

A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEX ARCHAIKUS DNS KIMUTATÁSA HUMÁN CSONTVÁZMARADVÁNYOKON

Pósa Annamária

Szegedi Tudományegyetem, Embertani Tanszék, Szeged
Témavezetők: Dr. Pálfi György és Dr. Mende Balázs Gusztáv

Pósa A.: *Mycobacterium tuberculosis complex ancient DNA demonstration from human bone remains.* Tuberculosis (TB) is one of the oldest diseases and still has a high prevalence nowadays. The disease is pandemic, according to the estimation of the WHO 30% of total population of the world may be infected latently by *Mycobacterium tuberculosis*.

Since the 1990s the identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection has used molecular methods, too. Paleomicrobial research is also able to identify mycobacterial DNA from ancient human remains.

In my examination I researched six historical periods for TB infection, the earliest period is Neolithic, a few samples from Tápé-Széntégláégető archaeological site, which is a late Bronze Age (BC 14th–13rd century) cemetery, Avar Age samples (Szeged-Kiskundorozsma Kettőshatár II. (Grave No. 263 and Csárdaszállás-Hanzélytanya) are from the age of the Árpáadian Dynasty. The skeletal material came from the Bácsalmás-Óalmás archeological site (AD 16th–17th centuries, southern Hungary) and the remains of Sándor Terézia from the Dominican church of Vác (AD 18th–19th centuries).

During our research program we successfully adopted long standing paleomicrobiological techniques on the indigenous samples, and the TB infection was confirmed in four different ages. Our studies prove that this disease has accompanied the human population during its history – for 7000 years at least. The presence of tuberculosis has been proved in Hungary since the Neolithic, that is why it would be an interesting research topic if we could analyse more earlier periods in the near future. My research has revealed that the preservation of mycobacterial DNA is much more extensive in the case of long bones and teeth, than in the case of vertebrae or ribs. At the same time, data gained indicate the importance of the selection of the sample, as well as parallel sampling individually from long bones and teeth.

Keywords: aDNA; *Mycobacterium tuberculosis*; Paleomicrobiology.

Bevezetés

A tuberkulózis (TBC) az egyik legrégebbi fertőző betegség, a megbetegedések száma napjainkban is nagy méreteket ölt (Ortner 2003, Gutierrez és mtsai 2005, Hershkovitz és mtsai 2008, Donoghue 2009, Baker és mtsai 2015, Donoghue és mtsai 2015, Pálfi és mtsai 2015). A tuberkulózis pandémiás megjelenésű, a Föld lakosságának egyharmada látens *Mycobacterium tuberculosis* hordozó lehet, ami tovább növeli a TBC kutatás jelentőségét.

Sokáig úgy tartották, hogy a *M. tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*-ből alakult ki, a szarvasmarhafélék domesztikációja révén, s fertőzte meg az emberi populációkat (pl.: Cockburn 1963, Ortner 1999). Ez a hipotézis egészen a kétezres évek elejéig tartotta magát, ekkor a molekuláris genetikai kutatások több tanulmányban is rávilágítottak arra,

hogy a *Mycobacterium tuberculosis* ősbibb változat, mint a *M. bovis* (pl.: Brosch 2002, Filliol és mtsai 2006, Hershberg és mtsai 2008). Az is valószínűsíthető, hogy a *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MTBC) tagjai egy közös őstől, a *Mycobacterium prototuberculosis*-tól származnak (Brosch és mtsai 2002), amely együtt evolválódhatott az emberiséggel (Camus és mtsai 2002, Gutierrez és mtsai 2005, Brisse és mtsai 2006, Wirth és mtsai 2008, Comas és mtsai 2013, Weber 2013, Boritsch és mtsai 2014, Bos és mtsai 2014, Donoghue 2017).

A humán tuberkulózis paleopatológiai kutatása gazdag előzményekre támaszkodik: a múlt században nagy számban írták le a betegség tipikus megnyilvánulásait régen élt népeiségek emberi csontmaradványain (pl.: Bartels 1907, Steinbock 1976, Ortner 1999, 2003, Pálfi és mtsai 1999). Az első tanulmányt, amely DNS-alapú molekuláris (paleomikrobiológiai) alapon, archaikus csontmaradványokból mutatta ki a *M. tuberculosis*-t, 1993-ban publikálták (Spiegelman és Lemma 1993), amelyet nagyszámú további publikáció követett (pl.: Nerlich és mtsai 1997, Zink és mtsai 2001, Donoghue 2009, Donoghue és mtsai 2017). Az utóbbi évtizedekben morfológiai alapon több „korai” vagy „atípusos” TBC fertőzései formát azonosítottak, az archaikus DNS-vizsgálatok pozitív eredményei pedig bizonyították, hogy a paleomikrobiológiai diagnosztika az ilyen esetek azonosítására is megbízhatóan használható (Haas és mtsai 2000).

Az elmúlt két évtizedben különböző emberi maradványokat használtak mintaként a MTB archaikus DNS kutatása során. Az újabb kutatások azt igazolták, hogy a hosszú csontok kompakt szövete mellett a fogak is alkalmasak lehetnek a paleomikrobiológiai vizsgálathoz, mivel – intakt fog esetében – a fogbélben található DNS maradványt jól védik a fog külső rétegei (Nguyen Hieu és mtsai 2011).

Célkitűzések

Az archeogenetikai kutatások Magyarországon jelentős múlttal rendelkeznek, azonban a bakterialis DNS detektálása humán maradványokból eddig nem volt jelen a magyarországi vizsgálatok palettáján. Erre eddig csak külföldi laboratóriumok és kizárólag külföldi szakértők bevonásával volt lehetőség.

Mivel Magyarországon nem csekély a morfológiaileg azonosított gümőkórral fertőzött régi esetek száma (pl.: Pálfi és mtsai 1999, Pálfi 2002, Pálfi és Ardagna 2002), fontossá vált, hogy újabb molekuláris vizsgálatokkal is alátámasszuk ezen adatokat.

Doktori kutatásaimban célul tűztem ki:

- a *Mycobacterium tuberculosis* komplex aDNS kinyerési és elemzési technikák elsajátítását külföldi partnerlaboratóriumban, és azok gyakorlati alkalmazását hazai embertani maradványok esetében;

- a baktérium aDNS kinyerése szempontjából optimális anatómiai lokalizációk meghatározását az archaikus csontmaradványokban, elsősorban hosszúcsontok és fogak alkalmazásával;

- a Kárpát-medence több történeti-régészeti korszakában – különösen a TBC paleoepidemiológiája és demográfiai hatása szempontjából kiemelt korszakok esetén – igazolni kívántam a mycobacterialis fertőzések jelenlétét molekuláris biológiai eredményekkel, hogy komplementer vizsgálatként alátámasszam a korábbi morfológiai vizsgálatok eredményeit, és elősegítsem a régen élt népeiségeink komplex biológiai-történelmi rekonstrukcióját;

- az archaikus mycobacterialis fertőzések molekuláris hátterű azonosításának előkészítését Magyarországon, annak érdekében, hogy a későbbiekben hazai

körülmények között is validálni lehessen a külföldön elsajátított korszerű vizsgálati módszereket, és hogy később azokat rutinszerűen alkalmazni lehessen magyarországi minták esetében.

Vizsgálati anyag és módszerek

Paleomikrobiológiai kutatásaimba a tuberkulózis evolúciója, ill. hazai járványtörténete szempontjából fontos, különböző régészeti korszakokból származó emberi maradványokat vontam be. Az összesen hat korszak és az érintett lelőhelyek áttekintése nélkül az eredményeink nem értelmezhetőek, így előbbieket röviden itt ismertetem:

– Alsónyék-Bátaszék 2006–2009 között feltárt prehisztorikus temetőjének jelentőségét az adja, hogy az egyik legrégebbi és legnagyobb közép-európai neolitikori településhez tartozik. A 2359 temetkezés a Késő Neolit/Korai Rézkorból származik (Kr. e. 5000). Az Alsónyék-Bátaszék lelőhelykomplexum része a Lengyel kultúrából származó Alsónyék-Kanizsa dűlő, ahol 862 sírt tártak fel (Zalai-Gaál 2008, Zalai-Gaál és Osztás 2009). Paleomikrobiológiai vizsgálataimba ez utóbbi széria csontmintáit vontam be. A másik tanulmányozott neolitikori temető – Vésztő-Mágori domb – a Tiszai kultúrából származik, ugyanazon kronológiai időszakból. Az előzetes morfológiai vizsgálatok mindkét lelőhelyről valószínűsíthető TBC-előfordulást jeleztek (Spekker és mtsai 2012, Köhler és mtsai 2013).

– Tápé-Széntglaégető lelőhely egy 1960–1966 között feltárt, 686 síros késő bronzkori temető, az innen előkerült emberi maradványok a Kr. e. 14–13. századból származnak. Az antropológiai vizsgálatok eredményeit 1971-ben Farkas L. Gyula és Lipták Pál közzölték, az embertani vizsgálatokba összesen 579 leletet vontak be (Farkas és Lipták 1971). Az SZTE Embertani Tanszékén a közelmúltban megkezdett paleopatológiai vizsgálatok során hét egyén esetében bukkantak TBC-vel összefüggésbe hozható atípusos tünetekre. Molekuláris vizsgálataim számára ez a hét eset szolgáltatott mintát.

– A Szeged-Kiskundorozsma Kettőshatár II. avar kori széria paleopatológiai vizsgálata során a 263-as sírból származó csontmaradványokon atípusos TBC-re utaló elváltozásokat észleltek az SZTE Embertani Tanszék munkatársai. Paleomikrobiológiai kutatásaim lehetőséget teremtettek ennek az esetnek az elemzésére is, hasonlóan egy másik, szintén avar kori, szintén atípusos TBC-s vázmaradvány mintájához, Csárdaszállás-Hanzélytanya lelőhelyről.

– Az 1970 és 1973 között Győr-Pósdomb lelőhelyen feltárt Árpád-kori temető 187-es sírszámú Pott-gibbus-os esetét vizsgáltuk molekuláris biológiai módszerekkel, a csontvázon megfigyelt súlyos morfológiai elváltozások igazolására.

– Kutatásaim fontos anyagát jelentette a Bácsalmás-Óalmás régészeti lelőhelyről származó (16–17. század), 1993–2003 között három fázisban feltárt embertani anyag (Wicker 2006). A késő-középkori népcsoport balkáni eredetű, vallási okból viszonylag endogám közösséget alkottak (Wicker 1999). A feltárások során összesen 481 egyén jó megtartási állapotú, csontvázmaradványai kerültek elő (Lovász és mtsai 2005, 2009, 2013). A szériában megfigyelt nagyszámú TBC-re utaló morfológiai elváltozás orientálta a paleomikrobiológiai mintavételt.

– Kutatásaim egyetlen újkori alanya mumifikálódott emberi maradvány volt. A váci Fehérek temploma 1994-es restaurálásakor bukkantak az Európában is egyedülálló természetesen mumifikálódott emberi maradványokra: a domonkos rendi altemplomban

265 díszes koporsókban eltemetett, részben vagy teljesen mumifikálódott holttestet fedeztek fel (Pap és mtsai 1997). A széria korábbi vizsgálatai magas fokú TBC-fertőzöttséget jeleztek (Fletcher és mtsai 2003). Munkánk során Sándor Terézia mumifikálódott holttestén végeztünk molekuláris biológiai vizsgálatokat *Mycobacterium tuberculosis* aDNS kimutatása érdekében.

Célkitűzéseim között szerepelt, hogy régi csontmintákból minél nagyobb hatékonysággal mutassam ki a tuberkulózis ágensének jelenlétét, ezért olyan módszereket alkalmaztam, a vonatkozó szakirodalmi adatok figyelembevételével, ahol a DNS megőrződése a legnagyobb mértékű és a detektálás sikeressége maximalizálható. Kezdetben fenol-kloroformos DNS-izolálással (Hochmeister és mtsai 1991) igyekeztünk elérni a kívánt hatékonyságot, de ez csekélyebb DNS-hozammal bírt, így később a hatékonyabb, szilika-alapú DNS-kinyerési módszerre (Rohland és mtsai 2009) tértünk át.

A korábban elterjedtebben használt szivacsos csontok mellett hosszúcsontokat, továbbá fogakat is bevontunk a vizsgálatainkba, annak bizonyítására, hogy az aDNS kinyerés nagyobb mértékű ezekről a helyekről. Ez utóbbi két mintatípus felhasználása csökkenti a kontamináció esélyét is.

A DNS extrakciót követően ellenőriztük, hogy sikeresen végbement-e a kivonás és rendelkezésünkre áll-e az ősi DNS. Ezt PCR analízissel végeztük el, IS6110R, IS6110F és IS6110intR, IS6110intF primereket alkalmaztuk, amelyek a legáltalánosabban alkalmazott primerek a *Mycobacterium* aDNS vizsgálata során (Eisenach és mtsai 1990, Taylor és mtsai 1996). A paleomikrobiológia eszköztárából több esetben használtuk még a spoligotyping eljárást (Kamerbeek és mtsai 1997, Zink és mtsai 2003).

Vizsgálati eredmények és értékelésük

A célkitűzéseknek megfelelően kutatásaim során hazai embertani szériákból potenciális TBC-fertőzött maradványokból mintákat vételeztem, és azok felhasználásával az EURAC Institute for Mummies and Iceman (Bolzano, Olaszország) aDNS laboratóriumában MTBC aDNS kimutatást végeztem. Kutatásaim első felében valamennyi fázisra az olaszországi kutatóhelyen került sor, míg a doktori munkáim második felében, a paleomikrobiológiai kutatások hazai meghonosítása érdekében, már bizonyos részfeladatokat magyarországi laboratóriumban, az MTA BTK Régészeti Intézet Archeogenetikai Laboratóriumában végeztem el.

A kutatásaim metodikai jellegű eredményei közül ki kell emelnem annak igazolását, hogy az archaikus tuberkulózis DNS kimutatásához szükséges mintavételre a szokásos, csigolyából vagy bordákból történő mintavétel mellett, a fogak is alkalmasak. Eredményeink igazolták, hogy a fogpulpa belső, zárt üregében valóban jelentős az aDNS prezerváció valószínűsége (Pósa és mtsai 2012), MTBC esetén is. A hosszúcsontokból történő mintavételekből származó vizsgálataim szintén eredményesnek bizonyultak.

Az alsónyéki neolit széria esetében a molekuláris vizsgálatokba egy közepes méretű sírcsoport szinte összes csontvázát bevontuk. A vizsgálatok alapján öt egyénnél kaptunk a fogakból és/vagy hosszúcsontokból pozitív eredményt baktérium DNS vizsgálatára (Pósa és mtsai 2015a, 2016a). Az eredmények, a molekuláris biológiai kutatásokkal párhuzamosan végzett morfológiai vizsgálati eredményekkel (Köhler 2012, Köhler és mtsai 2013) összhangban jelzik, hogy a *Mycobacterium tuberculosis* jelen volt az alsónyéki prehisztorikus populáció általunk tanulmányozott sírcsoportjának maradványaiban. Eredményeim alátámasztják Masson és munkatársai által közölt magyarországi neolit kori tuberkulózis-előfordulással kapcsolatos, közelmúltban közölt

adatokat (Masson és mtsai 2013, 2015), és számos új esettel kiegészítve megerősítik a MTBC jelenlétét és humánpatogén mivoltát, a mintegy 7000 évvel ezelőtti Kárpát-medencében. A Tiszai kultúrából származó Vésztő Mágori-domb lelőhelyről származó maradványok esetében egy esetben igazoltuk a TBC baktérium jelenlétét, ezzel bizonyítva a lelet mycobacteriális fertőzését.

Tápé-Széntglaégető lelőhely, késő bronzkori temető esetében az antropológiai vizsgálatok során hét egyén esetében bukkantak TBC-vel összefüggésbe hozható atipikus tünetekre, azonban molekuláris biológiai módszerekkel nem sikerült megerősíteni a kórokozó jelenlétét.

A két avar kori lelőhely (Kiskundorozsma Kettőshatár és Csárdaszállás Hanzély tanya) esetében a csontokon korai TBC elváltozással összefüggésbe hozható tüneteket figyeltek meg az antropológusok, azonban az általam használt molekuláris módszerekkel nem volt bizonyítható a TBC-fertőzés. Ez rámutat arra, hogy miért lenne szükséges a jövőben újabb technológiák – köztük az újgenerációs szekvenálási eljárások – bevonása a vizsgálatokba.

Az Árpád-kori temető esetében a fertőzés a csontokon tipikus elváltozásokkal járt (bordák, combcsontok, csigolyák érintettsége, jellegzetes Pott-gibbus jelenléte), emellett a mycobacteriális DNS jelenléte is igazolható volt a hosszúcsontokból vett minták esetében (Pósa és mtsai 2016b).

A makromorfológiai adatok alapján a Bácsalmás-Óalmási temető egyedeinél a vizsgált 481 csontvázból 283 lehetséges TBC-fertőzött esetet jegyeztek fel az antropológusok, melyek magukba foglalják a tipikus és az atipikus elváltozásokat is, ezek részletes közlése Kajdócsi Lovász Gabriella disszertációjában található (Lovász 2015). A molekuláris biológiai vizsgálatba bevont 18 egyénből hét egyénnél volt igazolható a *M. tuberculosis* jelenléte IS6110 régiójára (Pósa és mtsai 2013, 2015b). A teljes széria molekuláris vizsgálatát, annak rendkívüli költség-, és időigénye miatt nem végezhettük el, de a populáció magas TBC-fertőzöttségi rátája így is igazolást nyert. Új eredményeink alátámasztják több korábbi tanulmány adatait, amelyek már a bácsalmási széria magas TBC prevalenciáját sejtették (Pálfi és Ardagna 2002, Zink és mtsai 2007). A spoligotyping különböző típusú MTBC fertőzéseket jelzett a szériában, de a fokozott degradáltság miatt pontos *Mycobacterium* fajmeghatározást (*M. bovis*, *M. tuberculosis*) nem tett lehetővé, így azt csak megerősítő vizsgálatként kezelhettük.

A váci múmia vizsgálata szintén pozitív eredményt adott, amivel tovább gazdagítottuk a korábban publikált eredményeket (Fletcher és mtsai 2003): Sándor Terézia maradványaiból sikerrel izoláltunk *Mycobacterium tuberculosis* DNS-t.

Következtetések

Kutatási programunk során eredményesen alkalmaztuk hazai mintákon a nemzetközi gyakorlatban bevált paleomikrobiológiai technikákat, négy különböző korszakban is bizonyítottuk a tuberkulózis fertőzöttséget.

Vizsgálataink rávilágítottak arra is, hogy a mycobacteriális DNS megőrződése valamivel jobb a hosszúcsontok és a fogak esetében, mint a csigolyákban vagy a bordákban. Eredményeink jelzik, hogy fontos a megfelelő minták kiválasztása, ugyanazon egyén esetében a hosszúcsontok és fogak párhuzamos alkalmazása a molekuláris vizsgálatok során.

Az Alsónyék-Kanizsa dűlő lelőhely jelentősége abban áll, hogy a radiokarbon adatok szerint a lelőhelyen relatív rövid ideig jelentős népesség élt. A temetkezések és települési

jelenségek megszűnésének háttérben demográfiai kollapszus is feltételezhető, amiben a TBC, még ha nem is elsődleges okként, de jelentős szerepet játszhatott.

A bácsalmás-óalmási lelőhely esetében a bakteriális DNS jelenlétének megerősítése az oszteológiai széria nagyszámú, tuberkulózisra utaló morfológiai elváltozását igazolta vissza. A populáció korábbi régészeti és paleopatológiai vizsgálatok által vélelmezett endogám volta (Wicker és mtsai 1999, Lovász 2015) a betegség népességen belüli magas incidenciájával is összefügghetett.

A jövőben további vizsgálatokra, az alkalmazott módszerek bővítésére – köztük új generációs szekvenálási technikák bevonására – lesz szükség, hogy pontosabb képet kaphassunk az eddig vizsgált szériák és a későbbiekben tanulmányozni kívánt lelet-együttesek TBC-érintettségéről. Az újabb módszerekkel tovább csökkenthető lesz a kontamináció veszélye, megvalósulhat a talajban lévő mycobacteriumok és a humánpatogén *Mycobacterium* fajok pontosabb elkülönítése, valamint, az egykori tuberkulózis DNS jelenlétének megerősítésén túl, lehetőség nyílik az ősi törzsek karakterizálására és evolúciós kérdéseik tisztázására is.

Felhasznált irodalom

- Baker, O., Lee, O.Y., Wu, H.H., Besra, G.S., Minnikin, D.E., Llewellyn, G., Williams, C.M., Maixner, F., O'Sullivan, N., Zink, A., Chamel, B., Khawam, R., Coqueugnot, E., Helmer, D., Le Mort, F., Perrin, P., Gourichon, L., Dutailly, B., Pálfi, Gy., Coqueugnot, H., Dutour, O. (2015): Human tuberculosis predates domestication in ancient Syria. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S4–S12. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.001)
- Bartels, P. (1907): Tuberculose in der Jungeren Steinzeit. *Archiv für Anthropologie*, 6: 243–255.
- Boritsch, E.C., Supply, P., Honoré, N., Seeman, T., Stinear, T.P., Brosch, R. (2014): A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Molecular Microbiology*, 93(5): 835–852. DOI: [10.1111/mmi.12720](https://doi.org/10.1111/mmi.12720)
- Bos, K.I., Harkins, K.M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., Comas, I., Forrest, S.A., Bryant, J.M., Harris, S.R., Schuenemann, V.J., Campbell, T.J., Majander, K., Wilbur, A.K., Guichon, R.A., Steadman, D.L.W., Cook, D.C., Niemann, S., Behr, M.A., Zumarraga, M., Bastida, R., Huson, D., Nieselt, K., Young, D., Parkhill, J., Buikstra, J.E., Gagneux, S., Stone, A.C., Krause, J. (2014): Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*, 514: 494–497. DOI: [10.1038/nature13591](https://doi.org/10.1038/nature13591)
- Brisse, S., Supply, P., Brosch, R., Vincent, V., Gutierrez, M.C. (2006): A reevaluation of *M. prototuberculosis*: Continuing the debate. *PLoS Pathogens*, 2(9): e95. DOI: [10.1371/journal.ppat.0020095](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020095)
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., Soolingen, D., Cole, S.T. (2002): A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(6): 1–12. DOI: [10.1073/pnas.052548299](https://doi.org/10.1073/pnas.052548299)
- Camus, J.C., Pryor, M.J., Médigue, C., Cole, S.T. (2002): Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 148: 2967–2973. DOI: [10.1099/00221287-148-10-2967](https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-2967)
- Cockburn, A. (1963): *The evolution and eradication of infectious disease*. Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K.E., Kato-Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., Yeboah-Manu, D., Bothamley, G., Wei, J.M.L., Bentley, S., Harris, S.R., Niemann, S., Diel, R., Aseffa, A., Gao, Q., Young, D., Gagneux, S. (2013): Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*, 45(10): 1176–1182. DOI: [10.1038/ng.2744](https://doi.org/10.1038/ng.2744)

- Donoghue, H.D. (2009): Human tuberculosis – an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes and Infection*, 11: 1156–1162. DOI: [10.1016/j.micinf.2009.08.008](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.008)
- Donoghue, H.D. (2017): Insights gained from ancient biomolecules into past and present tuberculosis—a personal perspective. *International Journal of Infectious Diseases*, 56: 176–180. DOI: [10.1016/j.ijid.2016.11.413](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.413)
- Donoghue, H.D., Spigelman, M., O’Grady, J., Szikossy, I., Pap, I., Lee, O.Y.C., Wu, H.H.T., Besra, G.S., Minnikin, D.E. (2015): Ancient DNA analysis – An established technique in charting the evolution of tuberculosis and leprosy. *Tuberculosis*, 95(S1): S140–S144. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.020](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.020)
- Eisenach, K.D., Cave, M.D., Bates, J.H., Crawford, J.T. (1990): Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 161: 977–981. DOI: [10.1093/infdis/161.5.977](https://doi.org/10.1093/infdis/161.5.977)
- Farkas, L.Gy, Lipták, P. (1971): A Tápé melletti feltárt késő bronzkori temető antropológiai értékelése. *Anthropologiai Közlemények*, 15(1): 3–18.
- Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbo, M.H., Bobadilla del Valle, M., Fyfe, J., García-García, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozia, T., Guerrero, M.I., León, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendón, A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de León, A., Cave, D.M., Fleischmann, R., Whittam, T.S., Alland, D. (2006): Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of Bacteriology*, 188: 759–772. DOI: [10.1128/JB.188.2.759-772.2006](https://doi.org/10.1128/JB.188.2.759-772.2006)
- Fletcher, H.A., Donoghue, H.D., Holton, J., Pap, I., Spigelman, M. (2003): Widespread occurrence of Mycobacterium tuberculosis DNA 18-19th Century Hungarians. *American Journal of Physical Anthropology*, 120: 144–152. DOI: [10.1002/ajpa.10114](https://doi.org/10.1002/ajpa.10114)
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V. (2005): Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 1(1): e5. DOI: [10.1371/journal.ppat.0010005](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005)
- Haas, C.J., Zink, A., Molnár, E., Szeimes, U., Reischl, U., Marcsik, A., Ardagna, Y., Dutour, O., Pálfi, Gy., Nerlich, A.G. (2000): Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *American Journal of Physical Anthropology*, 113: 293–304. DOI: [10.1002/1096-8644\(200011\)113:3<293::AID-AJPA2>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1096-8644(200011)113:3<293::AID-AJPA2>3.0.CO;2-6)
- Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P.M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J.C., Kremer, K., Petrov, D.A., Feldman, M.W., Gagneux, S. (2008): High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biology*, 6: e311. DOI: [10.1371/journal.pbio.0060311](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060311)
- Hershkovitz, I., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Lee, O.Y.C., Gernaey, A.M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C.L., Lemma, E., Bar-Gal, G.K., Spigelman, M. (2008): Detection and molecular characterization of 9000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One*, 3(10): e3426. DOI: [10.1371/journal.pone.0003426](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426)
- Hochmeister, M., Budowle, B. (1991): Typing of DNA extracted from compact bone tissue from human remains. *Journal of Forensic Science*, 36: 1649–1661. DOI: [10.1520/JFS13189J](https://doi.org/10.1520/JFS13189J)
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J. (1997): Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 907–914.
- Köhler, K. (2012): *A késő neolitikus lengyeli kultúra népességének biológiai rekonstrukciója*. PhD disszertáció. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Biológia Doktori Iskola, Budapest.

- Köhler, K., Mende, B.G., Pósa, A. (2013): The emergence of tuberculosis in Late Neolithic Transdanubia. *Hungarian Archaeology*, http://www.hungarianarchaeology.hu/wpcontent/uploads/2013/08/eng_Kohler_13ny1.pdf
- Lovász, G. (2015): *A török hódoltság kori idegen etnikumok összehasonlító embertani vizsgálata*. Doktori disszertáció. Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola, Szeged.
- Lovász, G., Bereczki, Zs., Pálfi, Gy., Molnár, E. (2009): A possible case of echinococcosis from a late medieval series in Hungary. In: Pálfi, Gy., Molnár, E., Bereczki, Zs., Pap, I. (Eds) *Des lésions du passé aux diagnostics modernes*. Szeged University Press, Szeged. pp. 70–71.
- Lovász, G., Molnár, E., Marcsik, A. (2005): Bácsalmás-Óalmás 16–17. századi temető paleopatológiai vizsgálatának eredményei (2001–2003-as feltárás). In: *IV. Kárpátmedencei Biológiai Szimpózium. Előadások összefoglalói*, 153–158.
- Lovász, G., Schultz, M., Gödde, J., Bereczki, Zs., Pálfi, Gy., Marcsik, A., Molnár, E. (2013): Skeletal manifestations of infantile scurvy in a late medieval anthropological series from Hungary. *Anthropological Science*, 121(3): 173–185. DOI: [10.1537/ase.130905](https://doi.org/10.1537/ase.130905)
- Masson, M., Molnár, E., Donoghue, H.D., Besra, G.S., Minnikin, D.E., Wu H.H.T., Lee O.Y.C., Bull. I.D., Pálfi, Gy. (2013): Osteological and biomolecular evidence of a 7000-year-old case of hypertrophic pulmonary osteopathy secondary to tuberculosis from Neolithic Hungary. *PLoS ONE*, 8(10): e78252. DOI: [10.1371/journal.pone.0078252](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078252)
- Nerlich, A.G., Haas, C.J., Zink, A., Szeimes, U., Hagedorn, H.G. (1997): Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*, 350: 1404–1410.
- Nguyen-Hieu, T., Aboudharam, G., Drancourt, M. (2011): Mini review: dental pulp as a source for paleomicrobiology. *Bulletin of the International Association for Paleodontology*, 5(1): 48–54.
- Ortner, D.J. (1999): Paleopathology: Implications for the history and evolution of tuberculosis. In: Pálfi, Gy., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publisher – Tuberculosis Foundation, Budapest – Szeged. pp. 253–261.
- Ortner, D.J. (2003): *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. Academic Press, New York. p. 662.
- Pálfi, Gy. (2002): Paleoepidemiological reconstruction of tuberculosis, with particular attention to Europe. In: Bennike, P., Bodzsár, É., Susanne, C. (Eds) *Biennial Books of EAA*, 2: 193–210.
- Pálfi, Gy., Ardagna, Y. (2002): Gerincbetegségek és tuberkulózis a török hódoltság korából. A Bácsalmás-Óalmás (Bácsalmás-Homokbánya) 16–17. századi antropológiai leletgyűjtés fontosabb paleopatológiai adatai. In: Gerelyes, I., Kovács, Gy. (Szerk.) *A hódoltság régészeti kutatása*. Opuscula Hungarica III., Magyar Nemzeti Múzeum, Budapest. pp. 237–244.
- Pálfi, Gy., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (1999, Eds): *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publisher – Tuberculosis Foundation, Budapest – Szeged. pp. 608.
- Pálfi, Gy., Maixner, F., Maczel, M., Molnár, E., Pósa, A., Kristóf, L. A., Balázs, J., Masson, M., Paja, L., Palkó, A., Szentgyörgy, R., Nerlich, A., Zink, A., Dutour, O. (2015): Unusual spinal tuberculosis in an Avar Age skeleton (Csongrád-Felgyő, Ürmös-tanya, Hungary): A morphological and biomolecular study. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S29–S34. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.033](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.033)
- Pap, I., Susa, É., Józsa, L. (1997): Mummies from the 18th–19th century Dominican Church of Vác, Hungary. *Acta Biologica Szegediensis*, 42: 107–112.
- Pósa, A., Köhler, K., Maixner, F., Zink, A., Sola, Ch., Mende, B.G. (2016b): A népvándorlaskor fiatal kutatóinak XXIV. konferenciája Esztergom 2014. november 4–6. II. In: Balogh, Cs., Major, B. (Szerk.) *Magyar Őstörténeti Témacsoport Kiadványok 3.2*. Budapest – Esztergom. 533–540.
- Pósa, A., Maixner, F., Lovász, G., Molnár, E., Bereczki, Zs., Zink, A., Pálfi, Gy. (2013): Revision of tuberculous lesions in the Bácsalmás-Óalmás series – preliminary morphological and biomolecular studies. *Anthropologischer Anzeiger*, 70(1): 83–100. DOI: [10.1127/0003-5548/2012/0260](https://doi.org/10.1127/0003-5548/2012/0260)

- Pósa, A., Maixner, F., Mende, B.G., Köhler, K., Sola, C., Dutour, O., Masson, M., Molnár, E., Pálfi, Gy., Zink, A. (2015a): Tuberculosis in Late Neolithic-Early Copper Age human skeletal remains from Hungary. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S18–22. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.011)
- Pósa, A., Mende, B.G., Köhler, K., Oszás, A., Maixner, F., Zink, A., Sola, Ch., Dutour, O., Molnár, E., Pálfi, Gy. (2016a): Tuberkulózis nyomai késő neolitikum – kora rézkori emberi maradványokon (Alsónyék-Bátaszék, Dél-Magyarország). *Anthropologiai Közlemények*, 57: 29–39. DOI: [10.20330/AnthropKozl.2016.57.29](https://doi.org/10.20330/AnthropKozl.2016.57.29)
- Pósa, A., Maixner, F., Sola, Ch., Bereczki, Zs., Molnár, E., Masson, M., Lovász, G., Spekter, O., Wicker, E., Perrin, P., Dutour, O., Zink, A., Pálfi, Gy. (2015b): Tuberculosis infection in a late-medieval Hungarian population. *Tuberculosis*, 95: S60–64. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.010)
- Pósa, A., Maixner, F., Zink, A., Lovász, G., Molnár, E., Bereczki, Zs., Perrin, P., Dutour, O., Sola, O., Pálfi, Gy. (2012): Ancient human tooth samples used for TB paleomicrobial research. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2): 125–131.
- Rohland, N., Siedel, H., Hofreiter, M. (2009): A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Molecular Ecology Resources*, 10(4): 677–683. DOI: [1755-0998.2009.02824.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02824.x)
- Spekter, O., Pálfi, Gy., Kozocsay, G., Pósa, A., Bereczki, Zs., Molnár, E. (2012): New cases of probable skeletal tuberculosis from the Neolithic period of Hungary – A morphological study. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2): 115–123.
- Spigelman, M., Lemma, E. (1993): The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology*, 3: 137–143. DOI: [10.1002/oa.1390030211](https://doi.org/10.1002/oa.1390030211)
- Steinbock, R.T. (1976): *Paleopathological diagnosis and interpretation: Bone disease in ancient human populations*. Charles Thomas, Springfield, Illinois.
- Taylor, G.M., Crossey, M., Saldanha, J., Waldron, T. (1996): DNA from *Mycobacterium tuberculosis* identified in mediaeval human skeletal remains using polymerase chain reaction. *Journal of Archaeological Science*, 23: 789–798. DOI: [0.1006/jasc.1996.0073](https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0073)
- Weber, N. (2013): *Computational Approaches for Analyzing Ancient Genomes and Modern Metagenomes*. PhD dissertation. Tübingen.
- Wicker, E. (1999): Bácsalmás-Óalmás későközépkori rác temetője. *Cumania*, 15: 25–30.
- Wicker, E. (2006): *Rácok és vlahok a török hódoltság kori Észak-Bácskában*. PhD disszertáció. ELTE BTK Történelemtudományi Doktori Iskola, Régészeti Doktori Program, Budapest.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., Soolingen, D., Rüsich-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., Niemann, S. (2008): Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathogens*, 4(9): e1000160. DOI: [10.1371/journal.ppat.1000160](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160)
- Zalai-Gaál, I. (2008): An der Wende vom Neolithikum zur Kupferzeit in Transdanubien: Die “Häuptlingsgräber” der Lengyel-Kultur in Alsónyék-Kanizsa-dűlő. *Das Altertum*, 53: 241–280.
- Zalai-Gaál, I., Oszás, A. (2009): Neue Aspekte zur Erforschung des Neolithikums in Ungarn. Ein Fragenkatalog zu Siedlung und Gräberfeld der Lengyel-Kultur von Alsónyék, Südtransdanubien. In: Becker, V., Thomas, M., Wolf-Schuler, A. (Eds) *Zeiten – Kulturen – Systeme*. Gedenkschrift für Jan Lichardus, ZAKS Bd. 17: Langenweißbach. pp. 111–139.
- Zink, A., Haas, C.J., Reischl, U., Szeimies, U., Nerlich, A.G. (2001): Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *Journal of Medical Microbiology*, 50: 355–366. DOI: [10.1099/0022-1317-50-4-355](https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-4-355)
- Zink, A., Molnár, E., Motamedi, N., Pálfi, Gy., Marcsik, A., Nerlich, A.G. (2007): A molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology*, 17: 380–391. DOI: [10.1002/oa.909](https://doi.org/10.1002/oa.909)
- Zink, A., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., Nerlich, A.G. (2003): Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 359–367. DOI: [10.1128/JCM.41.1.359-367.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.359-367.2003)

A doktori értekezéshez kapcsolódó, referált, impakt faktoral rendelkező folyóiratokban megjelent szakkikkek

- Pálfi, Gy., Maixner, F., Maczel, M., Molnár, E., Pósa, A., Kristóf, L.A., Balázs, J., Masson, M., Paja, L., Palkó, A., Szentgyörgy, R., Nerlich, A., Zink, A., Dutour, O. (2015): Unusual spinal tuberculosis in an Avar Age skeleton (Csongrád-Felgyő, Ürmös-tanya, Hungary): A morphological and biomolecular study. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S29–S34. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.033](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.033)
- Pósa, A., Maixner, F., Lovász, G., Molnár, E., Bereczki, Zs., Zink, A., Pálfi, Gy. (2013): Revision of tuberculous lesions in the Bácsalmás-Óalmás series – preliminary morphological and biomolecular studies. *Anthropologischer Anzeiger*, 70(1): 83–100. DOI: [10.1127/0003-5548/2012/0260](https://doi.org/10.1127/0003-5548/2012/0260)
- Pósa, A., Maixner, F., Mende, B.G., Köhler, K., Oszás, A., Sola, Ch., Dutour, O., Masson, M., Molnár, E., Pálfi, Gy., Zink, A. (2015a): Tuberculosis in Late Neolithic-Early Copper Age human skeletal remains from Hungary. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S18–22. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.011)
- Pósa, A., Maixner, F., Sola, Ch., Bereczki, Zs., Molnár, E., Masson, M., Lovász, G., Spekker, O., Wicker, E., Perrin, P., Dutour, O., Zink, A., Pálfi, Gy. (2015b): Tuberculosis infection in a late-medieval Hungarian population. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S60–64. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.010)

A doktori értekezéshez kapcsolódó további publikációk

- Köhler, K., Mende, B.G., Pósa, A. (2013): A tuberkulózis megjelenése a Dunántúl kései neolitikumában. *Magyar Régészet*, 2: 1–5.
- Lovász, G., Molnár, E., Pálfi, Gy., Pósa, A., Wicker, E. (2012): „Sátorlakó vándorok” a török kori Észak-Bácskában. *Bácsország*, 60: 68–73.
- Lovász, G., Pálfi, Gy., Marcsik, A., Pósa, A., Neparáczki, E., Molnár, E. (2010): Skeletal manifestation of tuberculosis in a late medieval anthropological series from Serbia. *Acta Biologica Szegediensis*, 54(2): 83–91.
- Neparáczki, E., Török, T., Pósa, A., Molnár, E., Lovász, G., Maixner, F., Zink, A., Dutour, O., Pálfi, Gy. (2011): Preliminary results from the paleomicrobiological studies of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the Bácsalmás-Óalmás anthropological series. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1): 41–45.
- Pálfi, Gy., Maixner, F., Maczel, M., Molnár, E., Pósa, A., Kristóf, L. A., Balázs, J., Masson, M., Paja, L., Palkó, A., Szentgyörgy, R., Nerlich, A., Zink, A., Dutour, O. (2015): Unusual spinal tuberculosis in an Avar Age skeleton (Csongrád-Felgyő, Ürmös-tanya, Hungary): A morphological and biomolecular study. *Tuberculosis*, 95(Suppl 1): S29–S34. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.033](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.033)
- Pálfi, Gy., Zink, A., Maixner, F., Pósa, A., Lovász, G., Wicker, E., Bereczki, Zs., Molnár, E. (2012): Egy késő-középkori embertani széria tuberkulózis fertőzöttségének vizsgálata morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel. *Anthropologiai Közlemények*, 53: 35–50.
- Pósa, A., Maixner, F., Zink, A., Lovász, G., Molnár, E., Bereczki, Zs., Perrin, P., Dutour, O., Sola, Ch., Pálfi, Gy. (2012): Ancient human tooth samples used for TB paleomicrobial research. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2): 125–131.
- Pósa, A., Mende, B.G., Köhler, K., Oszás, A., Maixner, F., Zink, A., Sola, Ch., Dutour, O., Molnár, E., Pálfi, Gy. (2016): Tuberkulózis nyomai késő neolitikum – kora rézkori emberi maradványokon (Alsónyék-Bátaszék, Dél-Magyarország). *Anthropologiai Közlemények*, 57: 29–39. DOI: [10.20330/AnthropKozl.2016.57.29](https://doi.org/10.20330/AnthropKozl.2016.57.29)
- Spekker, O., Pálfi, Gy., Kozocsay, G., Pósa, A., Bereczki, Zs., Molnár, E. (2012): New cases of probable skeletal tuberculosis from the Neolithic period in Hungary – A morphological study. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2): 115–123.

Spekker, O., Pósa, A., Pálfi, Gy., Zink, A., Maixner, F., Bereczki, Zs., Molnár, E. (2013):
Specifikus fertőző megbetegedés diagnózisa Vésztő Mágori-halom újkőkori leletein.
Anthropologiai Közlemények, 54: 77–92.

Levelezési cím: Pósa Annamária
Mailing address: Magyar Tudományos Akadémia, Bölcsészettudományi Kutatóközpont
Régészeti Intézet, Archeogenetikai Laboratórium
Tóth Kálmán utca 4.
H-1097 Budapest
Hungary
Posa.Annamaria@btk.mta.hu

