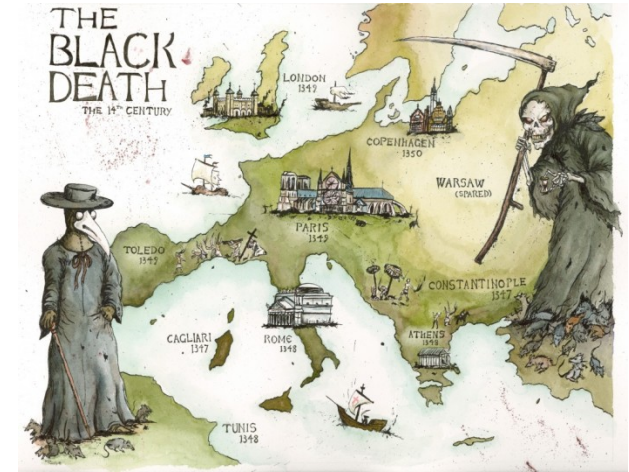


Analýzy aDNA patogenů

- Patogen
- Vir
- Bakterie
- Parazit



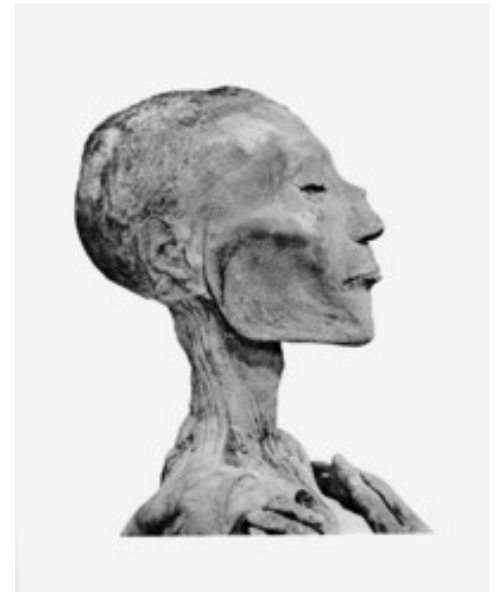
Cíle studia aDNA patogenů:

- Vztah patogen – hostitel, evoluce, koevoluce adaptace, změna virulence
- Paleoepidemiologie
- Geografická lokace - objevitelské cesty, kolonizace
- Historický kontext – války, záhadná úmrtí...

PŘESAHI DO SOUČASNOSTI A BUDOUCNOSTI

Zdroje aDNA patogenů

- Kostní tkáň – ložiska nemoci, kosterní materiál bez příznaků
- Měkké mumifikované tkáně
- Koproility
- Muzejní exponáty
- Fixované histologické vzorky
- Vzorky půdy z okolí nálezu
- !Zubní kámen!



aDNA patogenů – cílové sekvence

Metagenomika

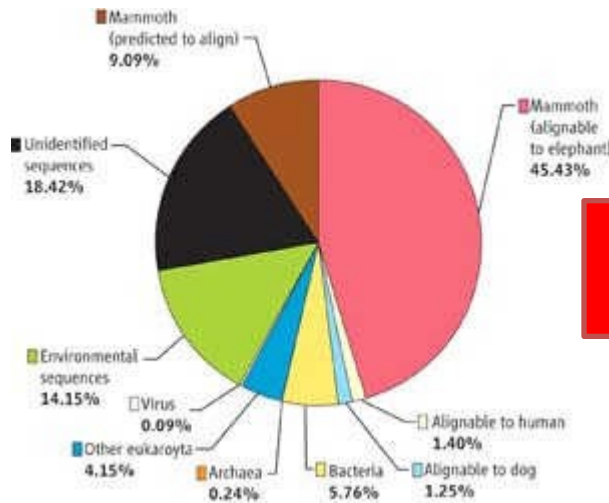


Celogenomové
sekvenování

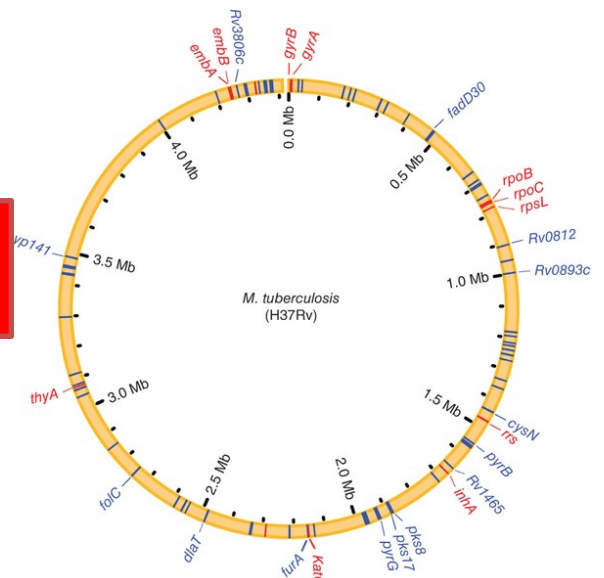
Specifické geny



Geny spojené s
virulencí



**!Protikontaminační podmínky!
Bezpečnost?**



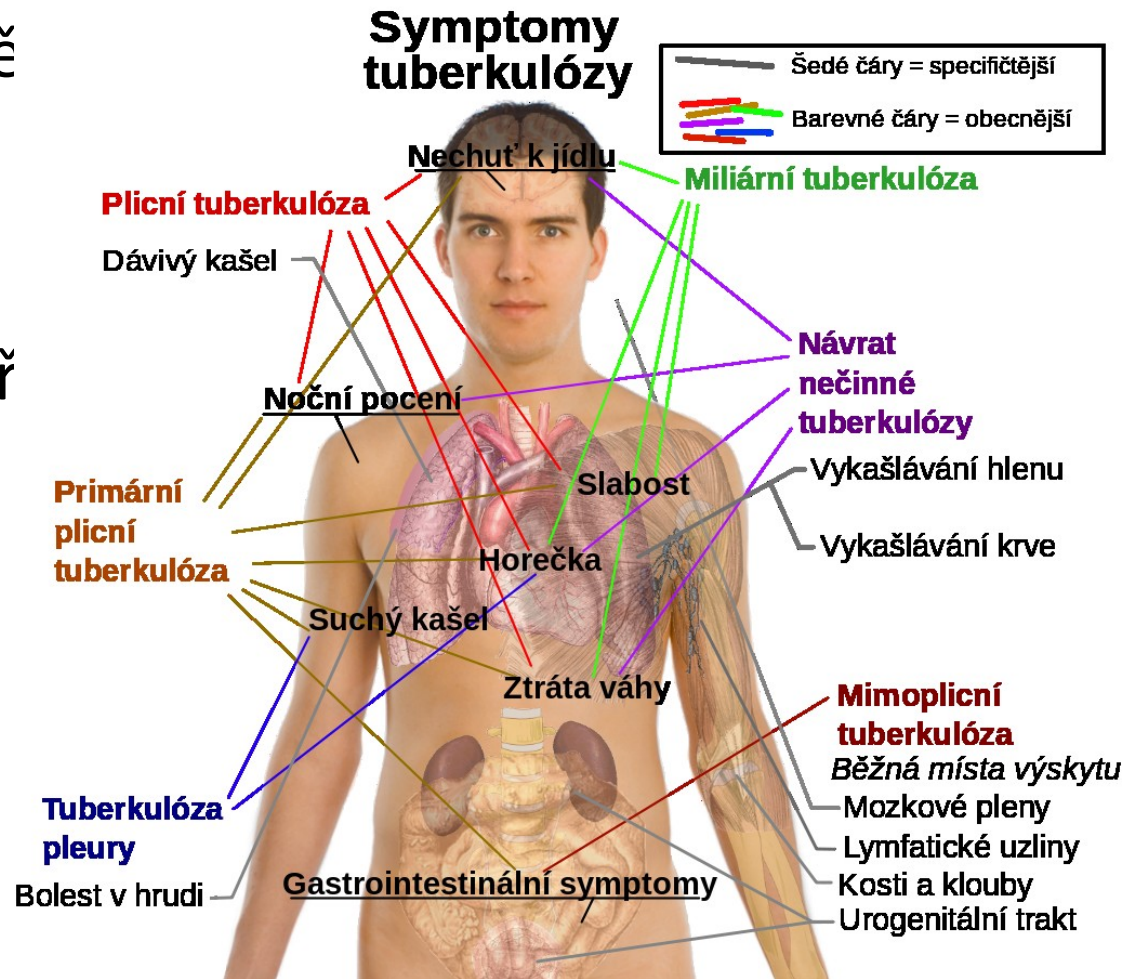
Mycobacterium tuberculosis

- Pomalu se dělící, grampozitivní bakterie závislá na kyslíku
- Přenos kapénkovou infekcí



Tuberkulóza

- TBC, souchotiny , úbyteř ftíza
- krtice – lymf. systém, lupus vulgaris – kůže
- Pottova nemoc – páteř obratle



Pottova nemoc



Mycobacterium tuberculosis

- Nejasný vývoj – výzkum repetitivních sekvencí
- Rod *Mycobacterium* je spojen již s paleolitickým šířením *Homo sapiens sapiens* z Afriky
- Od neolitu se začalo vyskytovat i *M. bovis* - přirozený rezervoár ve zvířatech
- Geneticky neuniformí, virulentnější poddruhy, rezistentní kmeny
- Zmínky o tuberkulóze: v Eberský papyrus (1550 př. n. l.), Starý zákon, Vědy (1500 př. n. l.), Hippokrates (460 př. n. l.)
- Výskyt i v Jižní Americe ještě před zámořskými objevy
- Vrchol epidemie na přelomu 18. a 19. století

aDNA *Mycobacterium tuberculosis*

- První analýzy již v roce 1994 (Salo *et al.*)
- DNA se dobře zachovává – hydrofobní lipidová buněčná stěna
- 1000 let stará americká mumie
- Analýza repetitivní inzerční sekvence IS6110 (123 pb)
- Tento lokus se používá dodnes (Donoghue *et al.*, 2004, Stone *et al.*, 2009)
- Doplněno mikrobiologickými analýzami (Hershkovitz *et al.*, 2008)

Mycobacterium tuberculosis

Populační studie na aDNA

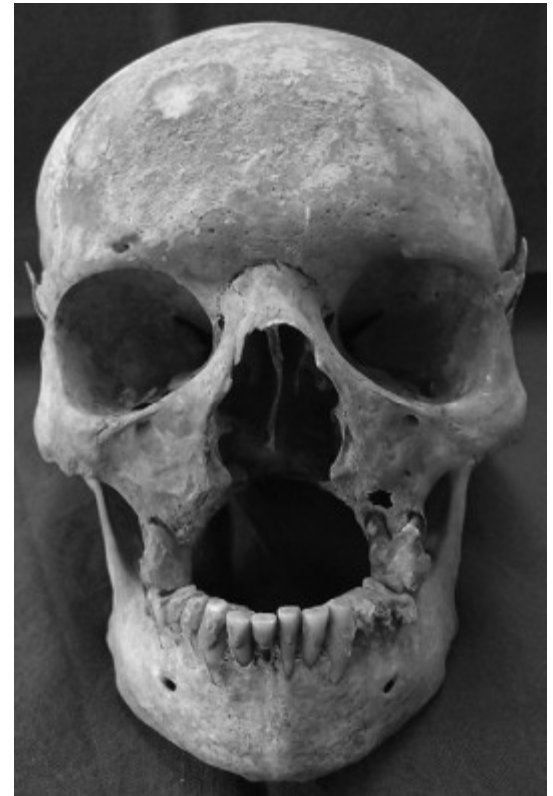
- Zink *et al.*, 2001 – 37 egyptských mumií (3000 – 500 B. C.)
- Zink *et al.*, 2003 – 87 egyptských mumií (2050 – 500 B. C.)
- Původně nakaženy *M. africanus*, po roku 1050 B. C. pouze *M. tuberculosis*
- Bowman et Brown (2005) – 168 koster z Maďarska (18. – 19. století) – 50% populace
- Donoghue et al. (2011) – 93 mumií z Maďarska (18. stol.)
- - 78%!! populace

Mycobacterium leprae

- lepra, malomocenství"
- Způsobena *Mycobacterium leprae*
- Není tak infekční jak *M. tuberculosis*
- Nejstarší zmínka cca 1500 př. n. l., nejstarší tělesné pozůstatky vykazující jasné známky tohoto onemocnění sahají až do 4. tisíciletí př. n. l.
- Za křížáckých válek zavlečena do Evropy
- Leprosária
- *Mycobacterium leprae* také označován po svém objeviteli jako Hansenův bacil. Ten se geneticky od středověku nezměnil, ale omezila se příčina šíření
- *M. leprae* v akutní formě napadá Schwannovy buňky, makrofágy v periferní nervové soustavě a způsobuje znetvořeniny na končetinách a na obličeji



Leprózní kosti



aDNA Mycobacterium leprae

- Porovnáním DNA M. leprae z Brazílie, Indie, Thajska aDNA byla zjištěna malá genetická diverzita
- Analýza SNP a RLEP – repetitivní elementy (velký genom s řadou pseudogenů)
- Původ v západní Africe, šířila se do Asie, a V. Afriky
- První analýza 1994, 1400 let staré kostry (Rafi *et al.* 1994)
- Nákaza často spojena s tuberkulózou (Donoghue *et al.*, 2005)



Yersinia pestis

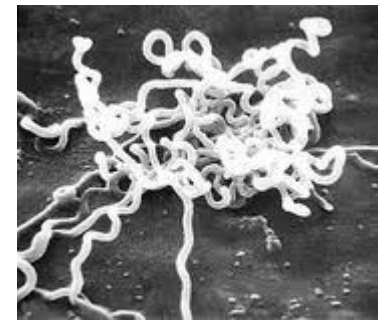


- Gramnegativní tyčinkovitá bakterie
- Tři formy projevu:
- dýmějový mor (bubonická forma)
- septický mor
- plicní mor (pneumonická forma)
- Přenos blechami z hlodavců
- Několik vln epidemií: Justiniánský mor, Černá smrt, Velký londýnský mor
- Černá smrt ve 14. století vyhubila 1/3 – 1/2 obyvatel Evropy

aDNA Yersinia pestis

- Dancourt a kol. v roce 1998 poprvé vyizoloval DNA *Yersinia pestis* ze zubů
- Analýza sekvencí genu *Rpob* – RNA polymerase β -subunit encoding gene a *pla* – virulence – associated plasminogen activator encoding gene
- Dvě teorie původu – orientální a středomořská
- Analýza aDNA 76 jedinců z masového hrobu z 14. století – dvě cesty původu moru (Haensch et al. 2010)
- 2011, Bos a kol. analyzoval *Y. pestis* ze 14. stol. z Londýna – mutace způsobily vyšší virulenci nemoci

Treponema pallidum

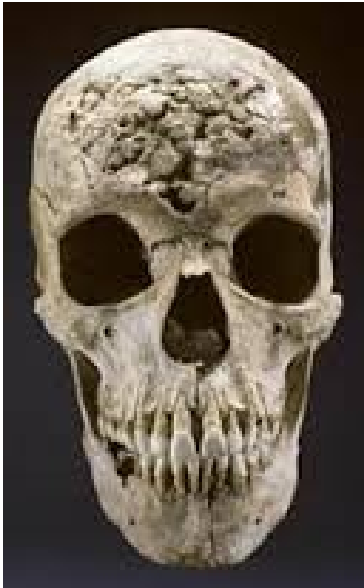


- Syphilis, příjice, lues, francouzská nemoc, Venušín mor
- 4 stádia – primární a latentní špatně rozpoznatelné, kongenitální forma
- Přenos tělními tekutinami
- Dvě teorie původu:
 - Předkolumbovská – nepotvrzeno
 - Kolumbovská
- První epidemie již v letech 1494/1495
- Celá řada významných obětí, ale často jen spekulace!



Treponema pallidum v kostech

- Tvorba gummat



500 Years of Syphilis

1492
Christopher Columbus and his crew travel to the New World, possibly picking up syphilis and transporting it back to Europe.

1494-1495
French King Charles VIII invades Naples with 25,000 troops. Soon after, syphilis begins to spread among the soldiers and the prostitutes who accompanied them.

Mid-20th Century
The discovery of antibiotics controls the spread of syphilis, while a World Health Organization yaws eradication campaign treats hundreds of millions of people worldwide with injections of penicillin, eliminating the disease entirely from many countries.

Late 1980s
Researchers at Tanzania's Gombe Stream National Park report a gruesome disease that affects the genitals of resident baboons.

2005
Paleopathologists Mary Lucas Powell and Della Collins Cook find indisputable evidence of treponemal infections throughout the Americas, with many cases occurring in juveniles, leading researchers to believe that the disease is not transmitted sexually.

2008
A new phylogenetic tree suggests that the closest genetic relatives of syphilis strains are yaws-causing strains of *T. pallidum* found in the interior of the South American country of Guyana.

2011
In a comprehensive survey, we find that cases with a strong treponemal diagnosis do not have a solid pre-Columbian date, challenging the idea that treponemal disease existed in Europe pre-1492.

March 2012
The World Health Organization announces a second counter-offensive against yaws.

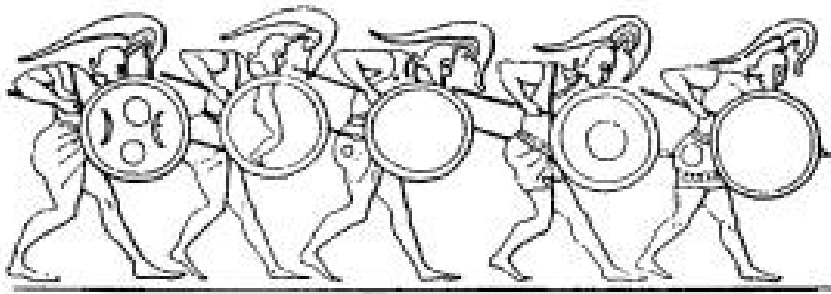
Today
Roughly 12 million people are diagnosed with syphilis each year, and yaws continues to plague many regions of Africa. Bejel, on the other hand, is extremely uncommon, with the first case in nearly 20 years reported in Iran last year.

aDNA *Treponema pallidum*

- Zoechling a kol., 1999 – izolace treponemy z histologických řezů
- Kolman *et al.*, 1998 - izolace treponemy z 200 let starých kostí
- Velmi problematické získat aDNA treponemy
- Bakterie je v kostech pouze v terminálním stádiu a pouze v místě léze (Bouwman *et* Brown, 2005)
- Bakterie je velmi křehká a velmi snadno podléhá degradaci (von Hunnius *et al.*, 2007)
- U novorozenců (kongenitální forma) je přítomna v kostech všude a ve vysokém množství (Montiel *et al.*, 2012)

Další bakteriální nákazy

- Salmonella enetrica serovar typhi – břišní tyfus
- Rickettsia prowazekii – skvrnitý tyfus
- Bartonella henselae
- Bacillus anthracis – antrax, sněť slezinná
- (Paragrikorakis *et al.*, 2006)



Virová onemocnění

- Španělská chřipka (Orthomyxoviridae)

Kompletní sekvence DNA, geneticky podobná ptačí chřipce, na člověka přenesena z neznámého zdroje (Taubenberg *et al.*, 2005, 2007)

- Hepatitida B (Hepadnaviridae)

mumifikovaných jater, endemická korejská forma (Bar – Gel *et al.*, 2012)

- Neštovice (Poxviridae, variola)

Pravé neštovice

- Prokázány už v mumiích – Ramesse II (1147 B. C)
- Některé kmeny až 100% úmrtnost nakažených
- 1980 vyhubeny, pouze 2 referenční laboratoře:
- the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Atlanta, GA, USA) and the State Research Center of Virology and Biotechnology (VECTOR) (Koltsovo, Russia)
- Osteomyelitis variolosa
- Sibiřská mumie – virus podobný variole (Biagini et al., 2012)!



aDNA humánních parazitů

- *Plasmodium spp.* (Zink *et al.*, 2006) - malárie
- *Trypanosoma cruzi* (Maden *et al.*, 2006) – spavá nemoc
- *Escherichia coli* (Fricker *et al.*, 1997) – entrobakterie
- *Helicobacter pylori* (Swanston *et al.*, 2011) – žaduleční vředy
- *Ascaris lumbricoines* (Loreille *et al.*, 2001) – škrkavka
- *Enterobius vermicularis* (Iniguez *et al.*, 2006) – roup dětský
- *Clonorchis sinensis* (Liu *et al.*, 2007) - motolice žlučová
- *Trichuris trichuria* (Oh *et al.*, 2010b) - tenkohlavec hlístí
- *Pediculus humanis capitis* (Raoult *et al.*, 2006, 2008) - veš dětská