

DIAGNOSI DI *YERSINIA PESTIS* IN DUE BAMBINI MORTI DURANTE L'EPIDEMIA CHE COLPI' IL REGNO DI NAPOLI TRA IL 1656 E IL 1658.

Fasanella A. ⁽¹⁾, Garofolo G. ⁽¹⁾, Scasciamacchia S. ⁽¹⁾, Mercurio V. ⁽¹⁾, Balestrucci A. ⁽²⁾, Bolsi I. ⁽²⁾, Giangrossi L. ⁽¹⁾, Serrecchia L. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Centro di Referenza Nazionale per l'Antrace – Foggia

⁽²⁾ Università degli Studi di Napoli "Federico II", Facoltà di Medicina e Chirurgia – Napoli

⁽³⁾ Acquedotto Pugliese, Bari

Key words: *Yersinia pestis*, plague, epidemic

ABSTRACT

Yersinia pestis DNA has been detected from the dental pulp of unerupted teeth of 2 young people died during the plague epidemic occurred in Kingdom of Naples from 1656 to 1658. The finding from this study confirms that the plague occurred about half 17th century was due to *Yersinia pestis*

INTRODUZIONE

Un'epidemia di peste colpì il Regno di Napoli tra il 1656 e il 1658. In precedenza la malattia si era diffusa dall'Algeria alla Spagna, colpendo la città di Valencia nel 1647, poi quella di Aragona nel 1648 e infine la regione della Catalogna nel 1652. La peste comunque si diffuse anche a molte altre città spagnole. Successivamente l'epidemia raggiunse la Sardegna e da qui i territori delle città di Napoli, Roma e Genova. Per quanto riguarda il Regno di Napoli si ha notizia che nella capitale del Regno, i primi casi furono registrati tra Marzo e Maggio del 1656. Fonti storiche, inoltre, confermano che fu proprio Napoli la prima città ad essere colpita dall'epidemia che successivamente, nonostante le misure restrittive, si propagò in tutto il territorio del Regno (1,2).

Il 26 Maggio del 1656 la nave Sant'Andrea, proveniente da Napoli, approdò nel porto di Barletta. Nonostante i commissari sanitari dell'epoca l'avessero respinta in mare aperto, dopo alcuni giorni cominciarono a essere segnalati i primi casi di malattia.

La peste si diffuse molto rapidamente e raggiunse il picco ad Ottobre dello stesso anno. Da quel momento i casi cominciarono a diminuire e il 22 Giugno del 1657 Barletta fu dichiarata libera dalla peste.

In quasi un anno la malattia uccise tra le 7.000 e le 12.000 persone su una popolazione iniziale stimata intorno ai 20.000 abitanti. E' stato ipotizzato che quell'ondata di peste uccise in tutto il Regno di Napoli oltre 1,250,000 persone(1,2).

Nell'antica chiesa di Sant'Andrea in Barletta, nel corso dei lavori di restauro del 2009 e nella fase di pulizia dei sotterranei, sono emersi i resti (scheletri) di numerosissimi cadaveri. Questa scoperta ha confermato le fonti storiche che indicavano tale chiesa come uno dei sepolcreti comuni utilizzati all'epoca della peste.

La chiesa già in precedenza veniva utilizzata per ospitare tombe di nobili e di ricche famiglie del luogo che sono ancora oggi visibili.

MATERIALI E METODI.

Dopo aver ricevuto le autorizzazioni della Curia, è stato fatto un sopralluogo nei sotterranei della chiesa durante il quale sono stati identificati e raccolti 5 teschi di persone molto giovani.

Come controllo negativo è stato prelevato il teschio da una tomba risalente ad un'epoca antecedente l'epidemia.

Successivamente i teschi sono stati sottoposti ad esame radiografico per l'individuazione dei denti non erotti. (Fig.1). Tali denti sono stati asportati asetticamente.

Dopo un'accurata pulizia ciascun dente è stato diviso lungo la linea sagittale per mettere allo scoperto la polpa dentale. L'idratazione della polpa dentale mummificata è avvenuta in PBS pH 7.2 per 48 h a 37°C.

Il DNA è stato estratto usando il DNAeasy Blood and Tissue kits (Qiagen). Come controllo screening per verificare l'avvenuta estrazione e la presenza di sostanze inibenti è stato utilizzato un test PCR specifico per il DNA mitocondriale umano (3).

Per la diagnosi di *Yersinia pestis* sono state adottate due "suicide PCR" con primers specifici per *pla* gene, una "Sybr green PCR" in real time secondo il protocollo indicato da Skottman *et al.* modificato (4) e una PCR convenzionale in accordo con il metodo indicato da Drancourt *et al.* (5). Per la ricerca di DNA di *Bacillus anthracis* sono state utilizzate PCR di tipo convenzionale utilizzando primers specifici per *pag* gene e *capC* gene (6) e per *Salmonella enterica* serovar *Typhi* utilizzando primers specifici per *narG* gene (7).

Per evitare cross contaminazioni, in tutti i processi di amplificazione è stato sempre utilizzato il controllo negativo mentre non è mai stato utilizzato quello positivo.

Tutti gli ampliconi dei sospetti positivi sono stati sottoposti ad analisi di sequenza.

RISULTATI

Sono stati analizzati 26 denti provenienti da cinque teschi di bambini di un'età compresa tra 5 e 12 anni. Il test PCR real time Sybr green specifico per *pla* gene di *Yersinia pestis* ha evidenziato la positività in 7 campioni e di questi solo due sono risultati positivi al test PRC convenzionale (Fig. 2).

Tutti i campioni sono risultati negativi per *B. anthracis* e *Salmonella*. I risultati del GenBank BLAST relativo alle due sequenze sugli ampliconi delle PCR convenzionali hanno evidenziato una omologia del 100% con le sequenze di riferimento (GenBank accession no. AL109969.1). Tali sequenze sono state depositate in GenBank e visibili al numero di accesso JN208020-JN208021.

CONCLUSIONI

La presenza di DNA di *Yersinia pestis* in due denti provenienti da due teschi distinti e quella sospetta nei rimanenti tre indica che queste persone morirono di peste durante l'epidemia che colpì Barletta tra il 1656 e il 1657. Sebbene non sia universalmente accettato che tutte le ondate di pestilenza avvenute nel passato siano da addebitare a *Yersinia pestis*, diversi lavori hanno confermato che l'agente che causò tra il 16^{mo} e il 18^{mo} secolo le diverse ondate di Black Death in Europa sia appunto tale batterio.

Yersinia pestis è stata confermata in 10 siti localizzati in 5

paesi europei e utilizzando approcci metodologici diversi (8). In Italia è stata confermata a Venezia (14^{mo} - 17^{mo} secolo) (8), Genova (Bastione dell'Acquasola) (14^{mo} secolo) (9), e Parma (16^{mo} - 17^{mo} secolo) (10). Le fonti storiche indicano che l'epidemia di peste che investì Barietta si sviluppò dopo l'arrivo di una nave partita da Napoli quando l'epidemia si era già diffusa, pertanto sulla base di questo dato possiamo ritenere che *Yersinia pestis* è l'agente responsabile dell'epidemia che colpì il Regno di Napoli tra il 1656 e il 1658.

RINGRAZIAMENTI

Grazie ai Mons. Giovan Battista Pichierri Arcivescovo della Diocesi di Trani – Barietta – Bisceglie - Nazareth, a Mons. Saverio Pellegrino e a Mons. Giuseppe Paolillo della Diocesi di Trani – Barietta – Bisceglie – Nazareth. Si ringrazia Aceti Angela, Calvio Salvatore e d'Errico Rosa per il loro supporto tecnico. Il progetto è stato realizzato grazie ai fondi della Ricerca Corrente 2010 del Ministero della Salute

BIBLIOGRAFIA

1. Fusco I. Plague, demography and taxation in the Kingdom of Naples of XVII century [in Italian], Franco Angeli Ed., Milan, 2007
2. Fusco I. The plague of 1656-58 in the Kingdom of Naples: diffusion and mortality [in Italian] Popolazione e Storia. 2009; 1: 115
3. Matheson CD, Vernon KK, Lahti A, Fratpietro R, Spigelman M, Gibson S, Greenblatt CL, Donoghue HD. Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. PLoS ONE 2009; 4(12): e8319
4. Skottman T, Piiparinen H, Hyytiäinen H, Myllys V, Skurnik M, Nikkari S. Simultaneous Real Time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia Pestis*. Eur. Journ. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2006; 26: 207 – 211
5. Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Fozzati L, Dutour O, Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. Proc.Natl. Acad. Sci. 1998; 95:12637-12640.
6. Fasanella A, Losito S, Trotta T, Adone R, Massa S, Ciuchini F, Chiocco D. Detection of anthrax vaccine virulence factors by Polymerase Chain Reaction. Vaccine 2001; 19: 4214 – 4218
7. Papagrigorakis MJ, Yapijakis C, Synodinos PN, Baziotopoulou-Valavani E. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. International Journal of Infectious Diseases 2006;10: 206–214
8. Tran TNN, Signoli M, Fozzati L, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in medieval Venice, Italy, PLoS One 2011; 6(3):e1673
9. Cerutti N, Marin A, Rabino Massa E. Plague in ancient remains: an immunological approach. In: Plague: Epidemics and Societies. Signoli M, Cheve` D, Adalian P, Boetsch G, Dutour O, eds. Fribrenze University Press. 2007; 238–241.

10. Haensch S, Bianucci R, Signoli M, Rajerison M, Schultz M, et al. Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the Black Death. PLoS Pathog. 2010; 6: e1001134.

Fig 1. Radiografia di uno dei teschi prelevati nei sotterranei della Chiesa di Sant' Andrea in Barietta. Il cerchio in giallo evidenzia un dente non eretto.

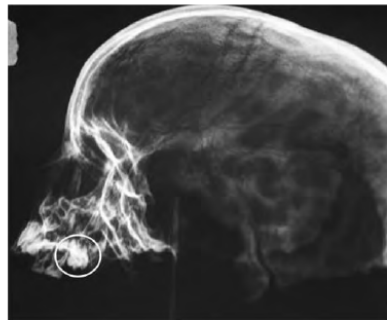


Fig. 2. Elettroforesi in gel di agarosio di prodotti PCR con primers specifici per *plpA* gene (300 bp) di *Yersinia pestis*. M: size marker; 1 – 2: campioni di DNA provenienti da denti non eretti di due bambini; 3: controllo negativo; 4: controllo positivo (amplificato a parte).

