaco e, cosa più importante, sono emersi ceppi resistenti a tutti i principali farmaci antitubercolari. L'emergere della farmacoresistenza rappresenta una seria minaccia ai tentativi di controllare la malattia, specialmente negli scenari in cui molti pazienti affetti da tubercolosi sono anche affetti da *HIV*. In Africa *HIV* è il principale responsabile dell'aumento dell'incidenza della tubercolosi, a partire

dal 1990. *HIV* deprimendo il sistema immunitario, rende molto più probabile lo sviluppo di malattia tubercolare attiva e, a sua volta, la tubercolosi rappresenta una delle principali cause di morte tra i soggetti *HIV*-positivi. Il nuovo campo della paleo-patologia molecolare ha consentito una comprensione più ampia della storia naturale della tubercolosi in epoca antica. I dati molecolari provenienti dal materiale storico hanno permesso di far luce sulle origini del *M. tuberculosis* e degli altri membri del MTBC e contribuito alla comprensione delle interazioni ospite-patogeno. Considerando che il *M. tuberculosis* sta cambiando rapidamente in risposta ai farmaci e ad una popolazione umana che si espande in insediamenti sempre più densi e si sposta rapidamente tra i diversi continenti, una sempre più approfondita conoscenza dei fattori che influenzano la relazione ospite-patogeno è di grande importanza oggi per poter sviluppare terapie e metodi di prevenzione più mirati.

BIBLIOGRAFIA E NOTE

Gli autori sono grati a Erica Pitini per il prezioso aiuto nel raccogliere i dati.

1. HIRSH A.E., TSOLAKI A.G., DERIEMER K. et al., *Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004; 101:4871- 4876; STONE A.C., WILBUR A.K, BUIKSTRA J.E., ROBERTS C.A. *Tuberculosis and leprosy in perspective*. Yearbook of Physical Anthropology 2009; 52:66-94. <http://www.who.int/tb>
2. DONOGHUE H.D. *Human Tuberculosis- an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules*. Microbes and infection 2009; 11:1156-1162; BLASER M.J., KIRSCHNER D., *The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts*. Nature 2007; 449: 843-849; NERLICH A.G., LÖSCH S., *Paleopathology of human tuberculosis and the potential role of climate*. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009; e437187.

3. ARMELAGOS G.J., BROWN P.J., TURNER B., *Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease*. Soc. Sci. Med. 2005; 61:755-765.
4. Cfr DONOGHUE H.D., op. cit. nota 2.
5. Cfr STONE A.C. et al., op. cit. nota 1; AUFDERHEIDE A.C., RODRIGUEZ MARTIN C., *The Cambridge encyclopedia of human paleopathology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1998; SPIGELMAN M., LEMMA E., *The use of polymerase chain reaction (PCR) to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons*. Inter. J. Of Osteoarchaeology 1993; 3: 137-143; SALO W., AUEFDERHEIDE A.C., BUIKSTRA J.E. et al., *Identification of Mycobacterium tuberculosis in pre-Columbian Peruvian mummy*. PNAS 1994; 91: 2091-2094; ORTNER D.J. & AUEFDERHEIDE A.C. (eds), *Human Paleopathology. Current synthesis and future options*. Washington and London, Smithsonian Institution Press, 1991.
6. Cfr DONOGHUE H.D., op. cit. nota 2.
7. KAMERBEEK J., SCHOULS L., KOLK A. et al., *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology*. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 907-914.
8. MATHEMA B., KUREPINA N.E., BIFANI P.J., KREISWIRTH B.N., *Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights*. Clin. Microbiol. Rev. 2006; 19: 658-685. Un database internazionale è disponibile su <http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spoldb4>
9. Cfr MATHEMA B., et al., op. cit. nota 8. BROSCHE R., GORDON S.V., MARMIESSE M. et al., *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 99: 3684-3689.
10. Cfr HIRSH A.E. et al., op. cit. nota 1. GAGNEUX S., DERIEMER K., VAN T. et al., *Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006; 103: 2869-2873; REED M.B., PICHLER V.K., MCINTOSH F. et al., *Major Mycobacterium tuberculosis lineages associate with patient country of origin*. J. Clin. Microbiol. 2009; 47: 1119-1128; DOU H.Y., TSENG F.C., LU J.J. et al., *Association of Mycobacterium tuberculosis genotypes with different ethnic and migratory populations in Taipei*. Infect. Genet. Evol. 2008; 8: 323-330.
11. GUTIERREZ M.C., BRISSE S., BROSCHE R. et al., *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2005; 1:e5. HERSHBERG R., LIPATOV M., SMALL P.M. et al., *High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography*. PLoS Biol. 2008; 6: e311.

12. Cfr GUTIERREZ M.C. et al., op. cit. nota 11; WIRTH T., HILDEBRAND F., ALLIX-BE'GUEC C. et al., *Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex*. PLoS Pathog. 2008; 4: e1000160. HERSHKOVITZ I., DONOGHUE H.D., MINNIKIN D.E. et al., *Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean*. PLoS ONE 2008; 3:e3426. KAPPELMAN J, ALCICEK M.C, KAZANCI N. et al., *First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia*. Am J Phys Anthropol. 2008; 135: 110–116.
13. Cfr DONOGHUE H.D., op. cit. nota 2.
14. Cfr AUFDERHEIDE A. et al., op.cit. nota 5; ORTNER D.J. *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. San Diego: Academic Press, 2003; ROBERTS C., BUIKSTRA J.E. *The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease*. Gainesville, University Press of Florida, 2003.
15. Cfr AUFDERHEIDE A. et al., op. cit. nota 5; Cfr HERSHKOVITZ I. et al., op. cit. nota 12; ORTNER D.J., PUTSCHAR W.G., *Identification of Pathological Conditions on Human Skeletal Remains*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, 1981.
16. Cfr AUFDERHEIDE A.C., RODRIGUEZ MARTIN C., op. cit. nota 5; Cfr. MATHEMA B., et al., op. cit. nota 11; EVANS C.C., *Historical background*. In: DAVIES P.D.O., (ed.), *Clinical tuberculosis*. London, Chapman & Hall Medical 1998, pp. 1–19; ZISKIND B., HALIOUA B., *La tuberculose en ancienne Egypt*. Rev. Mal. Respir. 2007; 24: 1277-1283; SINGH N.K., *Vedic mythology*. APH Publishing Corporation, New Delhi, India, 1997; DANIEL T.M., *The history of tuberculosis*. Respir. Med. 2006; 100: 1862-1870; GRZYBOWSKI S., ALLEN E.A., *History and importance of scrofula*. The Lancet 1995; 346:1472-1474.
17. Cfr DANIEL T.M., op. cit. nota 16; ARRIEZA B.T., SALO W., AUFDERHEIDE A.C., HOLCOMB T.A., *Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence*. Am. J. Phys. Anthropol. 1995; 98: 37-45; ROTHSCHILD B.M., MARTIN L.D., LEV G. et al., *Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present*. Clin. Infect. Dis. 2001; 33: 305-311; CLARK G.A., KELLEY M.A., HILL M.C., *The evolution of mycobacterial disease in human populations*. Curr. Anthropol. 1987; 28: 45-62; GOMEZ I PRAT J., DE SOUZA S.M, *Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98, Suppl. 1: 151-159.

18. PFEIFFER S., *Rib lesions and New World tuberculosis*. Int. J. of Osteoarchaeology 1991; 1 (384): 191-198; ORTNER D.J. & PUTSCHAR W., *Identification of paleopathological condition in human skeletal remains*. Washington, DC, Smithsonian Institution Press, 1985.
19. Cfr AUFDERHEIDE A. et al., op. cit. nota 5, pp. 134-139.
20. Cfr AUFDERHEIDE A. et al., op. cit. nota 5, pp. 140-141.
21. Cfr KAPPELMAN J. et al., op. cit. nota 12.
22. CANCI A., MINOZZI S., BORGOGINI TARLI S., *New evidence of tuberculosis spondylitis from Neolithic Liguria (Italy)*. Int J Osteoarchaeol 1996; 6: 497-501; FORMICOLA V. MILANESI Q, SCARSINI C., *Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millenium B.C. from Arene Candide cave (Liguria, Italy)*. Am J Phys Anthropol 1987; 72: 1-6.
23. Cfr STONE A.C. et al., op. cit. nota 1; TAYLES N., BUCKLEY H.R., *Leprosy and tuberculosis in Iron Age southeast Asia?* Am. J. Phys. Anthropol. 2004; 125: 239-256; SUZUKI T., FUJITA H., CHOI J.G., *Brief communication: new evidence of tuberculosis from prehistoric Korea-population movement and early evidence of tuberculosis in far East Asia*. Am. J. Phys. Anthropol. 2008; 136: 357-360.
24. PÄÄBO S., POINAR H., SERRE D. et al., *Genetic analyses from ancient DNA*. Annu. Rev. Genet. 2004; 38: 645-679; O'ROURKE D.H., HAYES M.G., CARLYLE S.W., *Ancient DNA studies in physical anthropology*. Annu. Rev. Anthropol. 2000; 29: 217-242; DONOGHUE H.D., *Palaeomicrobiology of tuberculosis*. In: RAOULT D., DRANCOURT M. (Eds.), *Paleomicrobiology e Past Human Infections*. Springer-Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, 2008, pp. 75-97; DONOGHUE H.D, SPIGELMAN M., *Pathogenic microbial ancient DNA: a problem or an opportunity?* Proc. R. Soc. B 2006; 273: 641-642.
25. Cfr DONOGHUE H.D., op. cit. nota 24; Cfr. DONOGHUE H.D., op. cit. nota 2. Cfr DONOGHUE H.D., SPIGELMAN M., op. cit. nota 24. ZINK A.R., MOLNAR E., MOTAMEDI N. et al., *Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons*. Int. J. Osteoarchaeol. 2007; 17: 380-391; DONOGHUE H.D., SPIGELMAN M., GREENBLATT C.L. et al., *Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA*. Lancet Infect. Dis. 2004; 4: 584-592.
26. Cfr SPIGELMAN M. et al., op. cit. nota 5; Cfr SALO W. et al., op. cit. nota 5. ARRIEZA B.T. et al., op. cit. nota 17; NERLICH A.G., HAAS C.J., ZINK A. et al., *Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egytian mummy*. Lancet 1997; 350: 1404. CRUBEZY E., LUDES B., POVEDA J.D. et al.,

Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. CR Acad. Sci. Paris 1998; 321: 941-951; DONOGHUE H.D., SPIGELMAN M., ZIAS J. et al., *Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old.* Lett. Appl. Microbiol. 1998; 27: 265-269.

27. Cfr HERSHKOVITZ I. et al., op. cit. nota 12; REDMAN J.E., SHAW M.J., MALLET A.I. et al., *Mycocerosic acid biomarkers for the diagnosis of tuberculosis in the Coimbra skeletal collection.* Tuberculosis (Edinb.) 2009; 89: 267-277; GORDON S.V., BOTTAI D., SIMEONE R. et al., *Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants.* BioEssays 2009; 31: 378-388.
28. Cfr HERSHKOVITZ I. et al., op. cit. nota 12; Cfr STONE C. et al., op. cit. nota 1.
29. Cfr ZINK A. et al., op. cit. nota 25.
30. Cfr ZINK A. et al., op. cit. nota 25. FAERMAN M., JANKAUSKAS R., GORSKI A. et al., *Prevalence of human tuberculosis in a Medieval population in Lithuania studied by ancient DNA analysis.* Ancient Biomolecules 1997; 1: 205-214; MOLNAR E., MACZEL M., MARCSIK A. et al., *Molecular biological investigation of skeletal tuberculosis in a medieval cemetery of Hungary.* Folia Anthropol. 2005; 3: 41-51.
31. FLETCHER H.A., DONOGHUE H.D., HOLTON J. et al., *Widespread occurrence of Mycobacterium tuberculosis DNA from 18th to the 19th Century Hungarians.* Am. J. Phys. Anthropol. 2003; 120: 144-152; FLETCHER H.A., DONOGHUE H.D., TAYLOR G.M. et al., *Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis from a family of 18th century Hungarians.* Microbiology 2003; 149: 143-151.
32. Cfr ROTHSCHILD et al., op. cit. nota 17. TAYLOR G.M., MURPHY E., HOPKINS R. et al., *First report of Mycobacterium bovis DNA in human remains from the iron age.* Microbiology 2007; 153: 1243-1249.

Correspondence should be addressed to:

Laura Ottini, Department of Molecular Medicine, "Sapienza" University of Rome, Viale Regina Elena 324, 00161, Rome, Italy.

Phone: +39-06-49973009; Fax: +39-06-4454820

email: laura.ottini@uniroma1.it