

EGY KÉSŐ-KÖZÉPKORI EMBERTANI SZÉRIA TUBERKULÓZIS FERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA MORFOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Pálfi György¹, Zink Albert², Frank Maixner², Pósa Annamária^{1,3}, Lovász Gabriella^{1,4},
Wicker Erika⁵, Bereczki Zsolt¹ és Molnár Erika¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Embertani Tanszék, Szeged; ²Institute for Mummies and the Iceman, EURAC Research, Bolzano, Olaszország; ³Szegedi Tudományegyetem, Genetika Tanszék, Szeged;
⁴Városi Múzeum, Szabadka, Szerbia; ⁵Katona József Múzeum, Kecskemét

Pálfi Gy., Zink A., Maixner, F., Pósa A. Lovász G., Wicker E., Bereczki Zs., Molnár E.: *TB infection in a late medieval anthropological series – a morphological and biomolecular study.* Previous investigations carried out in some parts of the 16–17th century AD that series of Bácsalmás-Óalmás (southern Hungary) have already provided interesting paleopathological cases of tuberculosis (e.g. Molnár and Pálfi 1994). These studies were essentially based on macromorphological analysis, biomolecular methods were used only in a few cases (e.g. Haas et al. 2000). From a macromorphological point of view, former investigations have only considered ‘classical’ tuberculosis (TB) alterations (advanced-stage lesions in common skeletal locations). However, due to the recent development of diagnostic criteria in the field of the paleopathology of infectious diseases, new approaches have been introduced in the identification of skeletal TB lesions (Pálfi et al. 1999, Maczel 2003). Molecular methods for the detection of mycobacterial aDNA have also been developed considerably in the last few years (e.g. Donoghue 2008, 2011). The good state of preservation of the material, the important chronological period of the series and the relative high prevalence of TB reported in preliminary studies encouraged us to carry out a revision of TB-related lesions in the complete Bácsalmás-Óalmás series. A five year international research program – including both macroscopic and biomolecular studies of the series – was recently started.

The present paper summarizes the results of a pilot project conducted to optimize the further systematic paleopathological and paleomicrobial studies. Skeletal material of 205 individuals was chosen for the macromorphological test-investigation, which was focused both on classical/advanced stage skeletal TB alterations (tuberculous spondylitis, tuberculous arthritis) and atypical/early-stage TB lesions (rib lesions, superficial vertebral changes, endocranial alterations, early-stage spondylodiscitis). In addition, the association of possible stress factors (long bone periostitis, cribra orbitalia, cribra cranii) were also considered. Paleomicrobiological analysis was used to study the presence of *Mycobacterium tuberculosis* ancient DNA (aDNA) in morphologically positive and negative cases. A comparative paleomicrobial analysis was carried out on different samples, to test the presence of *MTB* DNA in different skeletal regions.

Keywords: Paleopathology; Skeletal tuberculosis; aDNA; *Mycobacterium tuberculosis*; 16–17th century AD; Bácsalmás, Hungary.

Bevezetés

A tuberkulózis (tbc) multidiszciplináris kutatása azért időszerű, mert a *Mycobacterium tuberculosis* kórokozó által terjesztett gümőkóros megbetegedések leküzdése napjainkban is komoly kihívást jelent az emberiség számára. Olyan jelentős egészségügyi/gazdasági problémát okozó betegségről van szó, amely világviszonylatban évente legalább 1,5 millió ember haláláért felelős. Becslések szerint a Föld népességének ma is közel egyharmada – mintegy 2 milliárd személy – hordozhatja a kórokozót (WHO 2010).

A modern orvosbiológiai kutatások mellett hasznos információkat nyújthatnak a betegség múltbeli megjelenésével és előfordulásával kapcsolatos vizsgálatok is. A paleopatológia és paleomikrobiológia, a tbc evolúcióját, ill. a gümőkórt okozó humánpatogén kórokozók és az emberi gazdaszervezetek ko-evolúcióját kutatva, közvetve a betegség elleni harchoz is ígéretes új ismeretekkel szolgálhatnak (Donoghue 2009).

A tbc paleopatológiája hosszú ideje gazdagítja tudományos ismereteinket: az utóbbi évszázadban a betegség tipikus osteo-archeológiai megjelenési formáinak (pl. a *spondylitis tuberculosa* – „Pott-betegség” – régi eseteinek) ezreit diagnosztizálták történeti embertani szériákban (pl. Bartels 1907, Buikstra és Williams 1991, Ortner 1999, 2003, Pálfi és mtsai 1999, Rothschild és Martin 1993, 2006). A tbc régi mintákból történő kimutatásának esélyét jelentősen javították az 1990-es években megjelent, és azóta alkalmazott molekuláris biológiai módszerek (pl. Donoghue 2008, Donoghue és mtsai 1998, 1999, 2005, Gernaey és mtsai 1999, Haas és mtsai 2000, Minnikin és mtsai 2011, Nerlich és mtsai 1997, Pap és mtsai 1999, Rothschild és mtsai 2001, Spigelman és Lemma 1993), valamint a tuberkulózis korai-, ill. atípusos csontelváltozásainak diagnosztikai alkalmazása az újabb paleopatológiai kutatásokban (pl. Anson és mtsai 2012, Baker 1999, Hershkovitz és mtsai 2002, Holloway és mtsai 2011, Kelley és Micozzi 1984, Maczel 2003, Pálfi 2002, Pálfi és Ardagna 2002, Rothschild and Rothschild 1999, Santos és Roberts 2001, Schultz 1999). Ezen újabb módszerek is hozzájárultak ahhoz, hogy újabb információkat kaphattunk a betegség korai előfordulásairól: a szakirodalom pillanatnyi állása szerint a legrégebbi ismert és bizonyított tbc előfordulás emberi maradványokban legalább 9 ezer éves (Hershkovitz és mtsai 2008), míg állatsontokból már 17 ezer éves adatokkal is rendelkezünk (Rothschild és mtsai 2001).

A tuberkulózis több évtizedes múltra visszatekintő hazai paleopatológiai kutatásában (pl. Maresik 1972, Pálfi és Maresik 1999, Maresik és mtsai 2009, Pap és mtsai 1999, Pálfi 2002) fontos mérföldkövet jelentett a jelen tanulmány tárgyát is képező késő-középkori bácsalmási leletgyűttes feltárása, és vizsgálatának megkezdése. A Bácsalmás-Óalmás lelőhelyről származó, 16–17. századi embertani széria már több paleopatológiai kutatás tárgyát képezte. Már a legelső feldolgozások is jelezték a népesség gümőkóros fertőzöttségét (pl. Molnár és Pálfi 1994). Ezek a korai munkák elsősorban makromorfológiai esettanulmányok voltak, jóllehet néhány esetben molekuláris biológiai vizsgálati eredmények is bizonyították a *M. tuberculosis* complex baktérium-csoport okozta fertőzést (Haas és mtsai 2000). A leletgyűttes jó megtartási állapota, a paleoepidemiológiai szempontból fontos kronológiai időszak, és az előzetes tanulmányok eredményeiből sejthető magas tbc-fertőzöttség inspirálta a széria gümőkór-okozta léziókra fókuszáló teljes körű átvizsgálását.

Anyag és Módszer

A bácsalmás-óalmási embertani széria

Bácsalmás határában, a bácsalmás-óalmási homokbányában balkáni eredetű népesség 16–17. századi temetőjét fedezték fel az 1990-es évek első felében, melyet később három fázisban tártak fel. A régészeti mellékletek megerősítették, hogy a sírokból feltárt 481 csontváz a török hódoltság idején Szerbiából és Montenegróból betelepült népesség biológiai maradványait képviseli (Wicker 1999, 2011, Lovász és mtsai 2012). A homokos talajnak köszönhetően jó megtartású, morfológiai és molekuláris vizsgálatok elvégzésére egyaránt alkalmas embertani leletek a feltárást követően az SZTE Embertani Tanszék (Szeged) gyűjteményébe kerültek.

A széria előzetes antropológiai és paleopatológiai vizsgálatai

Az embertani széria általános antropológiai vizsgálatára, és a széria egyes részleteinek előzetes paleopatológiai vizsgálatára az SZTE Embertani Tanszék gyűjteményében került sor. A paleodemográfiai vizsgálatok tisztázták, hogy a teljes, 481 leletből álló embertani anyag 236 felnőtt (118 férfi, 106 nő és 12 meghatározhatatlan nemű) és 245 gyermek csontvázat tartalmaz (Lovász 2005, 2008). A több szakaszban történt feltárást követően szakaszosan beérkezett anyagok paleopatológiai feldolgozása is több részletben történt. Valamennyi tanulmány felhívta a figyelmet a szériában megfigyelhető változatos paleopatológiai elváltozásokra – mely léziók jó megfigyelhetősége nyilvánvalóan összefügg a csontvázak jó megtartási állapotával (pl. Horváth és mtsai 1994, Lovász és mtsai 2009, Pálfi és mtsai 1996). A kóros elváltozásokkal foglalkozó tanulmányok több, potenciális tbc-fertőzött esetet leírtak (pl. Bereczki és mtsai 2009, Molnár és Pálfi 1994, Pálfi és mtsai 1997, Pálfi és Ardagna 2002), de eddig nem került sor a széria teljes körű – valamennyi csontváza, ill. a klasszikus és atípusos esetekre egyaránt kiterjedő, tbc-specifikus feldolgozására. A bácsalmási széria első szakaszai értékes adatokat szolgáltatottak a *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) archaikus DNS-vizsgálata számára is (pl. Haas és mtsai 1999, 2000, Neparáczi és mtsai 2011, Zink és mtsai 2007), paleomikrobiológiai vizsgálatra azonban eddig csak a széria rendkívül kis százalékában kerülhetett sor.

A 2011/2012-es „pilot project” a potenciális tbc-s léziók komplex vizsgálatához

A paleopatológiai és paleomikrobiológia diagnosztikai lehetőségeinek fejlődése, és különös tekintettel a tbc régi leletekből történő kimutathatóságának jelentős javulása alapján egy öt éves nemzetközi kutatási programot indítottunk a közelmúltban a bácsalmás-óalmási embertani széria teljes körű tbc-fertőzöttségi vizsgálatára. Terveink szerint mind a 481 csontvázlelet részletes, makroszkópos morfológiai átvizsgálásra kerül, melynek keretében minden típusú, tbc-vel összefüggésbe hozható szkeletális elváltozást regisztrálunk. Az ún. „klasszikus”, többnyire krónikus tbc-s csont-ízületi léziók (pl. *spondylitis tuberculosa*, *arthritis tuberculosa*) mellett az utóbbi évek paleopatológiai diagnosztikájában egyre inkább alkalmazott „atípusos” ill. „kezdeti stádiumú”, tbc-vel összefüggő tünet együttes (pl. *periostitis* bordák visceralis felszínén, *meningitis*-jelző endocraniális elváltozások, *hypervascularisatio* vagy *periostitis* csigolyákon, hidegtályog-nyomok, gümőkóros *calcificatio*) előfordulásait, és azok asszociációit is feljegyezzük. Bizonyos, fertőzésekhez gyakran kapcsolódó, korábban általában „stressz marker” vagy „nonpecifikus stressz marker” kategóriába sorolt tünetek (pl. *cribra orbitalia*, *cribra cranii*, *periostitis* hosszúcsontokon) szintén regisztrálásra kerülnek. A program során a széria valamennyi – 481 – csontvázából mintát veszünk DNS-

vizsgálathoz a *Mycobacterium tuberculosis* complex fertőzöttség tesztelésére, majd az elvégzett molekuláris biológiai vizsgálatok (pl. extrakció, PCR, spoligotyping) eredményeit összevetjük, illetve összesítjük a morfológiai vizsgálati eredményekkel. A program első lépéseként 2011/12-ben egy előkészítő teszt-vizsgálat, ún. „pilot projekt” végrehajtására került sor, melynek célja a molekuláris biológiai vizsgálathoz szükséges mintavételek optimalizálása volt. Ennek keretében a mintegy párhuzamosan beindított morfológiai vizsgálatok első szakaszának eredményeire támaszkodhattunk (205 csontvázmaradvány vizsgálata).

Csontminták és a molekuláris vizsgálatok módszerei

A bolzanoi (Olaszország) EURAC Institute for Mummies and the Iceman archaikus DNS (aDNS) laboratóriumában végrehajtott (és a későbbiekben végrehajtandó) paleomikrobiológiai vizsgálataink elsődleges célja a *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) complex aDNS kimutatása a bácsmási embertani leletekből. A komplex makromorfológiai és paleomikrobiológiai program jelenlegi, induló szakaszát részben a későbbi mintavételi rendszer optimalizálására szántuk. Ennek megfelelően limitált esetszámot választottunk megnövelt párhuzamos mintaszámmal: a 205 morfológiailag tesztelt csontvázból 9 morfológiailag valamilyen szinten pozitív (tbc-függő léziót mutató) és 3 morfológiailag negatív esetet szelektáltunk. A 12 esetből egyenként 3–3 (csigolya, borda, hosszúcsont) mintát vettünk, hogy összevethessük a 3 csonttípusban az MTB aDNS megtartottságát. Két, endocranialis elváltozást is mutató leletnél egy-egy negyedik (koponya) mintát is bevontunk a vizsgálatokba. Összesen 12 egyén 38 csontmintája képezte paleomikrobiológiai vizsgálat tárgyát.

A vizsgálati minták felületét az erre kijelölt előkészítő teremben megtisztítottuk, oly módon, hogy a külső felszínt Dremel nagysebességű fúró használatával mechanikusan eltávolítottuk. A tisztított mintákat Retsch őrlőmalommal porítottuk. A DNS extrakciót 250 mg csontporral végeztük, amelyhez 5 ml EDTA-t és 20 µl 20 mg/ml proteináz K-t pipettáztunk, majd az összekeverést követően egy éjszakán át (overnight) 40°C-on inkubáltuk. A minták felülűszójához 2,5 ml kötőpuffert és 100 µl szilika szuszpenziót adtunk, a keveréket 3 órán át inkubáltuk. Az extrakció a Nadine Rohland extrakciós protokollt követte kisebb módosításokkal (Rohland és mtsai 2009). A minták vizsgálata egy specifikus régióra, a *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) IS6110 inszerciós szekvenciájában található 123 bp hosszúságú specifikus lókuszra történt (Donoghue 2009). Az IS6110 régió egy többkópiás ismétlődő szekvencia, amely akár 24-szeres kópiában is megtalálható sejtenként (Baron és mtsai 1996, Salo és mtsai 1994) és az IS6110R (reverse) és IS6110F (forward) primerpárral amplifikálható. Előre vásárolt kit-el (Ampli taq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dolgoztunk a hot-start PCR reakció során. A PCR reakcióelegy 10 mM tris-HCl-ot (pH 8,3), 50 mM KCl-ot, 1,875 mM MgCl₂-ot, 200 µM dezoxinukleotid trifoszfátot, továbbá mindkét primerből 0,5 µM-t, 0,1 mg/ml BSA-t (Bovine serum albumin), 0,05 U/µl AmpliTaq Gold polimeráz enzimet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és az extrahált DNS-ből 4 µl-t tartalmazott, a végső térfogat 50 µl volt. A tuberkulózisra pozitív eseteket tovább elemeztük spoligotyping segítségével. A vizsgálat során a Spoligotyping Kit-et (Ocimum Biosolutions) alkalmaztuk, a Kamerbeek és munkatársai által leírt (Kamerbeek és mtsai 1997) protokoll alapján, kisebb módosításokkal.

Eredmények és Megvitatásuk

Az első vizsgálati szakaszban morfológiailag újraértékelt 205 csontváz között igen magas arányban, 135 leletnél fordult elő valamilyen lehetséges tbc-fertőzöttségre utaló jel (ld. „Anyag és módszer” fejezet), vagy azok együttese. Tipikus, azaz a hagyományos paleopatológiai elemzések szerint is egyértelműen csont-izületi tbc-nek diagnosztizálható esetet mindössze hármat figyeltünk meg: két egyénnél egyértelmű *arthritis tuberculosa*-t, egy egyénnél *spondylitis tuberculosa*-t határoztunk meg.

Rendkívül magas számban fordultak elő korai stádiumú-, vagy ún. atípusos szkeletális tbc-jelek. Öt esetben regisztráltuk lehetséges kezdeti *spondylodiscitis* vagy *arthritis* nyomait, 82 esetben észleltünk elváltozást bordákon, 42 csontvázon tapasztaltunk csigolyákon *hypervascularisatio* nyomait, míg 44 koponya endocraniális felszínén figyeltünk meg lehetséges *meningitis*-re utaló léziókat. Az egyes formák esetszámait természetesen az is növeli, hogy az említett léziók gyakran halmozottan (asszociáltan) jelentkeztek – gyakran jelentek meg pl. borda- és endocraniális léziók ugyanazon csontvázak esetében. Összesen 100 csontváz esetében regisztráltuk *periostitis* előfordulását egyidejűleg több hosszúcsont felszínén. A korábbiakban említett, gyakran fertőzések eredetű megbetegedésekhez kapcsolódó stressz-faktorok csoportjából 32 esetben *cribra orbitalia*-t, 3 esetben *cribra cranii*-t észleltünk.

Az 1990-es évek óta egyre elterjedtebben alkalmazott paleomikrobiológiai technikák megkövetelik a rendkívül szigorú sterilitási körülmények betartását az aDNS laboratóriumokban, ahogy azt számos vonatkozó tanulmány részletezi (pl. Donoghue, 2008, 2009, Fletcher és mtsai 2003, Haas és mtsai 2000). Saját vizsgálataink során ezek betartására minden esetben sor került az EURAC speciálisan aDNS vizsgálatokra kialakított bolzanói laboratóriumában. (Minden egyes minta feldolgozása előtt – ill. minta-váltások között – sor került a laboratóriumi eszközök és berendezések felszíneinek fertőtlenítő oldatokkal történő sterilizálására, a csontpor előállítására használt Retsch malom tégelyeinek, és a csontminták felszíneinek UV-lámpával történő sterilizálására, stb.) A komplex sterilizálási eljárások maradéktalan betartása némileg lassította a vizsgálatok menetét – ami magyarázza, hogy a rendelkezésre álló kutatási időben csak 38 minta tesztelésére nyílt lehetőségünk, de lehetővé tette a minták közötti kontamináció lehetőségének kizárását.

Az „Anyag és Módszer” fejezetben leírtaknak megfelelően 12 embertani lelet (9 „morfológiailag pozitív” – valamilyen lehetséges tbc-függő léziót mutató – és 3 „morfológiailag negatív”, léziómentes) összesen 38 mintáját vizsgáltuk molekuláris biológiai módszerrel (1. táblázat). A csontvázanként 3 párhuzamos minta (csigolya, borda, hosszú csont) tesztelésére azért volt szükség, hogy összevethessük a különböző csont-típusok bakteriális aDNS-megtartó képességét. (További két mintát jelentett, hogy két olyan pozitív esetben – 264-es és 483-as sírok, ahol endocranialis lézió is asszociált az egyéb elváltozásokkal, a koponyából vett mintát is PCR-vizsgálat alá vetettük.)

Az esetek egyik felét jelentő 6 csontváz 19 mintájából egyetlen egy sem adott pozitív PCR eredményt (ezek között 4 morfológiailag pozitív és 2 negatív eset fordult elő). A másik 6 esetben – szintén 19 minta felhasználásával – sikerült a *Mycobacterium tuberculosis* complex genom IS6110 repetitív elem 123 bp-os, specifikus szakaszát amplifikálni hot-start PCR segítségével, igazolva ezzel a 6 egyén gümőkóros fertőzöttségét. A 6 eset összesen 7 mintája adott pozitív eredményt (1. táblázat).

1. táblázat. A paleomikrobiológiai vizsgálatokhoz használt – tbc-s elváltozást mutató, ill. léziómentes csontminták főbb adatai és a PCR-vizsgálatuk eredményei.
 Table 1. Main data of the osteological samples (with or without potential TB-related lesions) used for the paleomicrobial studies and their PCR results.

Sírszám Grave Nr.	Reg. szám EURAC Reg.Nr.	Életkor Age at death	Nem Sex	Minták Samples	Léziók Lesions	P C R
18	1196– 1198	Mat	M	<u>T11 vertebra</u> , borda (jobb), radius (jobb) <u>T11 vertebra</u> , R rib, R radius	Valószínű <i>spondylitis tuberculosa</i> , felszíni csigolyaléziók, valószínű sacroileitis, <i>periostitis</i> hosszúcsontokon TB spondylitis, superficial vertebral changes, probable sacroiliitis, long bone periostitis	+
105	1184– 1186	Mat	F	L1 vertebra, <u>borda</u> (bal), radius (bal) L1 vertebra, <u>L rib</u> , L radius	<i>Periostitis</i> bal oldali bordák visceralis felszínén Periostitis on left side ribs (visceral surface)	+
261	1190– 1192	Inf I	–	Csigolya-töredék, bordatöredék, tibia (bal), Vertebral fragments, rib fragments, L tibia	<i>Periostitis</i> bordák visceralis felszínén, diffúz periostitis hosszúcsontokon Rib periostitis (visceral surface), long bone periostitis (possible HOA)	-
264	1199– 1202	Inf I	–	Csigolya-töredék, bordatöredék, <u>humerus (bal)</u> , os temporale (bal) Vertebral fragments, rib fragments, <u>L humerus</u> , L temporal bone	<i>Periostitis</i> bordák visceralis felszínén, endocranialis léziók (valószínű tbc-s meningitis), periostitis hosszúcsontokon Rib periostitis (visceral surface), endocranial lesions (probable TB meningitis), long bone periostitis	+
332	1213– 1215	Mat	M	T11 vertebra, borda (jobb), radius (jobb) T11 vertebra, R rib, R radius	–	-
344	1203– 1205	Juv	–	T11 vertebra, borda, radius (jobb) T11 vertebra, L rib, R radius	Valószínű <i>arthritis tuberculosa</i> (bal könyök), felszíni csigolyaléziók, endocranialis léziók, <i>cribra orbitalia</i> Probable tuberculous arthritis (L elbow), superficial vertebral changes, endocranial lesions, cribra orbitalia	-

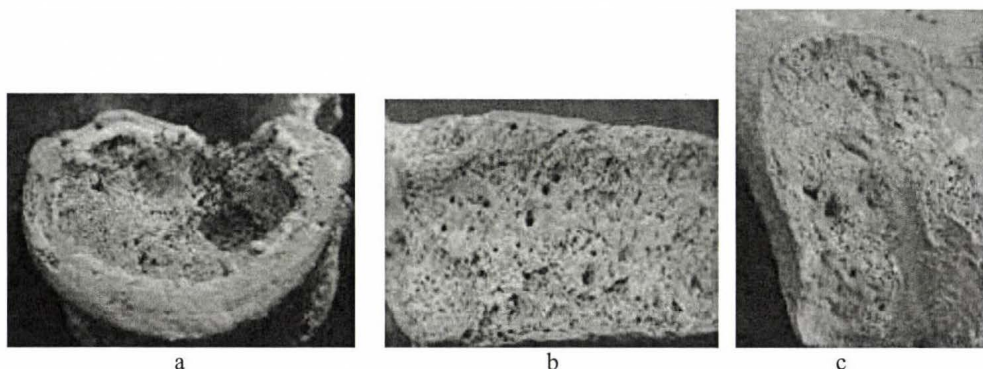
1. táblázat folytatása – Table 1 continued.

Sírszám Grave Nr.	Reg. szám EURAC Reg.Nr.	Életkor Age at death	Nem Sex	Minták Samples	Léziók Lesions	P C R
391	1181– 1183	Juv	–	T12 vertebra, borda (bal), <u>radius</u> (bal) T12 vertebra, L rib, <u>L radius</u>	Valószínű <i>arthritis tuberculosa</i> (jobb könyök), felszíni csigolyaléziók, hypervascularisatio, periostitis hosszúcsontokon Probable tuberculous arthritis (R elbow), superficial vertebral changes, long bone periostitis	+
416	1187– 1189	Inf II	–	T12 vertebra, borda (bal), radius (jobb) T12 vertebra, L rib, R radius	Felszíni csigolyaléziók, hypervascularisatio, periostitis hosszúcsontokon Superficial vertebral changes, long bone periostitis	–
438	1210- 1212	Inf I	–	Csigolyatest, bordatöredék, <u>ulna (bal)</u> Vertebral bodies, rib fragments, <u>L ulna</u>	–	+
447	1193- 1195	Mat	M	T11 vertebra, borda (bal), radius (bal) T11 vertebra, L rib, R radius	Periostealis átépülés nyomai bordák visceralis felszínén, periostitis hosszúcsontokon, ismeretlen eredetű meszes képlet, kezdődő sacroileitis Remodelled surface of the visceral surface of several ribs, long bone periostitis, calcified object, probable sacroiliitis	–
481	1178- 1180	Ad	F	<u>T12 vertebra</u> , borda (jobb), <u>radius (bal)</u> <u>T12 vertebra</u> , R rib, <u>L radius</u>	–	+
483	1206- 1209	Inf I	–	Csigolya-töredék, bordatöredék, ulna (bal), os temporale (jobb) Vertebral fragments, rib fragments, L ulna, R temporal bone	<i>Periostitis</i> bordák visceralis felszínén, endocranialis léziók (valószínű tbc-s meningitis), periostitis hosszúcsontokon, <i>cribra orbitalia</i> Rib periostitis (visceral surface), endocranial lesions (probable TB meningitis), long bone periostitis, cribra orbitalia	–

Egyesítve a makroszkópos morfológiai és a molekuláris biológiai eredményeket, 4 „kétszeresen pozitív” (morfológiailag is PCR-re egyaránt pozitív) esetet kaptunk. Ezek az esetek (és elváltozásaik) a következők:

18. sír, felnőtt (*Maturus*, Mat.) férfi csontváza (a 3 minta EURAC azonosítói: ID 1196-1198). A csontvázon *spondylitis tuberculosa* nyomai valószínűsíthetők (1a. ábra). Az érintett hátsigolyák zárólemez-léziói mellett felszíni csigolyatest-elváltozásokat (*periostitis* és felszíni átépülés nyomai; 1b. ábra), több hosszúcsontra kiterjedő diffúz *periostitis*, valamint kezdeti kétoldali *sacroileitis* (1c. ábra) nyomait is megfigyeltük.

A molekuláris biológiai vizsgálat a 18. sírból származó csontváz 3 mintája közül a T11 csigolya-mintából (ID 1196) mutatta ki MTB aDNS jelenlétét.



1. ábra: (a) Valószínűsíthető spondylodiscitis nyomai (melyeket enyhe tafonómiai behatások részlegesen módosítottak); (b) felszíni újsont-képződés csigolyán; (c) kezdő sacroileitis tünete os ileum facies auricularis-án. Bácsalmás-Óalmás 18. sír (Mat. nő, ID EURAC 1196-1198).

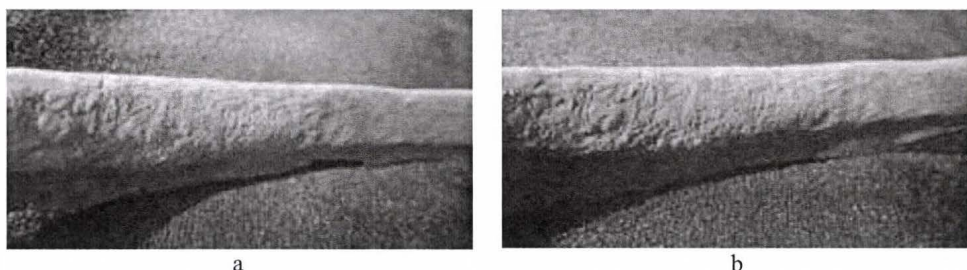
Figure 1: (a) Traces of probable spondylodiscitis (partially modified surface by taphonomic conditions); (b) superficial vertebral new bone appositions; (c) remodelling of the SI joint surface indicating probable early-stage sacroiliitis. Bácsalmás-Óalmás Grave Nr. 18 (Mat. male, ID EURAC 1196-1198).

105. sír, felnőtt (*Maturus*, Mat.) nő csontváza (a 3 minta EURAC azonosítói: ID 1184-1186). Fertőzések eredetű csontelváltozás mindössze 3 baloldali bordán figyelhető meg. A 2. ábra képei egyértelműen jelzik a *visceralis* felszínen a *periostealis* eredetű újsontképződést és átépülést (különösen a jobb oldalon megfigyelhető eredeti *corticalis* felszínhez viszonyítva).

A tesztelt 3 mintából a borda-minta (ID 1185) adott pozitív DNS eredményt.

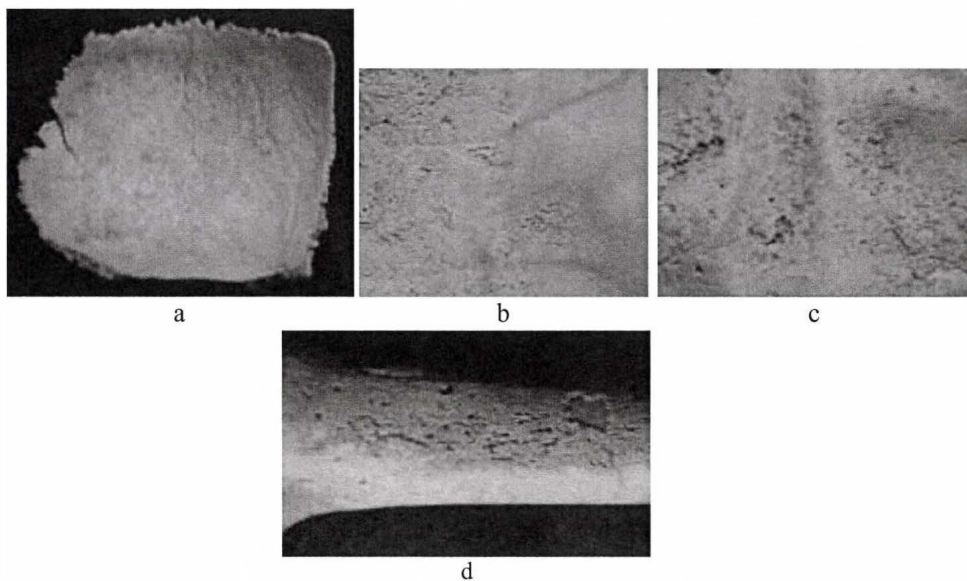
264. sír, gyermekcsontváz (*Infantia I*, Inf. I; a 4 minta EURAC azonosítói: ID 1199-1202). A csontvázmaradványokon borda-*periostitis*, valószínűsíthető gümőkóros eredetű *endocranialis* léziók (3a–c. ábra), és számos hosszúcsontra diffúz *periostitis* nyomai (3d. ábra) figyelhetők meg. A legmeghatározóbb elváltozások a koponya *endocranialis* felszínén több csontra kiterjedő *hypervascularisatio* nyomok, és a rendellenes érbenyomatok körül kialakult felszíni újsontképződmények, melyek együttese fertőzések eredetű *meningitis*-re utal. Ezekről a jelenségekről az utóbbi másfél évtizedben többször értekezett a paleopatológiai szakirodalom – Hershkovitz és munkatársai a *tbc*-s eredetű *endocranialis* elváltozások hasonló típusainak az „SES” (*Serpens Endocrania Symmetrica*) elnevezést adták 2002-es értekezésükben (Hershkovitz és mtsai 2002). Egyéb tanulmányok a *tbc*-s eredetű *endocranialis* léziók változatosabb megjelenését igazolták (pl. Maczel 2003, Pálfi és mtsai 2012). A téma szakirodalmára támaszkodva a 264-es vázmaradvány koponya-elváltozásait alapvetően *tbc*-s eredetűnek határoztuk meg.

A molekuláris biológiai vizsgálat a 264. sírból származó csontváz 4 mintája közül a bal humerus-mintából (ID 1201) mutatta ki MTB aDNS jelenlétét.



2. ábra: Feltételezhető tüdő/mellhártya tbc-s folyamat okozta periosteális újcsontképződés bal oldali borda visceralis felszínén. A lelet nem mutat egyéb, makroszkóposan vizsgálható fertőzőes eredetű elváltozást. Bácsalmás-Óalmás, 105. sír (Mat. nő, ID EURAC 1184-1186).

Figure 2: Periostitis (periosteal appositions and remodelling) on left rib visceral surfaces, indicating probable pleuro/pulmonar TB. No other infectious origin pathological condition is observed macroscopically. Bácsalmás-Óalmás, Grave Nr. 105. (Mat. female, ID EURAC 1184-1186).

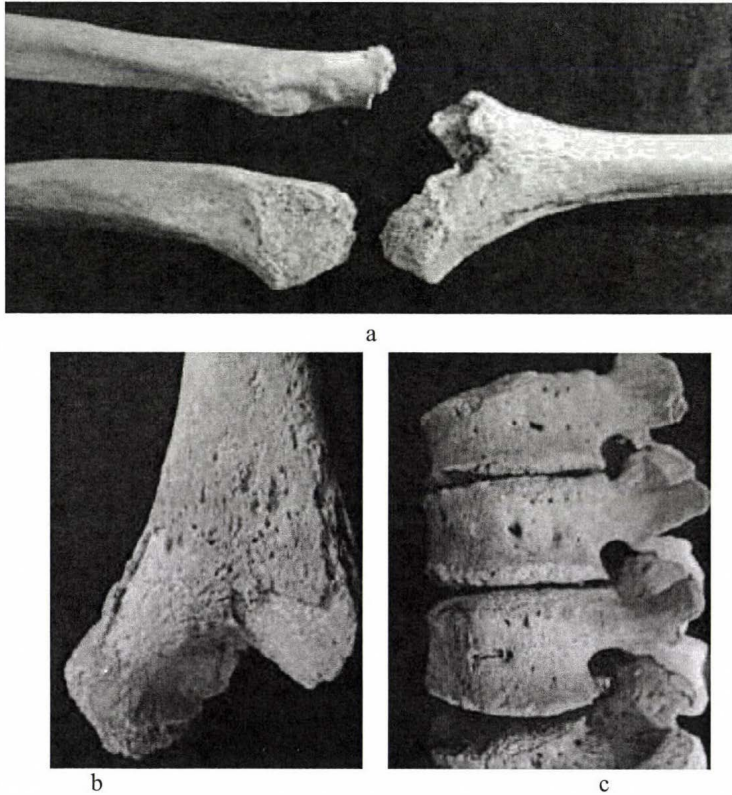


3. ábra: (a–b) Valószínűsíthető tbc-s agyhártyagyulladás (meningitis) okozta endocranialis elváltozások os parietale és (c) os occipitale belső felszínein; (d) periostitis nyomai hosszúcsonton. Bácsalmás-Óalmás, 264. sír (Inf. I., ID EURAC 1199-1202).

Figure 3: (a–b) Probable TB meningitis related endocranial alterations in the inner surface of parietal and (c) occipital bones; (d) long bone periostitis. Bácsalmás-Óalmás, Grave Nr. 264. (Inf. I., ID EURAC 1199-1202).

391. sír, ifjúkorú egyén csontváza (*Juvenis*, Juv.; a 3 minta EURAC azonosítói: ID 1181–1183). A jobb könyök csontvázmaradványain (*humerus*, *radius*, *ulna*) súlyos, destruktív *osteitis* és *periarticularis* lokalizációjú *periostitis* tüneteit figyelhetjük meg, melyek együttesen *arthritis tuberculosa* diagnózisát valószínűsítik (4a–b. ábra). A gerinc maradványain több csigolyatest hypervascularisatio-ja és felszíni átépülése (4c. ábra) hívják fel magukra a figyelmet, míg több hosszúcsonton *periostitis* nyomait látjuk.

A tesztelt 3 mintából a bal radius-minta (ID 1183) adott pozitív DNS eredményt.



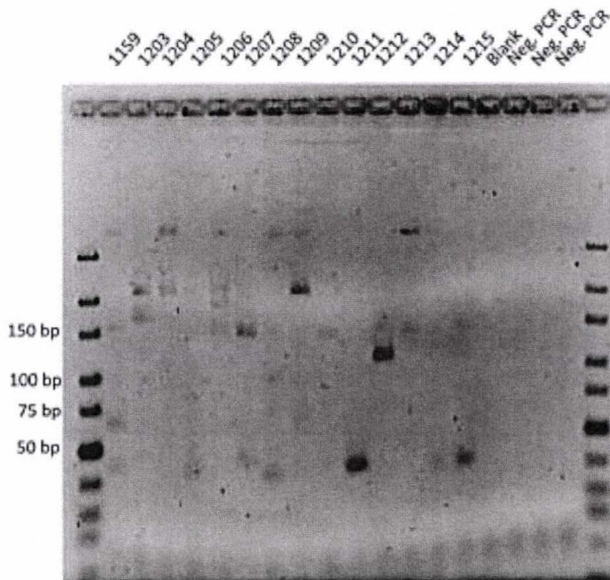
4. ábra: (a) Csontpusztulással és (b) periostealis újesontképződéssel járó súlyos könyökízületi gyulladás (arthritis) nyomai; több csigolyatest hypervascularisatio-ja és (c) felszíni átépülése.

Bácsalmás-Óalmás, 391. sír (Juv., ID EURAC 1181-1183).

Figure 4: (a) Severe arthritis of the elbow with bone destruction and (b) periosteal appositions; superficial remodelling and (c) hypervascularisation of several vertebral bodies. Bácsalmás-Óalmás, Grave Nr. 391. (Juv., ID EURAC 1181-1183), Hungary.

A paleomikrobiológiai vizsgálat során két olyan esetről (438. és 481. sírok) is sikerült a tbc-fertőzöttséget DNS-vizsgálattal kimutatni, ahol a morfológiai elemzés semmilyen tbc-s eredetű tünetet sem mutatott.

438. sír, gyermekcsontváz (*Infantia I*, Inf. I; a 3 minta EURAC azonosítói: ID 1210-1212). A vizsgált 3 mintából a bal oldali ulna-minta (ID 1212) adott pozitív PCR-eredményt (5. ábra).

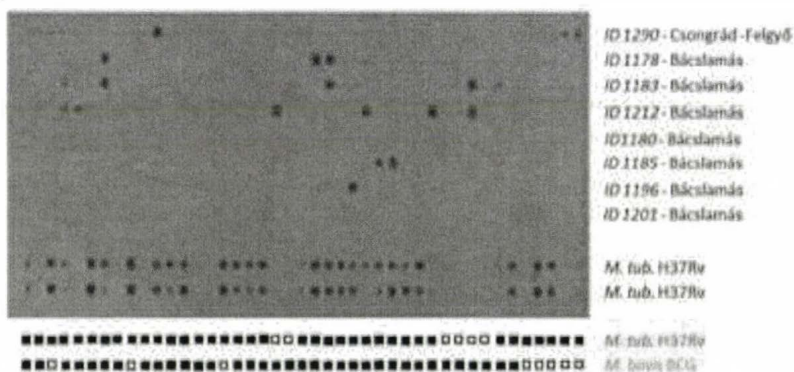


5. ábra: PCR+ mintát (ID 1212) bemutató gél fényképe. Bácsalmás-Óalmás, 438. sír (Inf. I, ID EURAC 1212). A baloldali ulna mintájából (ID 1212) sikerült a MTBC DNS azonosítása.
 Figure 5: PCR+ gel picture, Bácsalmás-Óalmás, Grave Nr. 438. (Inf. I, ID EURAC 1212, left ulna). The left ulna (ID 1212) of the young child skeleton gave positive PCR result.

481. sír, felnőtt (*Adultus*, Ad.) nő csontváza (a 3 minta EURAC azonosítói: ID 1178-1180). Ez az eset volt az egyetlen a vizsgálatba bevont 12 eset közül, ahol egynél több minta adott pozitív aDNS eredményt: a paleomikrobiológiai elemzésbe bevont 3 minta közül 2, a T12-es csigolyából (ID 1178) és a bal radiusból (ID 1180) vett mintákból egyaránt sikerült kimutatni MTB aDNS jelenlétét.

A bemutatott eredmények egyértelműen jelzik, hogy a PCR-technika alkalmas régi mintákból a *Mycobacterium tuberculosis* complex fajok okozta korabeli fertőzések DNS-szintű igazolására. A tapasztalatok rámutatnak azonban a makroszkópos morfológiai és molekuláris biológiai módszerek komplementer jellegére is: azok együttes alkalmazása vélhetően a valósághoz közelebb álló képet adhat a régi korok gümőkóros fertőzöttségéről.

A *M. tuberculosis* complex pozitív esetekből nyert PCR termékeket spoligotyping vizsgálathoz is felhasználtuk. A 6. ábra bemutatja a 6 pozitív bácsalmási eset 7 pozitív mintáját (kiegészítve egy további, a jelen vizsgálathoz tematikailag nem kapcsolódó, de a bácsalmási mintázatoktól erősen eltérő hazai paleopatológiai lelet spoligotyping képével – Csongrád-Felgyő, Avar kor, 7. század, 1. sor, valószínűsíthető *M. tuberculosis* fertőzés). Ahogy azt a kép is tanúsítja, a bácsalmási spoligotyping képek többsége hiányos vagy nem egyértelmű, így azok a jelenlegi szinten nem teszik lehetővé a *M. tuberculosis* és *M. bovis* fertőzés elkülönítését.



6. ábra: Spoligotyping eredmények: a 7 PCR+ bácsalmási minta spoligotyping képei a 2–8. sorokban láthatók (az első sorban Csongrád-Felgyő 7. századi, avar kori minta képe szerepel).
 Figure 6: Spoligotyping results: the Bácsalmás samples appear in lanes Nr. 2–8 (the first band comes from a different anthropological series – Csongrád-Felgyő, 7th century AD).

Következtetések

A Bácsalmás-Óalmás embertani széria első részének tbc-fertőzésre fókuszáló, és a betegség korai, illetve atípusos megjelenési formáit is figyelembe vevő paleopatológiai újraértékelése a korábbi elemzések adataihoz képest lényegesen magasabb prevalencia értékeket szolgáltatott, ahogyan azt a metodikai változásokra tekintettel prognosztizálni lehetett. A korai/atípusos formák előfordulási aránya közel két nagyságrenddel magasabb az ún. „klasszikus” léziók gyakoriságánál.

Paleomikrobiológiai vizsgálataink PCR eredményei meggyőzően megerősítették a széria *M. tuberculosis* complex (MTBC) fertőzöttségét: a molekuláris biológiai „pilot project”-be bevont esetek felénél sikerült kimutatni a kórokozó DNS maradványait. A morfológiai és molekuláris adatok sok esetben átfednek, de alapvetően komplementer jellegűek, és együttes alkalmazásuk segítheti leginkább a korabeli fertőzöttségi arányok helyes becslését.

Eddigi eredményeink azt sugallják, hogy a kompakt hosszú csontok mycobacterialis DNS-megtartó képessége valamivel jobb a csigolyákéhoz, bordákéhoz viszonyítva. A „pilot project” pozitív eseteinek eredményei – miszerint a 6 PCR-pozitív esetben 19-ből csak 7 minta szolgáltatott pozitív eredményt – ugyanakkor felhívják a figyelmet a „szerencse faktor” túlzott szerepére a mintavételek során. További vizsgálat-sorozatok indítására lesz szükség a paleomikrobiológiai elemzésekhez mintavételi stratégiák optimalizálásához.

A PCR-termékek felhasználásával nyert spoligotyping képek különböző MTBC patogének előfordulását sejtetik a bácsalmási szériában, de a jelenlegi szinten nem teszik lehetővé a fajok elkülönítését. A vizsgálatok megismétlése azonos, ill. különböző esetekből származó újabb mintákkal, valamint a mycobacterialis DNS maradványok szekvenálása segíthetnek a kérdéses MTBC fertőzések pontosabb eredetének tisztázásában.

*

Köszönetnyilvánítás: A jelenleg is folyamatban lévő kutatás az OTKA K 78555 projekt és a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005 projektek keretében került megvalósításra. A támogatásáért a szerzők köszönetüket fejezik ki.

Irodalom

- Anson, C, Rothschild, B.M., Naples, V. (2012): Soft tissue contributions to pseudopathology of ribs. *Advances in anthropology*, 2: 57–63.
- Baker, B.J. (1999): Early manifestations of tuberculosis in the skeleton. In: Pálfi Gy., O. Dutour, J. Deák, I. Hutás (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publisher – Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 301–311.
- Baron, H., Hummel, S., Herrmann, B. (1996): Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones. *J. Archaeol. Sci.*, 23: 667–671.
- Bartels, P. (1907): Tuberculose in der Jüngerer Steinzeit. *Archiv für Anthropologie*, 6: 243–255.
- Bereczki, Zs., Paja, L., Lovász, G., Maczel, M., Molnár, E., Marcsik, A., Pálfi, Gy. (2009): New infectious conditions from Bácsalmás-Óalmás, Hungary – Possible cases of skeletal TB. In: Pálfi, Gy., Molnár, E., Bereczki, Zs., Pap I. (Eds) *Des lésions du passé aux diagnostics modernes*. Szeged University Press, Szeged. pp. 46–47.
- Buikstra, J., Williams, S. (1991): Tuberculosis in the Americas: Current Perspectives. In: Ortner, D., Aufderheide, A. (Eds) *Human Paleopathology, Current Syntheses and Future Options*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Donoghue, H.D. (2008): Paleomicrobiology of Tuberculosis. In: Raoult D., Drancourt M. (Eds) *Paleomicrobiology: Past Human Infections*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 75–99.
- Donoghue, H.D. (2009): Human tuberculosis-an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes Infect.*, 11: 1156–1162.
- Donoghue, H.D. (2011): Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17(6): 821–829.
- Donoghue, H.D, Marcsik, A., Matheson, C., Vernon, K., Nuorala, E., Molto, J., Greenblatt, C., Spigelman, M. (2005): Co-infection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae in human archaeological samples – a possible explanation for the historical decline of leprosy. *Proceedings of The Royal B: Biological Sciences*, 272(1561): 389–394.
- Donoghue, H.D., Spigelman, M., Zias, J., Gernaey-Child, A.M., Minnikin, D.E. (1998): Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27: 265–269.
- Donoghue, H.D., Uberlaker, D.H., Spigelman, M. (1999): The use of palaeomicrobiological techniques in a current forensic case. In: Pálfi, G., Dutour, O., Deák, J., Hutaás, I. (Eds) *Tuberculosis Past and Present*. Golden Book Publisher Ltd, Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 363–368.
- Driscoll, J.R. (2009): Spoligotyping for molecular epidemiology of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Methods Mol. Biol.*, 551: 117–128.
- Fletcher, H.A., Donoghue, H.D., Holton, J., Pap, I., Spigelman, M. (2003): Widespread occurrence of Mycobacterium tuberculosis DNA 18–19th Century Hungarians. *Am. J. Phys. Anthrop.*, 120: 144–152.
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Ahmed, A.M.S., Robertson, D.J., Nolan J., Chamberlain, A.T. (1999): Correlation of the occurrence of mycolic acids with tuberculosis in archaeological population. In: Pálfi Gy., Dutour O., Deák J., Hutás I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publ., Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 273–283.
- Haas, C.J., Zink, A., Molnár, E., Marcsik, A., Dutour, O., Nerlich, A.G., Pálfi, Gy. (1999): Molecular evidence for tuberculosis in Hungarian skeletal samples. In: Pálfi Gy., Dutour O., Deák J., Hutás I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publ., Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 383–391.
- 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. *Am. J. Phys. Anthrop.*, 113: 293–304.

- 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.
- Hershkovitz, I., Greenwald, C.M., Latimer, B., Jellema, L.M., Wish-Baratz, S., Eshed, V., Dutour, O., Rothschild, B.M. (2002): Serpens Endocrania Symmetrica (SES): A new term and a possible clue for identifying intrathoracic disease in skeletal populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 118: 201–216.
- Holloway, K.L., Henneberg, R.J., de Barros Lopes, M., Henneberg M. (2011): Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. *HOMO Journal of Comparative Human Biology*, 62(6): 402-458.
- Horváth, G., Molnár, E., Kovács, J., Wicker, E., Bérato, J., Pálfi, Gy. (1994): Paleopathological diagnosis and interpretation of seronegative spondylarthropathies from the 17th century. *Acta Biologica Szeged.*, 40: 103–115.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van 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. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 907–914.
- Kelley, M.A., Micozzi, M.S. (1984): Rib lesions in chronic pulmonary tuberculosis. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 65: 381–386.
- Lovász, G. (2005): *Bácsalmás-Óalmás 16-17. századi temető általános embertani feldolgozása (2001–2003-as feltárás)*. Szakdolgozat. SZTE Embertani Tanszék, Szeged.
- Lovász, G. (2008): Comparative anthropological analysis of non-Hungarian skeletal populations from the 16–17th centuries. *Acta Biol. Szeged.*, 52(2): 343–344.
- 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., Pálfi, Gy., Pósa, A., Wicker, E. (2012): Sátorlakó vándorok a török kori Észak-Bácskában – „Körkép-körkép” a hódoltság kori bácsalmási rácokról. *Bácsország*, 1(60): 68–73.
- Maczel, M. (2003): *‘Sur les Traces de la Tuberculose’. Critères diagnostiques des atteintes infectieuses du squelette Humain et leur application dans des séries anthropologiques françaises et hongroises*. PhD Thesis, University of Szeged, University of La Méditerranée (TTK-49/2004).
- Marscik, A. (1972): Diagnose einer Generalisierten TBC-Erkrankung auf einen Awarzeitlichen Skelett. *Anthrop. Közl.*, 16: 99–103.
- Marscik, A., Molnár, E., Ósz, B., Donoghue, H., Zink, A., Pálfi, Gy. (2009): Adatok a lepra, tuberculosis és syphilis magyarországi paleopatológiájához. *Folia Anthropologica*, 8: 5–34.
- Minnikin, D.E., Besra, G.S., Lee, O.Y.-C., Spigelman, M., Donoghue, H.D. (2011): The interplay of DNA and lipid biomarkers in the detection of tuberculosis and leprosy in mummies and other skeletal remains. In: Gill-Frering, G., Rosendahl, W., Zink, A., Piombino-Mascoli, D. (Eds) *Yearbook of Mummy Studies I*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München. pp. 109–114.
- Molnár, E., Pálfi, Gy. (1994): Probable cases of skeletal infections in the 17th century anthropological series of Bácsalmás (Hungary). *Acta Biologica Szeged.*, 40: 117–133.
- Neparáczi, 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 Szeged.*, 55(1): 41–45.
- 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.
- 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 Publ., Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 253–261.

- Ortner, D.J. (2003): *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. Academic Press, San Diego.
- Pap, I., Józsa, L., Repa, I., Bajzik, G., Lakhani, S.R., Donoghue, H.D., Spigelman, M. (1999): 18–19th century tuberculosis in naturally mummified individuals (Vác, Hungary). In: Pálfi, G., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (Eds) *Tuberculosis: Past and present*. Golden Books, Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 421–428.
- Pálfi, Gy. (2002): Paleoepidemiological reconstruction of tuberculosis, with particular attention to Europe. In: Bennike, P., Bodzsár, E., 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 leletegyüttes fontosabb paleopatológiai adatai. In: Gerelyes, I., Kovács, Gy. (Eds) *A hódoltság régészeti kutatása. Opuscula Hungarica III*. Magyar Nemzeti Múzeum, Budapest. pp. 237–244.
- Pálfi, Gy., Marcsik, A. (1999): Paleoepidemiological data of tuberculosis in Hungary. In: Pálfi Gy., Dutour O., Deák J., Hutás I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publ., Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 531–541.
- Pálfi, Gy., Bereczki, Zs., Ortner, D.J., Dutour, O. (2012): Juvenile cases of skeletal tuberculosis from the Terry Anatomical Collection (Smithsonian Institution, Washington DC, USA). *Acta Biologica Szeged.*, 56 (1): 1–12.
- Pálfi, Gy., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (1999, Eds): *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publisher, Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged.
- Pálfi, Gy., Molnár, E., Bérato, J., Dutour, O. (1997): Cinq cas de pathologie infectieuse ou inflammatoire dans une série anthropologique hongroise. *Anthropologie et Préhistoire*, 108: 165–176.
- Pálfi, Gy., Molnár, E., Bérato, J., Wicker, E., Dutour, O. (1996): Deux observations ostéoarchéologiques de spondylarthrite ankylosante et leur possible relation familiale. *Revue du Rhumatisme*, 63(2): 160–161.
- Rohland, N., Siedel, H., Hofreiter, M. (2009): A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Molecular Ecology Resources*, 1755–0998.2009.02824.x.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D. (1993): *Paleopathology: Disease in the fossil record.*: CRC Press, London.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D. (2006): *Skeletal Impact of Disease*. Museum of Natural History, New Mexico.
- Rothschild, B.M., Rothschild, C. (1999): Evolution of osseous/radiologic signs of tuberculosis. In: Pálfi Gy., Dutour O., Deák J., Hutás I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publ., Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 293–301.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G., Greenblatt, Ch., Donoghue, H., Spigelman, M., Brittain, D. (2001): Mycobacterium tuberculosis Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clin. Inf. Dis.*, 33: 305–311.
- Salo, W., Aufderheide, A., Buikstra, J., Holcomb, T. (1994): Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 2091–2094.
- Santos, A.L., Roberts, C. (2001): A picture of tuberculosis in young Portuguese people in the early 20th century: a multidisciplinary study of the skeletal and historical evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 115: 38–49.
- Schultz, M. (1999): The role of tuberculosis in infancy and childhood in prehistoric and historic populations. In: Pálfi Gy., Dutour O., Deák J., Hutás I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book Publ., Tuberculosis Foundation, Budapest, Szeged. pp. 501–509.
- Spigelman, M., Lemma, E. (1993): The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons. *Int. J. Osteoarch.*, 3:n137–143.
- Wicker, E. (1999): Bácsalmás-Óalmás későközépkori rác temetője. *Cumania*, 15: 25–30.
- Wicker, E. (2011): Iszlám elemek az észak-bácskai 16–17. századi rácok és vlahok temetkezési szokásaiban. *Bácsország*, 2(57): 21–28.

World Health Organisation (2010): *Global Tuberculosis Control 2010*. WHO Report, World Health Organisation, Geneva. pp. 218.
Zink, A.R., Molnár, E., Motamedi, N., Pálfi, G., Marcsik, A., Nerlich A. (2007): Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. *Int. J. Osteoarch.*, 17(4): 380–391.

Levelezési cím: Pálfi György
Mailing address: Szegedi Tudományegyetem
Embentani Tanszék
Egyetem u. 2.
6722 Szeged
Hungary
palfigy@bio.u-szeged.hu

