

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Glosová

Bioarcheologie a tuberkulóza v populacích minulosti – evoluce, ekologie a diagnostika
mykobakteriální infekce pomocí metod molekulární biologie
Bioarchaeology and tuberculosis in past populations – evolution, ecology and diagnosis
of mycobacterial infection using molecular biology methods

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:
Prof. RNDr. Jaroslav Brůžek, CSc., Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

Ráda bych srdečně poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Jaroslavu Brůžkovi, CSc., Ph.D., za jeho neskonalou vstřícnost, trpělivost a toleranci a dále své rodině za veškerou podporu při studiu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 12. 2024

.....

Kateřina Glosová

Abstrakt

Tuberkulóza patří mezi nejstarší známé infekční choroby, které provázely lidské populace napříč historií. Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium tuberkulózy v historických populacích prostřednictvím kombinace bioarcheologických a molekulárně-biologických přístupů. Hlavním cílem je analyzovat projevy tuberkulózy v kosterních pozůstatcích a hodnotit přínos moderních diagnostických metod, jako jsou PCR, NGS, lipidické biomarkery a paleoproteomika, při detekci *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Práce se zabývá výhodami a limity jednotlivých metod, přičemž zvláštní pozornost věnuje problematice degradace DNA a kontaminace vzorků. Výsledky této práce zdůrazňují důležitost integrace tradičních paleopatologických postupů a moderních technologií pro hlubší pochopení evoluce a šíření tuberkulózy v minulosti.

Klíčová slova

Tuberkulóza, *Mycobacterium tuberculosis*, bioarcheologie, molekulárně-biologické metody, PCR, NGS, paleoproteomika, lipidické biomarkery, evoluce tuberkulózy

Abstract

Tuberculosis is one of humanity's oldest infectious diseases that has significantly impacted populations throughout history. This bachelor thesis focuses on the study of tuberculosis in historical populations using an interdisciplinary approach that combines bioarchaeological analysis with molecular biological methods. The main objective is to analyse the manifestations of tuberculosis in skeletal remains and to assess the effectiveness of modern diagnostic tools, including PCR, NGS, lipid biomarkers, and paleoproteomics, in detecting the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The paper discusses the benefits and limitations of each method, with a particular focus on challenges related to DNA degradation and sample contamination. The findings underscore the value of integrating traditional palaeopathological techniques with advanced molecular approaches to achieve a more comprehensive understanding of the evolution, spread, and historical impact of tuberculosis.

Keywords

Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, bioarchaeology, molecular biology methods, PCR, NGS, palaeoproteomics, lipid biomarkers, evolution of tuberculosis

Seznam použitých zkratk

aDNA	Ancient DNA (starověká DNA)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (vakcína proti tuberkulóze)
BP	Before Present (před současností, standardně před rokem 1950)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
DOTS	Directly Observed Treatment Short-Course (přímé sledování léčby krátkodobým režimem)
DR	Direct Repeat (přímé opakování)
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunodeficiency)
IGRA	Interferon-Gamma Release Assay (test uvolňování interferonu-gama)
LC	Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie)
LTBI	Latent Tuberculosis Infection (latentní tuberkulózní infekce)
M. tb	Mycobacterium tuberculosis (bakterie způsobující tuberkulózu)
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (laserová desorpce/ionizace s analýzou letového času)
MDR-TB	Multidrug-Resistant Tuberculosis (multirezistentní tuberkulóza)
MTBC	Mycobacterium tuberculosis Complex (komplex Mycobacterium tuberculosis)
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test (test amplifikace nukleových kyselin)
NGS	Next-Generation Sequencing (sekvenování nové generace)
NTM	Nontuberculous Mycobacteria (netuberkulózní mykobakterie)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PIMs	Phosphatidylinositol Mannosides (fosfatidylinositol mannosidy)
PPNB	Pre-Pottery Neolithic B (předkeramický neolit B)
RR-TB	Rifampicin-Resistant Tuberculosis (rifampicin-rezistentní tuberkulóza)
TB	Tuberculosis (tuberkulóza)
TBC	Tuberkulóza
TbD1	Tuberculosis Deletion 1 (tuberkulózní delece 1)
USA	United States of America (Spojené státy americké)
XDR-TB	Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (extenzivně rezistentní tuberkulóza)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Tuberkulóza: etiologie, epidemiologie a patogeneze v minulosti a dnes	3
3.1	Etiologie.....	3
3.2	Patogeneze	4
3.3	Historie léčby onemocnění	6
3.4	Současná klinická diagnostika.....	9
3.5	Epidemiologie.....	10
4	Bioarcheologie TBC	12
5	Paleopatologická diagnostika s užitím aDNA	19
5.1	PCR.....	19
5.2	NGS	20
5.3	Spoligotyping.....	21
5.4	Lipidové biomarkery	22
5.5	Paleoproteomika	22
6	Diskuze	25
7	Závěr	27
	Seznam zdrojů	28

1 Úvod

Tuberkulóza je jednou z infekčních chorob, která provází lidstvo již tisíce let. Její přítomnost je zaznamenána nejen v historických písemných pramenech, ale také v kosterních pozůstatcích nalézáných po celém světě. Tato nemoc významně ovlivňovala demografii, ekonomiku i kulturu lidských populací, přičemž její dopad je patrný až do současnosti. I přes pokrok v medicíně a diagnostice zůstává tuberkulóza globálním zdravotním problémem.

Studium tuberkulózy v historických populacích představuje významnou výzvu na pomezí bioarcheologie a molekulární biologie. Tradiční metody, jako je analýza kosterních změn způsobených infekcí, poskytují cenné informace, ale mají své limity. Moderní molekulárně-biologické metody, jako je PCR nebo NGS, nabízejí nové možnosti identifikace patogenu a umožňují hlubší vhled do historie této nemoci. Kombinace těchto přístupů otevírá nové cesty pro pochopení evoluce především *Mycobacterium tuberculosis* a její adaptace na lidské hostitele.

Bakalářská práce se zaměřuje na propojení tradičních a moderních přístupů při studiu tuberkulózy v historických populacích. Hlavním cílem je představit nejnovější poznatky bioarcheologického výzkumu a analyzovat přínos molekulárně-biologických metod při diagnostice tuberkulózy ze starověkého kosterního materiálu. Práce rovněž upozorňuje na limity těchto metod, jako je degradace DNA a kontaminace vzorků, a nabízí pohled na budoucí možnosti výzkumu v této oblasti.

Práce je rozdělena do několika hlavních kapitol. Úvodní část se věnuje historickému kontextu a významu tuberkulózy. Následuje kapitola zaměřená na bioarcheologické metody studia infekčních chorob, s důrazem na tuberkulózu. Další část se zabývá molekulárně-biologickými metodami, jejich principy, výhodami a limity. V diskuzi jsou pak shrnuty klíčové poznatky.

2 Cíle práce

Bakalářská práce si klade za cíl přiblížit nejnovější poznatky z bioarcheologického výzkumu, který se zaměřuje na počátky tuberkulózy v lidské společnosti a její projevy v kosterních pozůstatcích. Práce chce rovněž upozornit na skutečnost, že ačkoli infekce tuberkulózou může zanechat stopy na kostře, tyto nálezy tvoří pouze malý zlomek skutečných případů, protože ne všichni infikovaní vykazují kosterní příznaky. Zvláštní pozornost si žádá problematika využití starověké DNA (aDNA), která sice dokáže potvrdit přítomnost patogenu, ale neodráží skutečnou míru nemocnosti v populaci. Práce má rovněž za cíl uvést přehled moderních molekulárně-biologických metod, které umožňují detekci tuberkulózy v archeologickém materiálu.

3 Tuberkulóza: etiologie, epidemiologie a patogeneze v minulosti a dnes

Tuberkulóza (TBC) představuje starobylé onemocnění, které dlouhodobě sužuje lidstvo. Bok po boku se vyvíjela s člověkem a vytvořila si rozsáhlý přirozený rezervoár v populaci prostřednictvím latentní infekce (Bañuls et al., 2015). V současnosti opět obsazuje první příčku v počtu nejvíce úmrtí na infekční chorobu jediného původce na světě, kdy po třech letech vystřídala prvenství koronavirového onemocnění 2019 (COVID-19), a zůstává tak nadále velkou hrozbou. Za rok 2023 si vyžádala 1,25 milionu obětí a počet nemocných stále přesahuje 10 milionů (WHO, 2024). Nemoc u lidí vyvolává zejména bakterie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB či M. tb), případně *M. bovis* nebo *M. africanum*, které patří do komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) obsahujícího blízce příbuzné kmeny adaptované na člověka a zvířata.

Tuberkulóza, označovaná také jako „bílý mor,“ zasáhla lidstvo napříč staletími a měla hluboký dopad na zdravotní, sociální a ekonomické podmínky společností (Daniel, 2006). V 19. století se stala symbolem chudoby a zároveň byla nemocí, která inspirovala mnohé umělce a literáty (Dormandy, 1999). Tato globální hrozba nejvíce postihuje země s nižšími příjmy, kde až čtvrtina populace žije s latentní formou infekce (WHO, 2024). Nemoc je navíc úzce spojena s HIV/AIDS, což komplikuje její léčbu a prevenci (Pawlowski et al., 2012). Významným problémem je také vzestup multirezistentních kmenů, které odolávají tradiční antibiotické léčbě (WHO, 2021a). Přetrvávající stigma a nerovnoměrný přístup ke zdravotní péči pak ztěžují snahy o eradikaci tohoto onemocnění (Lönnroth et al., 2010).

Přetrvávající význam nemoci poukazuje na důležitost studia tuberkulózy v minulosti: jejího původu a vývoje, rozšíření a šíření TBC v čase a vztahu ke světové populaci. Interpretace těchto informací integrativním přístupem umožňuje pochopit, proč toto onemocnění provází lidstvo dodnes a jak si s ním poradit (Minnikin et al., 2012; Zein-Eddine et al., 2023).

3.1 Etiologie

Rod *Mycobacterium* se řadí do čeledi *Mycobacteriaceae* a řádu *Actinomycetales*. Mykobakterie jsou aerobní a nepohyblivé. Jedná se o tenké a lehce zahnuté nepohyblivé tyčky (tyčinky), které tvoří spory. Jejich charakteristická hydrofobní buněčná stěna je chrání před vyschnutím, mnoha chemickými látkami a likvidací makrofágy imunitního systému hostitele

díky obsahu značného množství lipidů včetně mykolových kyselin, které sestávají z velmi dlouhých řetězců peptidů a polysacharidů a vytvářejí špatně propustný voskovitý povrch. Složení buněčné stěny propůjčuje mykobakteriím mimo jiné vlastnost pomalého růstu (oproti jiným bakteriím), acidorezistenci a odolnost vůči alkoholům. To znamená, že se špatně obarvují i odbarvují a ve slabých roztocích kyselin, zásad a alkoholů dovedou přežít. Ničivě na ně působí vystavení slunci, UV záření a teplota nad 60 °C (Solovič, 2019; Vachek et al., 2015).

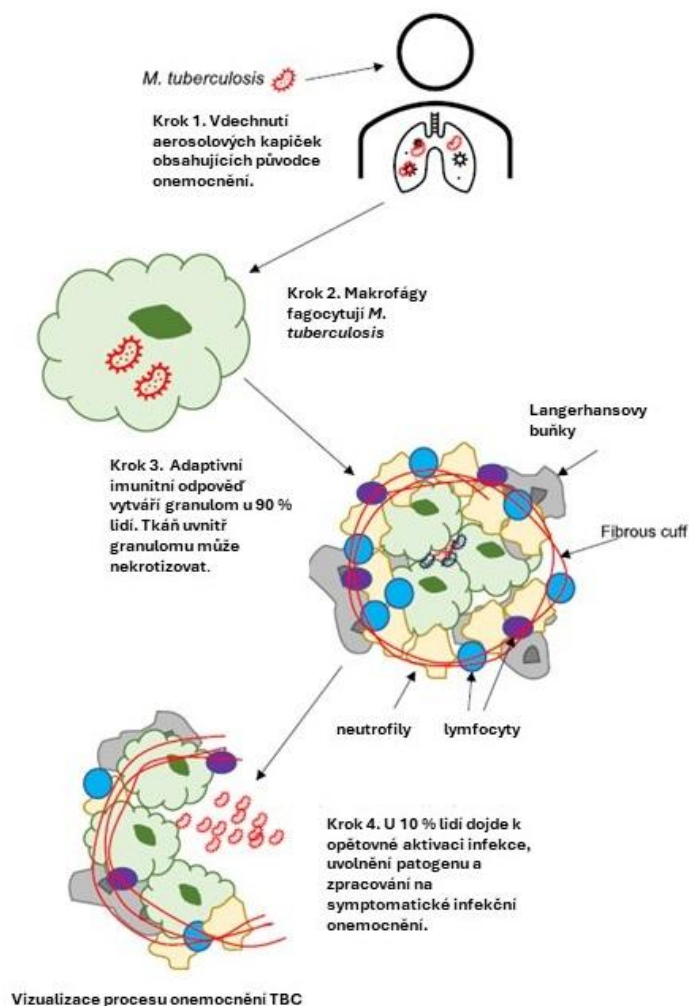
Etiologický agens *Mycobacterium tuberculosis* komplex způsobující tuberkulózu obsahuje klinicky významné druhy *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, dále *M. caprae* a *M. pinnipedii*. V neživém prostředí se nerozmnoží, parazitují intracelulárně a selektivně u savců, zvláště člověka (Kopecká & Hricíková, 2023).

Netuberkulózní mykobakterie (NTM) vyvolávají mykobakteriízy. Mezi jejich původce patří kupříkladu komplex *Mycobacterium avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* a jiné. Nachází se běžně v životním prostředí, v půdě a ve vodě, a jejich parazitismus se nevyznačuje specifitou (Solovič, 2019).

3.2 Patogeneze

K nákaze dochází většinou kapénkami, které se šíří vzduchem při kašláním nebo kýchním infikované osoby s aktivní (a neléčenou) plicní formou tuberkulózy. Vdechnutý aerosol se dostává do plicních sklípků, kde jsou bacily zpravidla fagocytovány (pohlcneny) makrofágy v rámci buněčné imunitní odpovědi. Následně vzniká zánět, kdy se tvoří granulom. Ve většině případů potom nemoc přechází do latentní fáze bez příznaků (Minnikin et al., 2012). Pokud se bakterie v makrofázích nezničí, dále se v nich množí a rostou, rozvíjí se primární fáze tuberkulózy (primární tuberkulóza).

Toxiny bakterie neprodukuje, přežití v makrofázích je klíčovým aspektem virulence. Mykobakterie se mohou z plic dostat krevním řečištěm do lymfatického systému, odkud se rozšíří po těle jako mimoplicní TBC (Donoghue, 2016). Za zmínku příkladu mimoplicní TBC stojí závažná tuberkulózní meningitida postihující mozek a míchu. Polknutím infikovaného hlenu hrozí střevní tuberkulóza, přímým kontaktem s bakteriemi může dojít ke kožní tuberkulóze. Kromě inhalace docházelo spíše dříve k nákaze požitím nepasterizovaného mléka nebo masa od infikovaného zvířete. Takový zoonotický přenos je způsobený jinými členy komplexu MTBC než *M. tuberculosis*, jako např. *Mycobacterium bovis* (Minnikin et al., 2012; Donoghue, 2016).



Obrázek 1: Vizualizace procesu onemocnění TBC

Zdroj: Převzato a upraveno dle van Doren, 2022

V aktivní formu tuberkulózy se rozvine infekce jen u 5–10 % nakažených. Její průběh ukazuje Obrázek 1. Začátek onemocnění lze považovat za pomalý. V iniciální fázi dlouhodobého léčebného režimu je v ČR nutná hospitalizace (kvůli izolaci pacienta). Po dvou měsících už probíhá léčba zpravidla ambulantně. Bez terapie je šance na přežití 50 %. Pravděpodobnost vyléčení při půlroční farmakoterapii je 85 % (WHO, 2023). Nespecifické příznaky aktivní TBC zahrnují zvýšenou teplotu, pocení, nechutenství, hubnutí a únavu spojenou s celkovou nižší výkonností. Plicní tuberkulózu doprovází často kašel, vykašlávání krve, případně dušnost. Příznaky se liší dle postiženého orgánu, respektive dle dominující formy onemocnění (Kopecká & Hricíková, 2023).

Přestože nemoc postihuje nejčastěji plíce, bakterie je schopna napadat další orgánové soustavy. Podle toho lze klasifikovat tuberkulózní choroby na tuberkulózu dýchacího ústrojí, nervové soustavy, jiných orgánů (kostí a kloubů, močové a pohlavní soustavy, periferních

lymfatických uzlin, střev, pobřišnice a mezenterických uzlin, kůže a podkožního vaziva, oka, ucha, nadledvin a jiných určených orgánů) a tuberkulózu miliární (Homolka & Votava, 2012).

V současné medicíně se diagnostikuje fyzikálním nálezem, bakteriologicky, histologicky, rentgenovým snímkem a mikroskopickým vyšetřením. Při podezření na latentní tuberkulózu (LTBI) se využívají testy – tzv. IGRA testy (Interferon-gama Release Assay) a někdy kožní tuberkulinový test, které vyvoláním specifické odpovědi lymfocytů imunitního systému ověřují, jestli se buňky s patogenem setkaly. Riziko vzplanutí onemocnění v době latence nejvíce hrozí do 2 let (Kolek et al., 2019). K rychlé detekci lékové rezistence doporučuje Světová zdravotnická organizace (WHO, 2023) využívat genetické metody (konkrétně polymerázovou řetězovou reakci, PCR).

3.3 Historie léčby onemocnění

Nemoc během historie zaznamenala značné sociální a zdravotní dopady. Její globální zátěž přetrvává z důvodu nakažlivosti, chronického průběhu, dlouhodobé a komplexní léčby v řádu měsíců, složité imunitní odpovědi nebo vzniku (multi)rezistentních kmenů (Barberis et al., 2017). Optimální rekonstrukce historie onemocnění vyžaduje kombinované úsilí – řady oborů, a proto se odhady o jejím původu pohybují v širokém rozmezí v závislosti na použitém přístupu (Dutour, 2023, Zein-Eddine et al., 2023). Porozumění vztahů mezi patogeny a lidmi vyžaduje spolupráci zejména paleopatologie, fylogenetiky a paleomikrobiologie, jejichž výzkum pomáhá zasadit získané znalosti do bioarcheologického kontextu (Lewis et al., 2023). Bioarcheologové se věnují studiu lidských kosterních ostatků a dochovaných mumifikovaných těl z archeologických nalezišť, na nichž paleopatologie zkoumá znaky prodělaných onemocnění (Larsen, 2020; Roberts & Buikstra, 2020). Paleomikrobiologie svými metodami potvrzuje přítomnost infekčního původce v nálezech (i bez patologických změn), přispívá k objasnění evoluce patogenu a šíření jeho linií po světě (Donoghue, 2023; Lewis et al., 2023). Fylogenetika hledá univerzálního společného předka organismů, u kterých zjišťuje jejich příbuzenské vztahy. Biokulturní souvislosti a teorie lidského demografického vývoje a epidemiologie popisují vliv chování člověka na dynamiku infekčních chorob a ekologickou diverzitu patogenů (van Doren, 2022).

Předpokládá se, že komplex *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) vznikl v rozmezí před 6 000 až 70 000 lety (Zein-Eddine et al., 2023). V současnosti se vychází ze závěrů fylogenetických a fylogenomických studií (Wirth et al., 2008; Comas et al., 2013; Bos et al., 2014). V rámci konceptu *Mycobacterium prototuberculosis* jako dávného prapředka

komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) se rozvíjí hypotéza o původu MTBC z *M. canetti* nebo jemu podobných kmenů (Gutierrez et al., 2005; Orgeur et al., 2024). Členové tohoto komplexu se tradičně rozlišují na základě morfologie kultivovaných kolonií – hladké kolonie jsou charakteristické pro *M. canetti*, zatímco drsné jsou pozorovány u členů MTBC (Orgeur et al., 2024). Stáří společného předka těchto organismů se odhaduje na přibližně 3 miliony let (Gutierrez et al., 2005).

První písemné doklady o tuberkulóze se nalézají u starověkých civilizací na územích Indie, Číny, Řecka a Egypta, které prokazují výskyt tuberkulózy i ve svých uměleckých dílech a kosterních záznamech. Už Isokrates v Řecku prvně přisuzoval TBC infekčnost. Hippokrates používal pro chorobu název *phthisis* (srovnatelně česky *úbytě*) podle řeckého významu *ubývat, mizet* (Roberts & Buikstra, 2003).

Ve středověku a renesanci začala být známá mimoplicní forma tuberkulózy – termín *scrofula* označoval mykobakteriální postižení krčních uzlin. Ve Francii a Anglii říkali nemoci „královské zlo“, od které jim měl pomoci panovníkův dotek (Murray et al., 2016).

V 17. a 18. století se uplatňovala označení *ftíza* a *souchotiny*, dokud v roce 1832 nezavedl Johann Lukas Schönlein současný název „tuberkulóza“. V 18. století dosáhlo rozšíření tuberkulózy epidemických rozměrů a období průmyslové revoluce dalšímu šíření napomáhalo. Za související rizikové faktory se považuje nedostatečné větrání a málo slunečního svitu, špatné pracovní podmínky, přelidnění, chudoba a podvýživa. Tuberkulóze se začínalo přezdívat „bílý mor“ kvůli bledosti nakažených (Frith, 2014). V 19. století došlo k zásadním objevům týkajících se tuberkulózy, včetně rozpoznání jejího výskytu i mimo plíce. Sir Percival Pott již dříve popsal tuberkulózu páteře, která je dodnes známa jako Pottova nemoc (Blevins & Bronze, 2010). Infekční povahu choroby poté prokázal chirurg Villemin a v roce 1882 objevil jejího původce otec bakteriologie Robert Koch, nositel Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství (Barberis et al., 2017). Pro *Mycobacterium tuberculosis* se od té doby vžil název Kochův bacil (Esteves et al., 2017).

Prvních pokroků v léčbě se lidstvo dočkalo zavedením sanatorií zajišťujících zdravou stravu, čerstvý vzduch a dostatek světla pro úspěšné uzdravení (Murray et al., 2015). Během jejich éry docházelo k operačním zákrokům, které vedly k vývoji hrudní chirurgie. Chirurgická léčba spočívala v kolapsových metodách, od kterých se do velké míry upustilo s objevem antituberkulotik. Dnes se zákroky uplatňují v určitých případech rezistence pacientů vůči podávaným lékům (Odell, 2012).

Ve 20. století vypadalo snižování výskytu tuberkulózy nadějně. Zlepšovaly se životní podmínky a lékařská péče. Albert Calmette a Camille Guérin vynalezli vakcínu BCG

(Bacillus Calmette-Guérin) za použití oslabeného kmene *Mycobacterium bovis* (Bañuls et al., 2015). Ve 40. letech bylo vyvinuto první účinné antibiotikum proti TBC – streptomycin a následovalo používání isoniazidu, etambutolu, rifampicinu a pyrazinamidu (Tonar, 2017). Zařazování dalších nových léků dosud umožňuje zkvalitňování a zkracování fází léčby (Murray et al., 2015). Světová zdravotnická organizace (WHO) v roce 2023 uvedla dostupnost léčebných režimů proti tuberkulóze s délkou trvání od 1 do 6 měsíců, přičemž standardně doporučuje 4–6měsíční léčbu (WHO, 2023).

Model krátkodobého režimu léčby DOTS (*Directly Observed Treatment Short-Course*), který se efektivně využívá po celém světě, vyvinul v 70. letech 20. století český lékař Karel Stýblo (Raviglione & Uplekar, 2006). Sestává z iniciační fáze, obecně dlouhé 2 měsíce, kdy se podává kombinace zpravidla 4 antituberkulotik, a obvykle čtyřměsíční pokračovací fáze využívající dvojkombinaci léků (WHO, 2023). Kombinována jsou antituberkulotika bakteriocidního účinku (tzn. likvidující samotný mikroorganismus) a bakteriostatického účinku (tlumící růst původce) – například etambutol (Murray et al., 2015). Tato strategie byla Světovou zdravotnickou organizací přijata jako standardní metoda kontroly tuberkulózy v roce 1991. Stýblův přínos k boji proti tuberkulóze je dodnes uznáván, přičemž na jeho počest byla zřízena cena Karel Stýblo Public Health Prize, kterou uděluje organizace The Union za významné příspěvky ke kontrole tuberkulózy (The Union, 2024). Účinná kontrola tohoto systému přispívá dodnes k nízké míře incidence tuberkulózy v ČR, která má nadále klesající tendenci (WHO, 2023).

Nedodržováním antimikrobní terapie po stanovenou dobu hrozí opětovný rozvoj nemoci a dochází k čím dál častějšímu vzniku multirezistentních (MDR-TB) nebo extrémně rezistentních (XDR-TB) forem TBC, které jsou v současnosti závažným celosvětovým problémem a překážkou v eliminaci onemocnění (Vašáková, 2017). Multirezistencí se v tomto případě rozumí odolnost mykobakterií vůči minimálně 2 antituberkulotikům 1. řady, extrémně rezistentní forma onemocnění představuje navíc mykobakteriální odolnost k polovině léků 2. řady (WHO, 2021b). Případy rezistence jsou zaznamenány především v rozvojových zemích a státech zasažených válkou (Vargová et al, 2017).

Preventivní protiepidemická opatření na českém území zahrnovala od 50. let plošné očkování novorozenců krátce po narození a od 60. let díky profesoru Raškovi povinnou pasterizaci mléka a eliminaci bovinního skotu pro zabránění nákazy člověka od zvířat (Kolek, 2012). Vakcinace ochraňující před závažnou tuberkulózní meningitidou nebo miliární formou TBC u dětí byla s účinností od 1. 11. 2010 zrušena pro příznivou epidemiologickou situaci v České republice. Česká republika dnes patří mezi země s velmi nízkou incidencí

tuberkulózy. Očkuje se pouze selektivně – příkladem je očkování dětí rizikových skupin a provádí se cílené vyhledávání a vyšetření jedinců ohrožených tuberkulózou (Kolek et al., 2019). I přes významné pokroky v diagnostice a léčbě však globální nerovnosti v přístupu k prevenci a terapii trvají. Rozkvět tuberkulózy stále umožňují stejné rizikové faktory jako v minulosti, například chudoba, podvýživa nebo přelidnění (Roberts et al., 2022).

3.4 Současná klinická diagnostika

Současná diagnostika tuberkulózní infekce se rychle vyvíjí díky pokrokům v molekulární biologii a biotechnologii. Tradiční metody detekce aktivní TBC, mikroskopické vyšetření sputa (Ziehl-Neelsenovo barvení) a časově náročná kultivace (Löwenstein-Jensenovo médium), trvající kvůli pomalému růstu mykobakterií několik týdnů, tvoří dlouhodobý základ klinické diagnostiky TBC (Zaporojan et al., 2024), nicméně jsou postupně nahrazovány novými technologiemi, které nabízí lepší citlivost, přesnost a rychlost výsledků, obzvláště důležitou v oblastech s vysokou prevalencí onemocnění a omezenými zdravotnickými zdroji (Gill et al., 2022). Mezi inovativní přístupy patří využití microRNA jako biomarkerů pro diagnostiku tuberkulózy, což představuje slibné řešení pro rychlou a přesnou detekci (Agrawal et al., 2024). Kromě toho jsou stále více využívány molekulární metody, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) a další technologie amplifikace nukleových kyselin (NAAT), které umožňují přímou detekci *Mycobacterium tuberculosis*. Příkladem je rychlý test GeneXpert MTB/RIF detekující také rezistenci na rifampicin (Acharya et al., 2020). Sekvenování nové generace (NGS) umožňuje detailní analýzu genomu patogenu a přesnější detekci multirezistentních kmenů TBC (Papa et al., 2023). PCR a NGS poskytují přesnou detekci i v případech, kdy je množství bakterií ve vzorku velmi malé. Nové diagnostické platformy zahrnují i nanotechnologické přístupy, které dále zvyšují citlivost a specifitu testů (Mukherjee et al., 2023). Další významné pokroky byly dosaženy ve vývoji point-of-care testů, které umožňují diagnostiku v terénu a v oblastech s omezeným přístupem k laboratorním zařízením (MacLean et al., 2020). Tyto technologie významně přispívají ke zlepšení (rychlosti) detekce a následné (zahájení) léčby tuberkulózy v globálním měřítku.

Pro diagnostiku latentní tuberkulózy je klíčová imunodiagnostika. Mantouxův tuberkulinový test hodnotí imunitní odpověď na mykobakteriální antigeny, ale jeho výsledky mohou být zkresleny očkovaním proti TBC (WHO, 2020). IGRA testy jsou přesnější, protože na ně očkování vakcínou BCG nemá vliv, ale jsou nákladnější a technologicky náročnější (MacLean et al., 2020).

V závěru každá z těchto metod má své výhody i omezení, a proto se v klinické praxi často používají v kombinaci, aby bylo dosaženo co nejpřesnější diagnózy (Zaporojan et al., 2024). Vývoj moderních molekulárních metod, sekvenování nové generace (NGS), umožňuje rychlejší diagnostiku a lepší kontrolu nad šířením rezistentních forem tuberkulózy, což je nezbytné pro zajištění efektivní léčby (WHO, 2024; Mugenyi et al., 2024).

3.5 Epidemiologie

Bakteriální infekční onemocnění tuberkulóza se přenáší vzduchem vykašlávanými bacily některého původce v dostatečném množství od nemocné osoby. Vyvolávají ji již zmíněné kmeny skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MTBC), do kterého patří *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. microti* a *M. pinnipedii*. Rod *Mycobacterium* zahrnuje druhy, které jsou obvykle seskupeny do komplexů. Nákazu lidí způsobuje hlavně tzv. tuberkulózní bacil (Kochův bacil) – *Mycobacterium tuberculosis*, ale nevylučuje se ani nakažení *M. africanum*, *M. canetti* nebo *M. bovis* (Bañuls et al., 2015; Rito et al., 2023).

Pro šíření v populaci má význam propuknutí onemocnění po stadiu latence, takzvaná postprimární (sekundární) TBC (Minnikin et al., 2012). Dle odhadů je zhruba čtvrtina světové populace infikována latentní formou tuberkulózy, přičemž u zhruba 10 % nakažených dochází k reaktivaci, rozvinutí aktivní TBC (Kopecká & Hricíková, 2023). Reaktivace zřejmě nastává v důsledku oslabeného imunitního systému organismu z důvodů podvýživy, přetížení organismu a jeho zatížení jinými nemocemi. Uvádí se souvislost s HIV, imunodeficity a diabetem. Ve vyspělých zemích jsou nejvíce ohroženi senioři, kteří ještě zažili léčbu před objevem antituberkulotik a vakcíny a kteří často trpí chronickými onemocněními. Válečné konflikty a jiné katastrofy vyvolávají přílišné vypětí pro organismus a potenciálně chudobu, jež jsou spojovány s tuberkulózou. Nevhodné hygienické a bytové podmínky zahrnující nedostatek čerstvého vzduchu a slunečního svitu špatným větráním a nadměrný počet lidí v obydlí či v práci jsou vnímány jako rizikové faktory v minulosti i dnes (Solovič, 2019).

Často zmiňovaným faktorem v souvislosti se šířením onemocnění je migrace obyvatel. V období válek lidé opouští své domovy a přesouvají se do evropských zemí s nízkou zátěží TBC. Přistěhovalci často pochází ze zemí s vysokou incidencí tuberkulózy, což vede k nárůstu míry onemocnění v Evropě (Vašáková, 2017). V roce 2022 představovaly osoby nenarozené v ČR 43 % nemocných s TBC (ÚZIS, 2023).

Nejvíce zatíženými státy světa jsou Indie, Indonésie, Čína a Filipíny, které se stále řadí mezi země rozvojové. Léčba se bohužel nedostává všem případům nakažených tuberkulózou. Zranitelné skupiny představují pacienti se sníženou imunitou včetně oslabení nemocí HIV, podvyživení, starší lidé, uprchlíci a imigranti z oblastí zasažených válečným konfliktem a s vysokou mírou výskytu TBC, lidé bez přístřeší nebo závislí na drogách. Alkoholismus a kouření tabáku se jeví jako další působící faktory (Fogel, 2015; WHO, 2023). V Evropě počet nově hlášených případů onemocnění standardně klesá. Oblast jihovýchodní Asie a západního Pacifiku reportují největší vzestupný trend, který se týká i Severní a Jižní Ameriky. Nejvíce lidí nemocných tuberkulózou zaznamenává jihovýchodní Asie. Země se potýkají s rostoucí mírou incidence TBC v souvislosti s pandemií COVID-19 (WHO, 2023).

Další problematiku ukazuje nárůst počtu případů nákazy multirezistentními nebo extrémně rezistentními kmeny *M. tuberculosis*. Takové bacily vznikají spontánními mutacemi v genomu přeživších mykobakterií kvůli nedodržování režimu léčby z různých příčin (Murray et al., 2015). Vzniklá rezistence se označuje jako sekundární (získanou), jejíž rozvoj a šíření ohrožuje úspěšnost léčebných postupů a globální snahy o vymýcení této choroby na světě (WHO, 2024). Vzrůstající rezistence tuberkulózy na lék rifampicin (označovaná jako RR-TB), dosavadně nejúčinnější lék první linie, nadále ohrožuje veřejné zdraví. Současná rezistence na rifampicin a lék isoniazid (multirezistentní TBC se zkratkou MDR-TB) a rifampicin-rezistentní forma sužují hlavně 3. země – Indii, Filipíny a Ruskou federaci, ve které se zároveň nachází nejvyšší podíl opětovných případů rezistentní TBC (WHO, 2023). Forma extrémní rezistence (XDR-TB) se potom vyznačuje odolností mykobakterií vůči alespoň 3 lékům druhé linie (Solovič, 2019). Rezistence je testována mikrobiologickou detekcí (bakteriologicky) a rychlými testy molekulární diagnostiky pro včasnou volbu nejúčinnější léčby (Murray et al., 2015; WHO, 2023).

Pokrok ve výzkumu tuberkulózy je pomalejší, než je žádoucí. Velká očekávání jsou v souvislosti s vyvinutím nové vakcíny i léků a technologického vývoje rychlých diagnostických testů za účelem prevence TBC a snížení její celosvětové incidence a úmrtnosti. Velkou roli hraje finanční zátěž. Pro ukončení epidemie preventabilní a léčitelné tuberkulózy je třeba ochotně spolupracovat se Světovou zdravotnickou organizací, zřejmě nejdůležitější autoritou v této oblasti, a řídit se jejími globálními plány se stanovenými cíli a závazky pro jednotlivé země, jejichž náplň odráží prioritu snižování prevalence onemocnění a sledování tuberkulózy v Evropě a dalších zapojených kontinentech světa (Solovič, 2019; WHO, 2023).

4 Bioarcheologie TBC

Tuberkulóza patří mezi nemoci, které lze studovat na kostře. Její diagnózu v lidských ostatcích umožňují skeletální změny zvané léze, které vznikají šířením mykobakterií krví a lymfou až do tvrdé kostní tkáně, kde dojde k patologické novotvorbě a/nebo úbytku kosti (Roberts & Buikstra, 2003). Vyvolané změny musí být pozorovatelné, dostatečně výrazné a (více či méně) spojované s TBC, aby mohly být paleopatologem popsány. Nejpravděpodobnější příčinu vzniku lézí potom určí tzv. diferenciální diagnostika zvažující všechna infekční onemocnění, která mohla léze vyvolat (Ortner, 2003). Podobně jako u nespecifických příznaků tuberkulózy, ani jednoznačné kosterní projevy vypovídající pouze o TBC neexistují (Pedersen et al., 2019). Právě z toho důvodu se provádí srovnávání morfologických projevů na kostře s jinými patologickými stavy postihující kosti a klouby. Mezi některé ze zvažovaných nemocí patří pyogenní infekce, infekce plísňového původu nebo jiného bakteriálního původu. Jedná se o spondylitidy charakterizované zánětlivými změnami. Dle lokace zánětu se mluví také o osteomyelitidách (v kostní dřeni) a artritidách (v kloubech) (Spekker et al., 2023).

V případě tuberkulózní infekce se rozeznávají v paleopatologickém záznamu zejména osteoartikulární TBC, kdy postiženou částí těla bývá páteř a větší klouby, nejčastěji konkrétně páteřní dolní hrudní obratle a horní bederní obratle a nepáteřní kloub kyčelní a kolenní (Spekker et al., 2023). TBC páteře, známá jako Pottova nemoc, se v literatuře zobrazovala s typickým hrbem (gibbem) a kyfózou. Dochází při ní k zánětu několika obratlových těl (spondylitidě), jejich kolapsu a srůstu (Roberts & Buikstra, 2003).

Posuzované charakteristické znaky shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Diagnostické znaky TBC na kostře

Žebra (RIB1 a RIB2)	Změny na viscerální ploše žeber, zahrnující malé noduly a drsnou texturu, s více než dvěma kusy žeber o délce nad 5 cm.	Povrchová proliferace kosti pokrývá více než 5 cm s jednou nebo více fazolovitými lyžickými lézemi o průměru nad 5 mm.
Obratle (VER, VEN1, VEN2)	Změny na kraniálních a kaudálních plochách všech hrudních a bederních obratlů, zahrnující pittingové léze nebo hluboké kaverny.	Tři nebo více velkých kaveren o průměru alespoň 3 mm s kulatými okraji nebo proliferace kosti s tkanou strukturou, pokrývající více než 50 % plochy kosti.
Pánevní kost (BOD, ACE1, ACE2, ILI)	Změny na boční části kosti kyčelní, acetabulárním povrchu a kyčelní jámě, zahrnující pittingové léze a proliferaci kosti.	Tři nebo více velkých kaveren nad 3 mm, husté trabekuly v acetabulární jámě a proliferace kosti pokrývající více než 50 % plochy kosti.
Dolní končetina – DK (4a – Femur)	Změny na hlavici a velkém trochanteru stehenní kosti a distální části femuru, zahrnující pittingové a kavernózní léze.	Shluky kaveren větší než 3 mm na dvou nebo více místech nebo jedna oblast nad 10 mm.
Dolní končetina – DK (4b – Tibia)	Změny na kloubní ploše proximální tibie a interkondylární oblasti.	Tři nebo více velkých kaveren nad 3 mm nebo proliferace kosti pokrývající více než 50 % interkondylární oblasti.
Horní končetina – HK (DH1, DH2, PR, PU)	Změny na kondylární části distálního humeru, radiální tuberositě proximálního radia a olekranu proximálního ulny.	Shluky kaveren větší než 3 mm na dvou nebo více místech nebo jedna oblast nad 10 mm.
Lebka (CRA1, CRA2, CRA3, ENDO1, ENDO2)	Změny na přední, střední a zadní kraniální jámě a na endokraniu, zahrnující pittingové a kavernózní léze.	Diskolorovaná kost s mělkými nebo hlubokými větvičnými se depresemi většími než 1 cm, pittingové léze v kraniálních jámách a endokraniu.

Poznámka: První sloupec (Znak), druhý sloupec (Lokace), třetí sloupec (Změny).

Zdroj: Převzato a upraveno dle Masiu et al. (2023)

Kost se vyznačuje jen několika možnými způsoby, kterými reaguje na působící chorobné procesy, což zdůrazňuje nejednoznačnost a složitost stanovení diagnózy z kostry. Pokud se prokáže, že kostní změny skutečně způsobila nejspíše tuberkulóza, ještě to neznamená, že se stala i příčinou smrti daného člověka. Ačkoliv může tuberkulóza postihnout jakoukoliv část těla, aktivní infekce v časném stadiu mnohdy nezpůsobuje změny skeletu. Znaky na kostře se projeví zhruba u 3 % nemocných plicní TBC a u 30 % osob trpících mimoplicní TBC (Roberts & Buikstra, 2003, 2019). Celkově se také uvádí, že tuberkulóza kostí a kloubů se projeví u 5 % jedinců s TBC (Vargová et al., 2017).

Je-li uvažován osteologický paradox (Wood et al., 1992), tak dostatečně výrazné léze se spíše vytvoří až v delším časovém horizontu u jedinců s vyšší imunitou, kteří s nemocí zvládnou přežít do jejího chronického stadia. Se závažností onemocnění TBC teoreticky roste pravděpodobnost jejího projevu na kostře, a čím běžnější nemoc byla, tím více takto postižených koster lze najít v archeologickém vzorku z pohřebišť (Roberts & Buikstra, 2003).

Dle archeologických důkazů se tuberkulóza v populacích minulosti vyskytovala, ale momentálně lze velmi těžce určit, do jaké míry byla častá a kolik obětí si vyžádala. Infikovaní

jedinci mohli podlehnout nemoci dříve, než došlo k patologickým kosterním změnám (Wood et al., 1992). Vyzvednuté kostry pohřebiště nemusí představovat reprezentativní vzorek populace – např. celé pohřebiště nebylo vykopáno nebo v něm není pohřbena celá populace. Hrozí též, že pozůstatky některých jedinců se ani nedochovaly. Kosterní pozůstatky tedy dokládají výskyt nemoci v populaci, ale nereprezentují jeho skutečnou četnost srovnatelnou se současnou incidencí a prevalencí (Siek, 2013).

Pro pochopení výskytu TBC v minulých populacích je zásadní uvědomovat si její multifaktorialitu jako nemoci člověka. Na vznik a šíření tohoto onemocnění působí součinně a pozitivně mnoho vlivů. Paleoepidemiologické vlastnosti tuberkulózy zahrnují i v průběhu času inter- a intra- populační rozdílnost projevů choroby nebo změny ve vztahu hostitel-patogen, které v důsledku ovlivňují výskyt lézí spojených s chronickým stadiem onemocnění (Pedersen, 2017).

Detekce tuberkulózy u kosterních souborů vyžaduje definování souboru lézí specifických pro TBC a zavedení reprodukovatelných hodnoticích kritérií osteologických metod, která by byla jednotná a umožnila tak paleoepidemiologické posouzení geografického rozšíření nemoci v populaci (Vargová et al., 2017).

Posouzení zastoupení TBC v populaci je s nedostatečně zachovalými nebo počtem omezenými kosterními pozůstatky obtížné. Úplný skelet umožňuje pochopení archeologického kontextu. Kosterní projevy tuberkulózy se navíc liší u případů z předantibiotické éry a u jedinců léčených antituberkulotiky (Holloway et al., 2011). Paleopatologické studium změn na kostře jednotlivce vypovídá o místě a období výskytu nemoci. Paleoepidemiologický výzkum na tyto znalosti navazuje a snaží se je interpretovat v souvislosti s lidským osudem a životními podmínkami (Milner & Boldsen, 2017).

Z globální perspektivy byla dosud nalezena většina důkazů TBC z poškozených kostí z archeologického kontextu na evropském kontinentu. Nabízí se několik hlavních důvodů nedostatku dokladů tuberkulózy v jiných oblastech světa. Archeologické lidské ostatky mohou chybět, protože se nemoc v určitých místech skutečně v minulosti nevyskytovala. Existují také oblasti, které nebyly paleopatologicky (dostatečně) prozkoumány, případně se v nich pozůstatky nedochovaly v důsledku různých příčin (Roberts et al., 2022). Podmínky prostředí, ve kterém jsou nalezeny lidské ostatky, značně ovlivňují rychlost posmrtných změn. Napomáhajícím faktorem uchování je sucho, horké nebo velmi chladné. Uchování ve vlhku vyžaduje více specifické podmínky, například anaerobní prostředí bez kyslíku. Konečně způsobem pohřbení se ovlivní množství dochovaných kosterních důkazů ke studiu

(Donoghue, 2023). Balzamováním se předcházelo rozkladu těla, zpopelněním pravděpodobně zůstalo minimum ostatků, pokud vůbec nějaké (Roberts & Buikstra, 2003).

Nejstarší případy tuberkulózy zaznamenané v lidských kosterních pozůstatcích spadají do období před 8 000 až 10 000 lety a pochází z Blízkého východu a Evropy (Buzic & Giuffra, 2020). Období odpovídá neolitu, kdy vznikalo zemědělství, zaváděla se domestikace a usedlý způsob života. Tento přechod byl doprovázen výrazným zvýšením počtu obyvatel (Dutour, 2023). Lidé žili v úzkém kontaktu se zvířaty, takže vznikla hypotéza o zoonotickém původu TBC. Souvislost doby rozvoje domestikace s prvními nálezy lidských ostatků postižených tuberkulózou vedla ke scénáři podporující původ *M. tuberculosis* ze zvířecího kmene *M. bovis*. Kupříkladu v této kapitole zmiňovaný případ pleistocenního bizona z Ameriky předpokládá vznik onemocnění ještě před domestikací a jeho vzorek nevykazoval největší podobnost s *M. bovis*. Genomika hypotézu zoonotického původu TBC vyvrátila (Galagan, 2014). *Mycobacterium bovis* je nyní považován za odvozenou linii (Brosch et al., 2002), jejíž vznik se odhaduje například do počátků domestikace rostlin a zvířat v Mezopotámii před zhruba 13 000 lety, kde se kmeny do doby před 10 000 lety diverzifikovaly, než se migračně rozšířily spolu s lidmi a následně lokálně adaptovaly (Wirth et al., 2008; Barbier & Wirth, 2017).

Přehled nejstarších projevů TBC z kosterních pozůstatků

Přestože fylogenetický výzkum odhaduje vznik společného předka lidského kmene *M. tuberculosis* do počátků svrchního paleolitu, kdy moderní člověk *Homo sapiens* odešel z Afriky, prokazující paleopatologické důkazy nebyly publikovány. Jediný nalezený doklad čeká na molekulární potvrzení (Dutour, 2023). Prezentovaný případ evropské svrchně paleolitické tuberkulózy lovců a sběračů v závěru evropského svrchního paleolitu (magdalenien) či počátkem mezolitu (azilien) v jihovýchodní Francii morfologicky odpovídá tuberkulóze pánve (Coqueugniot et al., 2023). Jiná výjimka se týká potvrzeného případu infekce zvířete ze Severní Ameriky, jehož pozůstatky se našly v jeskyni ve státě Wyoming (USA). Vyhynulý bizon z pozdního pleistocénu byl nakažen starobyljším kmenem, blízké příbuzným členům komplexu MTBC. Vzorek kosti s odhadovaným stářím 17 000 BP vykazoval největší podobnost s *M. africanum* (82,3 %) a dále s *M. tuberculosis* (76,6 %). Tento záznam vede k předpokladu, že se tuberkulóza vyskytovala na severoamerickém kontinentu dlouho před domestikací (Rothschild et al., 2001).

Turecký nález *Homo erectus*, datovaný 490 000 až 510 000 let BP a popsaný Kappelmanem et al. (2008), nebyl prokázán jako přesvědčivý důkaz tuberkulózní meningitidy

(*Leptomeningitis tuberculosa*), která se bioarcheologicky těžko diagnostikuje pro nespecifické změny na kostře spojované nejen s TBC, ale i jinými onemocněními. Dle Roberts et al. (2009) chybí nálezu biomolekulární identifikace a přítomnost endokraniálních lézí vyžaduje provedení v paleopatologii standardně zavedené diferenciální diagnózy, protože tyto léze nejsou pro tuberkulózu vyloženě patognomické (charakteristické).

Přítomnost lidské tuberkulózy kolem počátku domestikacího procesu naznačují nálezy z předkeramického neolitu B (PPNB) v Sýrii. Lokalita Dja'de el Mughara na řece Eufrat v severní Sýrii poskytla nálezy z období 8 800 až 8 300 př. n. l. (předdomestikační fáze) a lidské kosterní ostatky z lokality Tell Aswad na jihu Sýrie nedaleko Damašku se datují do raného stadia domestikace (8 200 až 7 600 př. n. l.). Důkazy byly prověřeny a potvrzeny multidisciplinárně – morfologicky i molekulárně (Baker et al., 2015).

Z této dosud nejvýznamnější oblasti s paleopatologickými důkazy o lidské TBC se také dochovaly pozůstatky společně pohřbené dospělé ženy a ročního chlapce infikovaných linií *M. tuberculosis* s delecí TbD1¹. Naleziště Atlit-Yam v Izraeli bylo datováno do předkeramického neolitu C (6 200 až 5 500 př. n. l.) na základě morfologického vyšetření, molekulárních analýz a lipidových biomarkerů. Kalibrovaná radiokarbonová data odhadují stáří lokality v rozmezí 9 250 až 8 160 BP. Období odpovídá dokončení přechodu k zemědělství a chovu zvířat (Hershkovitz et al., 2008).

Středoněmecké raně neolitické lokality Derenburg, Halberstadt a Karsdorf v Sasku-Anhaltsku poskytly nálezy postižení žeber z dob kultury lineární keramiky (5 400 až 4 800 př. n. l.). Pozorované žeberní léze, které představují nespecifické indikátory tuberkulózy, byly dále analyzovány pomocí histologických metod, mikro-CT snímkování a molekulárních analýz, které pomohly prokázat toto infekční onemocnění a přítomnost patogenů skupiny MTBC (Nicklisch et al., 2012).

Mimo území Německa patří k dalším nejstarším důkazům napříč Evropou nálezy maďarské z 5. tisíciletí př. n. l. nebo případy z italských jeskyň ze 4. tisíciletí př. n. l. (Buzic & Giuffra, 2020). Na rozlehlém pohřebišti v jihozápadním Maďarsku Alsónyék-Bátaszék (Pósa et al., 2015) a sídlišti Hódmezővásárhely-Gorzsa (Masson et al., 2015) byly morfologicky odhaleny případy tuberkulózy, podpořené následnými molekulárně-biologickými analýzami. Ve 3 jeskyních na ligurském pobřeží severozápadu Itálie, vzdálených od sebe do 5 km, byly objeveny kostry ze středního neolitu vykazující znaky tuberkulózní spondylitidy: Arene Candide (Formicola et al., 1987) a Arma dell'Aquila (Canci

¹ Linie *M. tuberculosis* s delecí TbD1 se považují za moderní oproti původním kmenům bez této specifické delece (Brosch et al., 2002).

et al., 1996) a multifokální osteortikulární TBC u pětiletého dítěte z jeskyně Pollera (Sparacello et al., 2017).

Nejstarší a molekulárně potvrzené případy tuberkulózy v českých zemích se nachází v Hnanicích u Znojma s datováním 4 700 až 3 900 BP, z dob lengyelské kultury z eneolitu (Tonar, 2017). U následujících případů není uvedeno provedení aDNA diagnostiky. Na vikletickém pohřebišti u Chomutova se našli kosterní pozůstatky s TBC lézemi z období 2 800 až 2 500 BP. Pravěká únětická kultura zanechala po sobě kosterní kolekce v Brně-Tuřanech a nedaleko Brna v lokalitě Cezavy u Blučiny spadající do velatické kultury (1 250 až 1 000 př. n. l.), kde jsou u několika jedinců kostní změny provázející TBC. Z konce pravěku, kdy docházelo k tzv. stěhování národů, se dochovaly případy kostní tuberkulózy v lokalitě Praha-Zličín (Vargová et al., 2017).

Na africkém kontinentu spadají první molekulárními analýzami ověřené nálezy kosterního materiálu do období 3 500 až 2 650 př. n. l. Pochází z ostatků staroegyptské populace. Doklady z Nového světa se objevují nejdříve roku 700 v jihoamerickém Peru, k pozdějšímu roku 900 n. l. potom v jihozápadních trvalých zemědělských osadách Severní Ameriky. Na mezoamerickém území časné důkazy nebyly nalezeny (Buzic & Guiffra, 2020; Roberts & Buikstra, 2020).

Studium důkazů na molekulární úrovni

Diagnostika tuberkulózy v paleopatologii a klinické praxi zahrnuje různé metody, z nichž každá má své výhody i omezení. Makroskopické metody, které se zaměřují na morfologické změny na kostře, kupříkladu deformace páteře způsobené Pottovou nemocí, jsou jednou z nejstarších forem detekce TBC (Papa et al., 2023). Přestože tyto metody poskytují užitečné důkazy o chronických případech, je jejich spolehlivost omezena tím, že se indikátory TBC objevují pouze u minima nakažených jedinců (Donoghue et al., 2004).

Oproti tomu molekulární metody, jako PCR, poskytují vysokou citlivost a přesnost, což umožňuje detekci i malého množství bakteriální DNA. PCR je dnes jedním z hlavních nástrojů jak pro klinickou diagnostiku, tak pro paleopatologii, kde usnadňuje detekci starobylé DNA ve vzorcích. Přesto mohou být molekulární metody limitovány kvalitou vzorků, kdy se nalézá DNA degradovaná nebo kontaminovaná. Molekulární detekce však není omezena pouze na případy s morfologickými či paleopatologickými nálezy. Díky své vysoké citlivosti může PCR odhalit přítomnost patogenů i v případech, kde nejsou patrné žádné makroskopické změny. To je zvláště užitečné v paleopatologii, kde mnoho infekčních onemocnění nezanechává viditelné stopy na kostech (Spyrou et al., 2019). Například studie

využívající metagenomické analýzy odhalily přítomnost *Mycobacterium tuberculosis* v historických vzorcích bez zjevných morfologických indikací infekce (Jäger, 2023). Tímto způsobem molekulární metody rozšiřují naše schopnosti detekce infekčních agens nad rámec tradičních morfologických přístupů, což umožňuje přesnější rekonstrukci historie nemocí a jejich šíření v minulosti.

Kombinace lipidických biomarkerů a aDNA analýz nabízí robustnější přístup k detekci tuberkulózy ve starověkých vzorcích. Lipidické biomarkery prokazují důležitost v případech nedostatečně zachovalé DNA a využívají se k potvrzení přítomnosti tuberkulózy u vzorků z různých archeologických nalezišť po celém světě, čímž poskytují důkazy i tam, kde jsou morfologické znaky nejednoznačné (Minnikin et al., 2012).

5 Paleopatologická diagnostika s užitím aDNA

Paleopatologická diagnostika tuberkulózy se v posledních desetiletích výrazně posunula díky pokrokům v molekulárních technikách, které umožňují analýzu degradované starobylé DNA (aDNA) a poskytují hlubší vhled do šíření a evoluce *Mycobacterium tuberculosis*. Zavedení polymerázové řetězové reakce (PCR), jež umožňuje amplifikaci specifických genových úseků patogenu přítomných i ve velmi degradovaných vzorcích, představovalo klíčový milník (Spyrou et al., 2019). Na PCR navazuje pokrok v dalších molekulárních technikách, které umožňují detailnější a přesnější analýzu genomu patogenu.

5.1 PCR

V prvních letech aplikace PCR v paleopatologii se testy zaměřovaly na specifické geny IS6110, které jsou charakteristické pro *Mycobacterium tuberculosis complex* (Salo et al., 1994). Tyto metody umožnily potvrzení přítomnosti tuberkulózy u starověkých lidských pozůstatků, i když byly tyto vzorky často omezeny množstvím dostupné aDNA a její vysokou mírou fragmentace (Papa et al., 2023). S rostoucími zkušenostmi však začalo být zřejmé, že i přes úspěch PCR jsou zde významné limitace. Fragmentace a chemická modifikace aDNA způsobené časem a okolními podmínkami vedou často k tomu, že amplifikované úseky poskytují jen omezený pohled na evoluční dynamiku patogenu (Kerner et al., 2021). Další problém představovalo riziko kontaminace moderní DNA nebo DNA půdních mikroorganismů, což se začalo řešit důslednými laboratorními postupy a opakovaným testováním zvyšujícím časovou a finanční náročnost (Spyrou et al., 2019).

Příkladem úspěšného použití PCR je studie studie Salo et al. (1994), která analyzovala mumifikované pozůstatky z předkolumbovského Peru a potvrdila přítomnost DNA *M. tuberculosis* pomocí amplifikace genu IS6110, specifického pro tento patogen. Tato studie byla průkopnická v oblasti paleopatologie a ukázala, že PCR může poskytnout přímé důkazy o přítomnosti patogenu v archeologických nálezech, i když jsou morfologické známky tuberkulózy nejasné nebo chybí (Salo et al., 1994). Dalším příkladem je práce Hershkovitz et al. (2008), která pomocí PCR identifikovala *M. tuberculosis* v kosterních pozůstatcích z neolitu nalezených v lokalitě Atlit-Yam v Izraeli. Tento výzkum přinesl důkazy o přítomnosti tuberkulózy v období 6 000 př. n. l. a ukázal, jak důležitou roli může hrát PCR při studiu šíření infekčních chorob během přechodu k usedlému zemědělství (Hershkovitz et al., 2008).

5.2 NGS

Kolem roku 2010 se v paleopatologii zavedlo sekvenování nové generace (NGS), které přineslo mnohem podrobnější a přesnější analýzu genomů starověkých patogenů. Tato technologie, původně aplikovaná v paleogenetice pro rekonstrukci neandertálských genomů (Green et al., 2010), výrazně rozšířila možnosti studia patogenu *Mycobacterium tuberculosis* a umožnila rekonstrukci téměř celých genomů patogenů nalezených ve starověkých pozůstatcích (Bos et al., 2014). NGS poskytla mnohem robustnější data než PCR a zároveň odstranila potřebu cílené amplifikace krátkých úseků DNA, což vedlo k identifikaci dosud neznámých linií *M. tuberculosis*, které již dnes nemusí existovat (Chan et al., 2013). Tyto výsledky přispěly k rekonstrukci šíření patogenu v průběhu historie a jeho evolučních změn v důsledku reakce na hostitelské populace a selekční tlaky (Papa et al., 2023). Kromě toho NGS otevřelo nové možnosti pro detailní analýzu evoluce a přizpůsobení patogenů, což má zásadní význam pro porozumění jejich historickému a modernímu dopadu (Chan et al., 2013).

Studie Bos et al. (2014) je jedním z příkladů, kde NGS umožnilo rekonstruovat genom *M. tuberculosis* ze starověkých vzorků z Peru. Výsledky ukázaly, že tuberkulóza mohla být přenášena ze zvířat na lidi, konkrétně z tuleňů, a představují hypotézu o zoonotickém původu některých linií TBC. Tato studie je významným příkladem, jak NGS poskytuje detailní informace o evoluci a šíření patogenů, které by pomocí tradičních metod nebylo možné získat (Bos et al., 2014). Další příklad nabízí Spyrou et al. (2019), kteří pomocí NGS analyzovali středověké kosterní pozůstatky a identifikovali různé mutace v genomu *Mycobacterium tuberculosis*. To jim umožnilo rekonstruovat evoluční historii patogenu a přizpůsobení lidským hostitelům v různých historických obdobích. NGS tak poskytuje jedinečný pohled na mikrobiální evoluci v kontextu lidských populací (Spyrou et al., 2019).

Ačkoli NGS přináší velké množství dat, vyžaduje pokročilou technologii a náklady, což může omezit její dostupnost. Vzhledem k vysoké citlivosti na kontaminaci a potřebě sofistikovaných analytických nástrojů je použití NGS v archeologii náročné technicky i finančně (Rizzi et al., 2012). Kombinace PCR a NGS se ukázala jako efektivní přístup pro detailní studium tuberkulózy v archeologických vzorcích. Chan et al. (2013) například zkombinovali tyto metody při analýze mumifikovaných vzorků z dávných období. Tento přístup jim umožnil vytvořit fylogenetický strom, který ilustruje migraci a adaptaci různých kmenů TBC na různé environmentální a kulturní podmínky. Tato kombinace metod nejen zvyšuje přesnost výsledků, ale také poskytuje širší perspektivu na genetickou rozmanitost *M. tuberculosis* a její evoluční adaptace (Chan et al., 2013). Kombinované použití PCR

a NGS je však technicky náročné a vyžaduje přístup k vysoce specializovaným laboratořím. Navíc náklady na analýzu jsou vysoké, což může být překážkou pro rozsáhlejší archeologické studie (Rizzi et al., 2012).

5.3 Spoligotyping

Spoligotyping, molekulárně-genetická metoda pro identifikaci a typizaci kmenů, se začala rozšiřovat po roce 2000 jako doplněk k PCR a NGS, zaměřující se na detekci specifických opakujících se sekvencí v tzv. DR regionu (direct repeat region) genomu *M. tuberculosis*. Tyto sekvence jsou jedinečné pro jednotlivé kmeny a umožňují rozlišit mezi různými liniemi bakterie (Kamerbeek et al., 1997; Forst, 2015). Výsledkem spoligotypingu je specifický profil kmenů, který se zobrazuje v podobě binárního kódu nebo vzorce teček a mezer. Tento profil je následně srovnáván s referenční databází, což umožňuje klasifikaci daného kmene a sledování jeho evolučního původu a šíření (Papa et al., 2023). Technika pomohla vědcům mapovat geografické rozšíření a evoluci patogenu včetně adaptace na lidské hostitele.

Jedním z příkladů úspěšného využití spoligotypingu je studie zaměřená na vzorky z období starověkého Egypta, kde byly identifikovány specifické spoligotypy odpovídající současným liniím známým v Africe. Tyto výsledky umožnily rekonstruovat cesty migrace a interakce starověkých populací (Donoghue, 2011; Minnikin et al., 2012). Dalším příkladem je výzkum středověkých evropských vzorků, který díky spoligotypingu odhalil různé kmeny *M. tuberculosis* s možným původem mimo Evropu, což naznačuje možné importy infekce prostřednictvím obchodních cest či válečných konfliktů (Sola et al., 2001).

Zatímco PCR zůstává klíčovým nástrojem pro identifikaci infekce, vzhledem k časté fragmentaci a/nebo deformaci starobylé patogenní aDNA byly vyvinuty techniky využívající jiné biomolekuly – lipidy (mykolové kyseliny jako lipidové biomarkery) a proteiny, které v pozůstatcích přežívají výrazně déle než genetická informace a poskytují širší pohled na tuberkulózní infekci v paleopatologickém kontextu (Spyrou et al., 2019). Mykobakterie mají specifickou buněčnou stěnu bohatou na chemicky stabilní lipidy, zvané mykolové kyseliny nebo fosfatidylinositolové mannosidy (PIMs), pomocí nichž lze detekovat tuberkulózu v archeologických vzorcích (Váradi, 2020). Proteiny, které jsou produkovány mykobakteriemi během infekce, je možné nyní detekovat pomocí hmotnostní spektrometrie, což umožňuje detailnější zkoumání patogenu na úrovni jednotlivých proteinů a jejich funkčních modifikací (Warinner et al., 2022).

5.4 Lipidové biomarkery

Detekci lipidových biomarkerů v pozůstatcích umožňuje plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Díky tomu byly mykolové kyseliny identifikovány i v materiálech starých tisíce let (Minnikin et al., 2015). Tento přístup se úspěšně aplikoval při analýze paleolitických a neolitických vzorků, včetně známého případu z Atlit-Yamu, kde kombinace lipidových biomarkerů a aDNA prokázala přítomnost tuberkulózy (Donoghue et al., 2017).

Ve studii Bos et al. (2014) se lipidické biomarkery použily současně s NGS (jak bylo uvedeno v sekci 5.2) k detekci tuberkulózy v kostrách dávných populací z Peru, kde byly nalezeny stopy nákazy způsobené kmenem *M. pinnipedii* infikující tuleně, což naznačuje zoonotický přenos tuberkulózy. Autoři naznačují, že k takovému přenosu dochází vzácně, například v zoologických zahradách, a připouští, že tvrzení by měly podpořit i důkazy z jiných nalezišť Severní a Jižní Ameriky (Bos et al., 2014).

Navzdory slibným výsledkům v identifikaci patogenů bez jednoznačných morfologických indikátorů na kostrách závisí detekce lipidických biomarkerů na vyspělých technologiích a pokročilém laboratorním vybavení výzkumných laboratoří (Donoghue et al., 2017). Navíc je interpretace těchto výsledků někdy složitá, zejména vzhledem k možnému vlivu environmentálních kontaminantů. Kontaminanty mohou pocházet například z mikroorganismů přítomných v půdě, které produkují lipidy podobné původcům infekce. To může vést k falešně pozitivním výsledkům nebo zkresleným interpretacím původu nalezených lipidů (Minnikin et al., 2012).

5.5 Paleoproteomika

Proteomika, věda zabývající se studiem proteinů, hraje v paleopatologii tuberkulózy důležitou roli, neboť poskytuje alternativní přístup k analýze infekcí, které mohou být obtížně detekovatelné metodou PCR nebo sekvenováním DNA. Proteomické analýzy se zaměřují na identifikaci a kvantifikaci proteinů v biologických vzorcích, což umožňuje získat informace o přítomnosti patogenů včetně *Mycobacterium tuberculosis* a jejich interakcích s hostitelskými organismy (Cappellini et al., 2018).

Proteomika využívá hmotnostní spektrometrii (MS – *Mass Spectrometry*) a kapalinovou chromatografii (LC – *Liquid Chromatography*) k analýze komplexních vzorků (Warinner et al., 2022). Tyto metody umožňují detekci a charakterizaci proteinů na základě jejich hmotnosti a struktury (Cappellini et al., 2018). Proteomické analýzy mohou odhalit

přítomnost specifických proteinů spojených s mykobakteriální infekcí, které lze využít jako biomarkery pro diagnostiku tuberkulózy ve vzorcích, jež nedisponují kvalitní DNA (Hendy, 2021). Jednou z výhod proteomiky je, že dokáže odhalit patogenní i hostitelské proteiny, což napomáhá porozumění patogenezí tuberkulózy, konkrétně imunitní odpovědi na infekci (Warinner et al., 2022).

Pro identifikaci a charakterizaci proteomů (tj. celkového souboru všech proteinů exprimovaných v daném biologickém vzorku nebo organismu) ze starobylých vzorků se ukázaly jako efektivní metody MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) a LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*). Dle Hendy (2021) umožnily tyto techniky analýzu kompletních proteomů i metaproteomů (tj. proteinů pocházejících z různých organismů v jednom vzorku, např. z mikrobiálních komunit nebo směsných environmentálních vzorků), což rozšířilo možnosti paleobiologického výzkumu a analýzy dietních a environmentálních faktorů v historických populacích (Hendy, 2021).

Přestože má paleoproteomika velký potenciál, čelí i určitým výzvám. Obdobně jako aDNA je vzhledem ke kontaminaci a degradaci proteinů v archeologických vzorcích důležité optimalizovat metody extrakce a analýzy, aby se maximalizovala úspěšnost detekce a zajistily se přesné výsledky (Hendy, 2021). Proteiny jsou často přítomny v nízkých koncentracích, což vyžaduje vysoce citlivé techniky a specifické protokoly pro zachycení a analýzu. Jak zdůrazňují Warinner et al. (2022), další vývoj paleoproteomiky závisí na vývoji metod, které by umožnily efektivnější a méně destruktivní analýzu starobylých proteinů (Warinner et al., 2022).

Kombinace těchto technik by poskytla mnohem přesnější obraz o šíření tuberkulózy v minulosti. V současné době je jedním z hlavních cílů paleopatologické diagnostiky nejen identifikace přítomnosti *M. tuberculosis*, ale také rekonstrukce jeho evoluční historie, včetně vývoje rezistence na léčiva a vzorců šíření mezi lidskými populacemi (Kerner et al., 2021). Tento pokrok umožňuje propojit údaje o mikrobiálních evolučních trajektoriích s archeologickými a historickými informacemi, což vede k hlubšímu porozumění vlivu infekčních onemocnění na lidské dějiny (Spyrou et al., 2019).

Popsané diagnostické metody studia TBC jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Biomolekulární metody studia TBC

Diagnostická metoda	Princip	Výhody	Nevýhody	Použití v bioarcheologii
PCR	Amplifikace specifických úseků DNA	Vysoká citlivost a schopnost detekovat i malé množství DNA	Riziko kontaminace, potřeba zachované DNA	Používá se k detekci přítomnosti <i>M. tuberculosis</i> ve starověkých kostech (Donoghue, 2011)
NGS	Sekvenování DNA, které umožňuje analýzu celého genomu	Možnost analyzovat rozsáhlé sekvence DNA a získat evoluční informace	Nákladná metoda, náročná na zpracování dat	Rekonstrukce genomu a studium evoluce <i>M. tuberculosis</i> (Spyrou et al., 2019)
Lipidické biomarkery	Detekce mykolových kyselin specifických pro mykobakterie	Stabilní v prostředí, umožňuje detekci i v degradovaných vzorcích	Specifičnost biomarkerů může být nízká, vyžaduje specializované vybavení	Používá se pro případy, kdy DNA není dostatečně zachována (Donoghue et al., 2017)
Paleoproteomika	Analýza starověkých proteinů	Proteiny jsou odolnější vůči degradaci než DNA	Potřeba vysoce citlivé technologie, riziko kontaminace	Identifikace proteinů spojených s <i>M. tuberculosis</i> (Cappellini et al., 2018)
Spoligotyping	Typizace založená na detekci specifických opakujících se sekvencí DNA	Rychlá metoda pro identifikaci a klasifikaci linií <i>M. tuberculosis</i>	Omezená schopnost rozlišit blízké příbuzné kmeny, vyžaduje zachovanou DNA	Umožňuje identifikaci specifických linií <i>M. tuberculosis</i> ve starověkých vzorcích (Kamerbeek et al., 1997)

Zdroj: Upraveno na základě Kamerbeek et al., 1997; Donoghue et al., 2017; Donoghue, 2011; Cappellini et al., 2018; Spyrou et al., 2019

6 Diskuze

Původ tuberkulózy zůstává předmětem vědeckých diskusí a není dosud plně objasněn. Existuje však shoda, že počátek infekce lze datovat do rozmezí mezi 6 000 až 70 000 lety (Zein-Eddine et al., 2023). Nejstarší paleolitické nálezy kostních lézí připisovaných tuberkulózní infekci jsou předmětem diskusí a kontroverze, neboť chybí jednoznačné důkazy přítomnosti starověké DNA (aDNA) patogenu (Coqueugniot et al., 2023; Kappelman et al., 2008). Nedávné studie zpochybnily teorii zoonotického původu tuberkulózy (Galagan, 2014), což naznačuje, že *Mycobacterium tuberculosis* se vyvinulo jako specifický lidský patogen, který prošel populačním hrdlem lahve přibližně před 40 000 lety, tedy po migraci *Homo sapiens* z Afriky (Wirth et al., 2008).

Výzkum tuberkulózy v bioarcheologii a paleopatologii čelí mnoha výzvám, zejména pokud jde o identifikaci infekce pomocí molekulárních metod. Tradiční osteologické přístupy, zaměřené na kosterní léze spojené s tuberkulózou, jsou omezeny tím, že ne všechny formy tuberkulózy zanechávají viditelné stopy na kostech (Pedersen et al., 2019), což vede k možnosti, že mnoho případů infekce zůstává nedetekováno. Tuberkulóza, jako onemocnění s dlouhou historií, poskytuje bioarcheologům jedinečnou příležitost zkoumat její evoluční dynamiku, přičemž však naráží na metodologické a technické problémy (Dutour, 2023). Kosterní léze se vyskytují jen u malého procenta infikovaných, což omezuje použití makroskopických metod pro diagnostiku (Pedersen et al., 2019), neboť podobné změny na kostře mohou zanechávat i jiná onemocnění, což komplikuje interpretaci paleopatologických důkazů.

Moderní molekulární techniky, jako polymerázová řetězová reakce (PCR), sekvenování nové generace (NGS), lipidové biomarkery a spoligotyping, přinášejí nové možnosti pro identifikaci patogenů i ve velmi fragmentovaných vzorcích a rozšiřují možnosti diagnostiky. Sekvenování nové generace umožňuje rekonstrukci celých genomů patogenů, čímž zlepšuje přesnost detekce a poskytuje detailní pohled na evoluční vztahy mezi různými kmeny *Mycobacterium tuberculosis* a jejich šíření v minulosti (Warinner et al., 2022). Přestože lipidové biomarkery a paleoproteomika mohou poskytovat doplňkové informace v případech, kde je DNA příliš degradovaná, jejich interpretace je náročná a vyžaduje pokročilé technologie (Donoghue, 2016).

Degradace starověké DNA a proteinů vlivem stáří a environmentálních podmínek představuje významný problém pro molekulární analýzy. DNA je náchylná k chemickým modifikacím a fragmentaci, což může vést k nedostatečné nebo neúplné analýze vzorků

(Kerner et al., 2021). Riziko kontaminace vzorků moderní DNA či půdními mikroorganismy, které mohou imitovat genetické znaky mykobakterií, je dalším komplikujícím faktorem (Witas et al., 2015). Tento problém lze řešit kombinací molekulárních metod, které umožňují přesnější oddělení endogenní DNA od kontaminantů (Zeit-Eddine et al., 2023).

V paleogenomice představují současné molekulární technologie, jako NGS, paleoproteomika a lipidová analýza, důležité nástroje pro diagnostiku TBC z archeologických vzorků, ačkoli jejich široké využití je omezeno vysokými náklady a technickou náročností (Warinner et al., 2022).

Důsledky těchto omezení vedou k tomu, že molekulární metody jsou obvykle aplikovány pouze na jednotlivé případy, kde jsou přítomny zjevné vizuální známky tuberkulózní infekce. Komplexní analýza většího počtu vzorků z celé pohřební populace zatím není proveditelná z důvodu metodologické, finanční a časové náročnosti (Papa et al., 2023).

Studium lidských ostatků z archeologických lokalit přináší i etické otázky týkající se respektování kulturních tradic a práv moderních potomků (Buikstra et al., 2022). Významnou budoucí výzvou bude rozvoj přesnějších a levnějších metod pro analýzu starověkých patogenů a rozšíření referenčních dat z různých geografických oblastí, což by usnadnilo globální srovnání a rekonstrukci historického šíření nemoci (Dutour, 2023).

7 Závěr

Tato bakalářská práce si kladla za cíl přiblížit nejnovější poznatky bioarcheologického výzkumu zaměřeného na počátky tuberkulózy v lidské společnosti a její projevy v kosterních pozůstatcích historických populací. Práce poukázala na to, že ačkoli infekce tuberkulózou může zanechat stopy na kostře, tyto změny jsou pozorovány pouze u přibližně 3–5 % všech nemocných touto chorobou a případů je tak ve skutečnosti více. Tento fakt zdůrazňuje limity tradičních osteologických metod, které mohou poskytovat jen omezený pohled na prevalenci onemocnění v minulosti.

Počátky tuberkulózy jsou kladeny do období před 70 000 až 6 000 lety a pro paleolitické stáří dosud nebyly přineseny molekulárně biologické důkazy. Nové výzkumy naznačují, že toto onemocnění provází člověka velmi dlouho a není zřejmě zoonotickou infekcí získanou v počátcích zemědělství od domestikovaných zvířat.

Zvláštní pozornost byla věnována problematice využití starověké DNA (aDNA), která představuje klíčový nástroj pro potvrzení přítomnosti patogenu v případech zjevných projevů TBC na kostře. Nicméně práce ukázala, že analýza aDNA čelí významným výzvám, jako je degradace genetického materiálu a riziko kontaminace vzorků, což omezuje její schopnost odrážet skutečnou míru nemocnosti v populaci.

Moderní molekulárně-biologické metody představují významný pokrok v diagnostice tuberkulózy z archeologického materiálu. Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje amplifikaci specifických úseků DNA, což usnadňuje detekci i minimálního množství patogenní DNA. Sekvenování nové generace (NGS) poskytuje možnost rekonstrukce celých genomů patogenů, čímž zlepšuje chápání evolučních vztahů mezi kmeny *Mycobacterium tuberculosis*. Lipidové biomarkery jsou užitečné zejména v případech, kdy je DNA příliš degradovaná, protože identifikují specifické lipidy charakteristické pro tento patogen. Spoligotyping se zaměřuje na analýzu přímých opakování v genomu a umožňuje identifikaci různých kmenů tuberkulózního patogenu.

Práce ukázala, že kombinace tradičních osteologických přístupů a moderních molekulárně-biologických metod představuje efektivní nástroj pro zkoumání tuberkulózy v historických populacích. Tato kombinace umožňuje nejen hlubší vhled do šíření a evoluce onemocnění, ale také překonání některých omezení, která jsou vlastní jednotlivým metodám.

Rozvoj dostupnějších a technicky méně náročných diagnostických metod je klíčovou výzvou budoucího výzkumu. Takové pokroky mohou významně přispět k lepšímu pochopení historie a evoluce tuberkulózy, a tím i k obohacení poznání lidských populací minulosti.

Seznam zdrojů

- Agrawal, P., Upadhyay, A., & Kumar, A. (2024). MicroRNA as biomarkers in tuberculosis: A new emerging molecular diagnostic solution. *Tuberculosis*, *108*(1), 102379. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116082>
- Acharya, B., Acharya, A., Gautam, S., et al. (2020). Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology Reports*, *47*, 4065–4075. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05413-7>
- Baker, O., Lee, O. Y.-C., Wu, H. H. T., Besra, G. S., Minnikin, D. E., Llewellyn, G., Williams, C. M., Maixner, F., O'Sullivan, N., Zink, A., Chamel, B., Khawam, R., Coqueugniot, E., Helmer, D., Le Mort, F., Perrin, P., Gourichon, L., Dutailly, B., Pálfi, G., Coqueugniot, H., ... & Dutour, O. (2015). Human tuberculosis predates domestication in ancient Syria. *Tuberculosis*, *95*(Supplement 1), S4–S12. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.001>
- Bañuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*, *64*(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, *58*(1), E9–E12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28515626/>
- Barbier, M., & Wirth, T. (2017). The evolutionary history, demography, and spread of the Mycobacterium tuberculosis complex. In W. R. Jacobs Jr., H. McShane, V. Mizrahi, & I. M. Orme (Eds.), *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* (2nd ed., pp. 453–473). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555819569.ch20>
- Blevins, S. M., & Bronze, M. S. (2010). Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(9), e744–e751. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>
- Bos, K. I., Harkins, K. M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., Comas, I., ... & Krause, J. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*, *514*(7523), 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature13591>

- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Cole, S. T., et al. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(6), 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>
- Buikstra, J. E., DeWitte, S. N., Agarwal, S. C., Baker, B. J., Bartelink, E. J., Berger, E., Blevins, K. E., Bolhofner, K., Boutin, A. T., et al. (2022). Twenty-first century bioarchaeology: Taking stock and moving forward. *American Journal of Biological Anthropology*, *Yearbook of Biological Anthropology*. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24494>
- Buzic, I., & Giuffra, V. (2020). The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: A review. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, *61*(1), E3–E8. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1379>
- Canci, A., Minozzi, S., & Borgognini Tarli, S. M. (1996). New evidence of tuberculous spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). *International Journal of Osteoarchaeology*, *6*(5), 497–501. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1212\(199612\)6:5<497::AID-OA291>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1212(199612)6:5<497::AID-OA291>3.0.CO;2-O)
- Cappellini, E., Prohaska, A., Racimo, F., Welker, F., Pedersen, M. W., Allentoft, M. E., ... & Orlando, L. (2018). Ancient biomolecules and evolutionary inference. *Annual Review of Biochemistry*, *87*, 1029–1060. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012002>
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., & Holt, K. E. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*, *45*(10), 1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>
- Coqueugnot, H., Pálfi, G., Gély, B., & Dutour, O. (2023). Upper Paleolithic tuberculosis: A probable case illustrated by paleoimaging methods (Azilian site of Les Iboussières, France). *Tuberculosis*, *143*(Supplement), 102373. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2023.102373>
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, *100*(11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>
- Donoghue, H. D. (2011). Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(6), 821–829. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03554.x>
- Donoghue, H. D. (2016). Paleomicrobiology of human tuberculosis. In M. Drancourt & D. Raoult (Eds.), *Paleomicrobiology of humans* (Chapter 12). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555819170.ch12>

- Donoghue, H. D. (2023). Palaeomicrobiology of human infectious diseases. In M. P. Richards & V. D. Thompson (Eds.), *Handbook of Archaeological Sciences* (Vol. 2, pp. 677–696). John Wiley & Sons.
- Donoghue, H. D., Spigelman, M., Greenblatt, C. L., Lev-Maor, G., Kahila Bar-Gal, G., Matheson, C., et al. (2004). Tuberculosis: From prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(9), 584–592. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01133-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01133-8)
- Donoghue, H. D., Taylor, G. M., Stewart, G. R., Lee, O. Y.-C., Wu, H. H. T., Besra, G. S., & Minnikin, D. E. (2017). Positive diagnosis of ancient leprosy and tuberculosis using ancient DNA and lipid biomarkers. *Diversity*, 9(4), 46. <https://doi.org/10.3390/d9040046>
- Dormandy, T. (1999). *The white death: A history of tuberculosis*. New York University Press.
- Dutour, O. (2023). The paleopathology and paleoepidemiology of Upper Paleolithic tuberculosis: Review of evidence and hypotheses. *Tuberculosis*, 143(Supplement), 102348. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2023.102348>
- Esteves, S., Catarino, I., Lopes, D., & Sousa, C. (2017). Spinal tuberculosis: Rethinking an old disease. *Journal of Spine*, 6(1), 1000358. <https://doi.org/10.4172/2165-7939.1000358>
- Fogel, N. (2015). Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis*, 95(5), 527–531. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.017>
- Formicola, V., Milanesi, Q., & Scarsini, C. (1987). Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy). *American Journal of Physical Anthropology*, 72(1), 1–6. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330720102>
- Forst, J. (2015). *Detecting and sequencing Mycobacterium tuberculosis aDNA from archaeological remains* (Doctoral dissertation, The University of Manchester, United Kingdom). ProQuest Dissertations & Theses. <https://www.proquest.com/openview/0aaa176b43d8555fa2b7f4e21d961ce8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=51922>
- Frith, J. (2014). History of tuberculosis. Part 1 – Phthisis, consumption and the White Plague. *Journal of Military and Veterans' Health*, 22(2), 29–35. <https://doi-ds.org/doi/10.2021-59178487/JMVH Vol 22 No 2>
- Gaeta, R. (2021). Ancient DNA and paleogenetics: Risks and potentiality. *Pathologica*, 113(2), 141–146. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-146>

- Galagan, J. E. (2014). Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrg3664>
- Gill, C. M., Dolan, L., Piggott, L. M., & McLaughlin, A. M. (2022). New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe*, 18(1), 210149. <https://doi.org/10.1183/20734735.0149-2021>
- Green, R. E., et al. (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328(5979), 710–722. <https://doi.org/10.1126/science.1188021>
- Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., ... & Supply, P. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 1(1), e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005>
- Hendy, J. (2021). Ancient protein analysis in archaeology. *Science Advances*, 7(3), eabb9314. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb9314>
- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y., Gernaey, A. M., ... & Bar-Gal, G. K. (2008). Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One*, 3(10), e3426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426>
- 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*, 62(6), 402–458. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2011.10.001>
- Homolka, J., & Votava, V. (2012). *Tuberkulóza: [učební text pro 1. lékařskou fakultu UK]* (4. upr. vyd.). Karolinum.
- Chan, J. Z., et al. (2013). Metagenomic analysis of tuberculosis in a mummy. *New England Journal of Medicine*, 369(3), 289–290. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1302295>
- Jäger, H. Y. (2023). *Metagenomic analysis of Mycobacterium tuberculosis in ancient human remains* (Doctoral dissertation, Ludwig Maximilian University of Munich).
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., ... & van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 907–914. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>
- Kappelman, J., Alçiçek, M. C., Kazancı, N., Schultz, M., Özkul, M., & Şen, Ş. (2008). First *Homo erectus* from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *American Journal of Physical Anthropology*, 135(1), 110–116. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20739>

- Kerner, G., Laval, G., Patin, E., Abel, L., Casanova, J.-L., & Quintana-Murci, L. (2021). Human ancient DNA analyses reveal the high burden of tuberculosis in Europeans over the last 2,000 years. *Report*, 108(3), 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.02.009>.
- Kolek, V. (2012). Tuberkulóza – transformace péče, její výhody a rizika. *Medicína po promoci*, 9(5), 220–221.
- Kolek, V., Kašák, V., & Vašáková, M. (2019). *Doporučené postupy v pneumologii* (3. aktualiz. vyd.). Maxdorf. ISBN 978-80-7345-624-5
- Kopecká, E., & Hricíková, I. (2023, 28. prosince). *Tuberkulóza v 21. století: starý nepřítel v novém světle*. Medical Tribune. <https://www.tribune.cz/archiv/tuberkuloza-v-21-stoleti-stary-nepritel-v-novem-svetle/>
- Larsen, C. S. (2020). Bioarchaeology: Definition. In *Encyclopedia of Global Archaeology* (p. 1438). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30018-0_129
- Lewis, C. M. Jr., Akinyi, M. Y., DeWitte, S. N., & Stone, A. C. (2023). Ancient pathogens provide a window into health and well-being. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(4), e2209476119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209476119>
- Lönnroth, K., Castro, K. G., Chakaya, J. M., Chauhan, L. S., Floyd, K., Glaziou, P., & Raviglione, M. C. (2010). Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development. *The Lancet*, 375(9728), 1814–1829. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60483-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60483-7)
- MacLean, E., Kohli, M., Weber, S. F., Suresh, A., Schumacher, S. G., Denking, C. M., & Pai, M. (2020). Advances in molecular diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(10), e01582-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.01582-19>
- Masiu, R., Pedersen, D. D., Hill, L., & Steyn, M. (2023). The association between skeletal lesions and tuberculosis in a pre-antibiotic South African sample. *International Journal of Paleopathology*, 40, 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2022.11.001>
- Masson, M., Bereczki, Z., Molnár, E., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Lee, O. Y.-C., Wu, H. H. T., Besra, G. S., Bull, I. D., & Pálfi, G. (2015). 7000 year-old tuberculosis cases from Hungary – Osteological and biomolecular evidence. *Tuberculosis*, 95(Supplement 1), S10–S17. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.007>
- Milner, G. R., & Boldsen, J. L. (2017). Life not death: Epidemiology from skeletons. *International Journal of Paleopathology*, 17, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2017.03.007>

- Minnikin, D. E., Lee, O. Y.-C., Wu, H. H. T., Besra, G. S., Bhatt, A., Nataraj, V., Rothschild, B. M., Spigelman, M., & Donoghue, H. D. (2015). Ancient mycobacterial lipids: Key reference biomarkers in charting the evolution of tuberculosis. *Tuberculosis*, 95(Supplement 1), S133–S139. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.009>
- Minnikin, D., Lee, O., Wu, H., Besra, G., & Donoghue, H. (2012). Molecular Biomarkers for Ancient Tuberculosis, Understanding Tuberculosis-Deciphering the Secret Life of the Bacilli. In P.-J. Cardona (Ed.), *Understanding Tuberculosis – Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. IntechOpen.
- Mugenyi, N., Ssewante, N., Baluku, J. B., Bongomin, F., Irene, M. M., Andama, A., & Byakika-Kibwika, P. (2024). Innovative laboratory methods for improved tuberculosis diagnosis and drug-susceptibility testing. *Frontiers in Tuberculosis*, 1, Article 1295979. <https://doi.org/10.3389/ftubr.2023.1295979>
- Mukherjee, S., Perveen, S., Negi, A., & Sharma, R. (2023). Evolution of tuberculosis diagnostics: From molecular strategies to nanodiagnosics. *Tuberculosis*, 140, 102340. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2023.102340>
- Murray, J. F., Rieder, H. L., & Finley-Croswhite, A. (2016). The King's Evil and the Royal Touch: The medical history of scrofula. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(6), 713–716. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0229>
- Murray, J. F., Schraufnagel, D. E., & Hopewell, P. C. (2015). Treatment of tuberculosis: A historical perspective. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(12), 1749–1759. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-632PS>
- Nicklisch, N., Maixner, F., Ganslmeier, R., Friederich, S., Dresely, V., Meller, H., Zink, A., & Alt, K. W. (2012). Rib lesions in skeletons from early Neolithic sites in Central Germany: On the trail of tuberculosis at the onset of agriculture. *American Journal of Physical Anthropology*, 149(3), 391–404. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22137>
- Odell, J. A. (2012). The history of surgery for pulmonary tuberculosis. *Thoracic Surgery Clinics*, 22(3), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2012.05.003>
- Orgeur, M., Sous, C., Madacki, J., & Brosch, R. (2024). Evolution and emergence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 48(2), fuae006. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae006>
- Ortner, D. J. (Ed.). (2003). *Identification of pathological conditions in human skeletal remains* (2nd ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-528628-2.X5037-6>

- Papa, V., Galassi, F. M., Varotto, E., Gori, A., & Vaccarezza, M. (2023). The evolution of diagnostic techniques in the paleopathology of tuberculosis: A scoping review. *Pathogens and Immunity*, 8(1), 93–116. <https://doi.org/10.20411/pai.v8i1.597>
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M. E., & Källenius, G. (2012). Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002464. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002464>
- Pedersen, D. D. (2017). *The presence of tuberculosis in Danish skeletons AD 800–1800: From skeletal data to paleoepidemiological analysis* (PhD thesis). University of Southern Denmark. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13111.42409>
- Pedersen, D. D., Milner, G. R., Kolmos, H. J., & Boldsen, J. L. (2019). The association between skeletal lesions and tuberculosis diagnosis using a probabilistic approach. *International Journal of Paleopathology*, 27, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2019.01.001>
- Pósa, A., Maixner, F., Mende, B. G., Köhler, K., Osztás, A., Sola, C., Dutour, O., Masson, M., Molnár, E., Pálfi, G., & Zink, A. (2015). Tuberculosis in Late Neolithic-Early Copper Age human skeletal remains from Hungary. *Tuberculosis*, 95(Supplement 1), S18–S22. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.011>
- Raviglione, M. C., & Uplekar, M. (2006). WHO's new Stop TB Strategy. *The Lancet*, 367(9514), 952–955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68392-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68392-X)
- Rito, T., Inlamea, O., Oliveira, O., Duarte, R., Soares, P., & Correia-Neves, M. (2023). Evolution and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. In *Tuberculosis* (pp. 847–865). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-15955-8_41
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., & Caramelli, D. (2012). Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution*, 44(1), Article 21. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-21>
- Roberts, C. A., & Buikstra, J. E. (2003). *The bioarchaeology of tuberculosis: A global view on a reemerging disease*. University Press of Florida.
- Roberts, C. A., & Buikstra, J. E. (2019). Bacterial infections. In J. E. Buikstra (Ed.), *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains* (3rd ed., pp. 321–439). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809738-0.00011-9>
- Roberts, C. A., & Buikstra, J. E. (2020). The history of tuberculosis from earliest times to the development of drugs. In P. D. O. Davies, S. Gordon, & G. Davies (Eds.), *Clinical tuberculosis* (6th ed., pp. 3–15). CRC Press.

- Roberts, C. A., Davies, P. D., Blevins, K. E., & Stone, A. C. (2022). Preventable and curable, but still a global problem: Tuberculosis from an evolutionary perspective. *Palaeopathology and evolutionary medicine*, 179–203.
- Roberts, C. A., Pfister, L.-A., & Mays, S. (2009). Letter to the editor: Was tuberculosis present in *Homo erectus* in Turkey? *American Journal of Physical Anthropology*, 139(3), 442–444. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21056>
- Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Kahila Bar-Gal, G., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M., & Brittain, D. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical Infectious Diseases*, 33(3), 305–311. <https://doi.org/10.1086/321886>
- Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J., & Holcomb, T. A. (1994). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2091–2094. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2091>
- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Mokrousov, I., & Rastogi, N. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *Journal of Molecular Evolution*, 53(6), 680–689. <https://doi.org/10.1007/s002390010255>
- Siek, T. (2013). The osteological paradox and issues of interpretation in paleopathology. *Paleopathology Newsletter*, 12(1). <https://vav.library.utoronto.ca/index.php/vav/article/view/19464>
- Solovič, I. (2019). *Tuberkulóza ve faktech i obrazech*. Galén.
- Sparacello, V. S., Roberts, C. A., Kerudin, A., & Müller, R. (2017). A 6500-year-old Middle Neolithic child from Pollera Cave (Liguria, Italy) with probable multifocal osteoarticular tuberculosis. *International Journal of Paleopathology*, 17, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2017.01.004>
- Spekker, O., Hunt, D. R., Király, K., Kis, L., Madai, Á., Szalontai, C., Molnár, E., & Pálfi, G. (2023). Lumbosacral tuberculosis, a rare manifestation of Pott's disease – How identified human skeletons from the pre-antibiotic era can be used as reference cases to establish a palaeopathological diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 138, 102287. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102287>

- Spyrou, M. A., Bos, K. I., Herbig, A., & Krause, J. (2019). Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research. *Nature Reviews Genetics*, 20(5), 323–340. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0119-1>
- The Union. (2024). *The Karel Styblo Public Health Prize*. <https://theunion.org/about-us/awards-and-honours/the-karel-styblo-public-health-prize>
- Tonar, Š. (2017). Historie tuberkulózy a její léčby. *Dějiny věd a techniky*, 50(3), 203–225. https://dvt-journal.cz/media/article_pdfs/DVT_3-2017_a-Tonar.pdf
- Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (ÚZIS). (2023). *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2023. Tuberkulóza v České republice 2023*. <https://www.uzis.cz/res/f/008451/tbc2023-cz.pdf>
- Vachek, J., Urbánek, P., & Komenda, S. (2015). *Mikrobiologie pro studenty medicíny*. Triton.
- Van Doren, T. P. (2022). Biocultural perspectives of infectious diseases and demographic evolution: Tuberculosis and its comorbidities through history. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 31(6), 276–287. <https://doi.org/10.1002/evan.21970>
- Váradí, O. A. (2020). *Development of lipid biomarker based diagnostic method for TB research in archaeological samples via HPLC-HRMS* (Doctoral dissertation, University of Szeged). https://www.academia.edu/66912511/Development_of_lipid_biomarker_based_diagnostic_method_for_TB_research_in_archaeological_samples_via_HPLC_HRMS
- Vargová, L., Vymazalová, K., & Horáčková, L. (2017). A brief history of tuberculosis in the Czech Lands. *Tuberculosis*, 105, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.04.006>
- Vašáková, M. (2017). Současný přístup k diagnostice, léčbě a prevenci tuberkulózy. *Vnitřní lékařství*, 63(11), 815–820. <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2017/11/10.pdf>
- Warinner, C., Richter, K. K., & Collins, M. J. (2022). Paleoproteomics. *Chemical Reviews*, 122(16), 13401–13446. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00703>
- Wirth, T., et al. (2008). Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. *PLoS Pathogens*, 4(9), e1000160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160>
- Witas, H., Donoghue, H. D., Kubiak, D., Lewandowska, M., & Gładkowska-Rzeczycka, J. J. (2015). Molecular studies on ancient *M. tuberculosis* and *M. leprae*: methods of pathogen and host DNA analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(9), 1733–1749. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2427-5>

- Wood, J. W., Milner, G. R., Harpending, H. C., & Weiss, K. M. (1992). The Osteological Paradox: Problems of Inferring Prehistoric Health from Skeletal Samples [and Comments and Reply]. *Current Anthropology*, 33(4), 343–370. <https://doi.org/10.1086/204084>
- World Health Organization (WHO). (2020). *Global Tuberculosis Report 2020*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- World Health Organization (WHO). (2021a). *WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis*. <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
- World Health Organization (WHO). (2021b). *Global Tuberculosis Report 2021*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
- World Health Organization (WHO). (2023). *Global Tuberculosis Report 2023*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>
- World Health Organization (WHO). (2024). *Global Tuberculosis Report 2024*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240101531>
- Zaporojan, V., et al. (2024). Evolution of Laboratory Diagnosis of Tuberculosis. *Clinical Practice*, 14(2), 388–416. <https://www.mdpi.com/2039-7283/14/2/30>
- Zein-Eddine, R., Hak, F., Le Meur, A., Genestet, C., Dumitrescu, O., Guyeux, C., Senelle, G., Sola, C., & Refrégier, G. (2023). The paradoxes of *Mycobacterium tuberculosis* molecular evolution and consequences for the inference of tuberculosis emergence date. *Tuberculosis*, 143(Supplement), 102378. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2023.102378>