

LIPID BIOMARKEREK HPLC-HRMS VIZSGÁLATA TÖRTÉNETI EMBERTANI MINTÁK TBC DIAGNOSZTIKÁJA SORÁN

Váradí Orsolya Anna

Szegedi Tudományegyetem, Embertani Tanszék, Szeged
Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Szeged
Témavezetők: Dr. Pálfi György és Dr. Szekeres András

Váradí O. A.: *Development of lipid biomarker-based diagnostic method for TB research in archaeological samples via HPLC-HRMS. Tuberculosis (TB) is not only an infectious disease but one of the top 10 causes of death, spreading mainly with aerosol transmission and accompanying the history of humankind for several millennia. TB is caused in humans and animals by members of the Mycobacterium tuberculosis complex. For better understanding of the disease and the evolutionary background of its causative agent, involvement of palaeopathological investigations is surpassingly important. Traditionally, palaeopathology is using a broad variety of markers, which are observable by macroscopic investigations. These markers are mainly related to different extra-pulmonary forms of TB. However, these manifestations develop only in a few cases. Moreover, many markers are not pathognomonic of TB. Therefore, to avoid underestimation of TB prevalence in paleopathological studies, the diagnosis on archaeological material requires a multidisciplinary approach.*

For better estimation of TB incidence in past populations, an array of specific biomarkers can be brought into play to confirm initial, macromorphology-based skeletal diagnoses, namely aDNA and lipid biomarkers. The three lipid biomarker groups, which are mainly involved in such investigations are the mycolic acids (MAs), the mycocerosic acids (MCs) and the C27 mycolipenic acid (ML). These unique lipids can be located in the lipid-rich mycobacterial cell wall. The application of lipid-based TB diagnostic approach has been proved to be robust and reliable through many examples. A variety of analytical methods have been employed for mycobacterial lipid biomarker profiling. Fluorescence HPLC is well-developed for the analysis of mycolic acids and phthiocerols. Furthermore, one isolated case of direct mass spectrometric detection of M. tuberculosis free mycolic acids has been also introduced.

Our aim was to establish a lipid-biomarker-based HPLC-MS method for TB diagnosis in historical human samples, as this instrumentation is available in many laboratories, has the potential of a quick and sensitive and at the same time an affordable measurement protocol. We successfully developed and optimised a method, which is capable to separate and detect MAs and MCs. Moreover, we optimised the sample pre-treatment process. We started to build an MA and MC lipid profile library, which can serve as a comparison to diagnose TB.

For the verification of new methods and the estimation of reliability of new markers in macroscopic analysis, palaeopathologists usually use well-documented collections of skeletons and mummies from the pre-antibiotic era. For this purpose, we chose to test our method on the Vác Mummy Collection. In the case of four out of six mummified individuals, MC profiles of characteristic M. tuberculosis MCs were recorded. The HPLC-ESI-MS method, developed for the detection of MCs, opens a new avenue for the detection of ancient mycobacterial disease, encompassing both tuberculosis, leprosy and joint cases.

Keywords: Palaeopathology; Tuberculosis; Lipid biomarkers; HPLC-MS; Vác mummies.

Bevezetés

A tuberkulózis (tbc) egy olyan cseppfertőzéssel terjedő, fertőző megbetegedés, ami az emberiség történelmét több évezrede kíséri (Gutierrez és mtsai 2005, Daniel 2006, Baker és mtsai 2015, Barberies és mtsai 2017), és napjainkban is az egyike a 10 leggyakoribb halálóknak (WHO 2020). Jelenlegi ismereteink szerint 12, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-be (MTBC) sorolt *Mycobacterium* faj okozhat tbc-s megbetegedést (Brosch és mtsai 2002, Brites és Gagneux 2017, Brites és mtsai 2018, Riojas és mtsai 2018).

Annak érdekében, hogy hatékonyabban vegyük fel a harcot a betegséggel, annak jobb megismerése elengedhetetlen, így a történeti embertani anyagokon történő paleoepidemiológiai kutatása kiemelten fontos (Pai és mtsai 2016). A történeti korokban előforduló mikobakteriális megbetegedések diagnózisa multidiszciplináris megközelítést igényel. A letöbb tuberkulózissal összefüggésbe hozható csonttani elváltozást a betegség extrapulmonális megjelenési formái eredményezik (Aufderheide és Rodríguez-Martín 1998, Marcsik és mtsai 1999, 2009, Pálfi és Marcsik 1999, Hershkovitz és mtsai 2002, Maczel 2003, Ortner és mtsai 2003, Paja és mtsai 2015, Pálfi és Molnár 2009, Pálfi és mtsai 2012, 2015, Mariotti és mtsai 2015, Spekker 2018, Spekker és mtsai 2018, 2020a, b).

A WHO becslései szerint extrapulmonális tbc-t mindössze az esetek 16%-ában regisztráltak 2019-ben (WHO 2020). Továbbá az egyébként is viszonylag alacsony arányban megjelenő extrapulmonális tbc-s eseteknek csak egy kis százalékában alakulnak ki specifikus és detektálható csontelváltozások, ezért a makroszkópos paleopatológiai vizsgálatok önmagukban alábecsülik a tbc prevalenciáját a történeti embertani anyagok analízise során. A korábban élt népegek között fellelhető tbc-s esetek számának pontosabb becsléséhez ezért a makroszkópos vizsgálatok mellett, a csontokból és lágyszövetekből kivonható, specifikus biomarkerek azonosítására is szükség van, amelyek segítségével a morfológiai alapon gyanúsnak ítélt esetek igazolhatók (Donoghue és mtsai 2017). A leggyakrabban használt molekuláris biológiai módszer, az aDNS vizsgálatok mellett, a lipid biomarker profilok vizsgálata is elterjedt, hatékonysága számos tanulmányban bizonyított (Donoghue és mtsai 1998, 2017, Gernaey és mtsai 2001, Hershkovitz és mtsai 2008, Lee és mtsai 2012, Baker és mtsai 2015, Masson és mtsai 2015, Minnikin és mtsai 2015, Molnár és mtsai 2015, Luna és mtsai 2020).

Egy komplex, több lipid biomarker vizsgálatán alapuló vizsgálati eljárást David E. Minnikin és munkatársai adtak közre 1993-ban. A módszerben a mikolsavak (MA), a tuberkulosztearin savak (TSA) és a mikocerozátok (MC) kerültek meghatározásra (Minnikin és mtsai 1993). Ez az eljárás klinikai diagnosztikai felhasználásra készült, nem sokkal később történeti anyagból történő tbc kimutatásához is adaptálták kisebb változtatásokkal (Gernaey és mtsai 1998, 2001, Donoghue és mtsai 1998).

A mikolsav kimutatáson alapuló metódus egy újabb és érzékenyebb változatát Hershkovitz és munkatársai közölték 2008-ban (Hershkovitz és mtsai 2008). A kivont lipideket pentafluorobenzol bromiddal (PFB) származékképezték, majd szilárd fázisú extrakcióval (SPE) egy normál fázisú (NP) tölteten tisztították. A tisztított PFB-MA frakciókat származékképezték pirenil-vajsavval (PBA), majd reverz fázisú (RP) tölteten ismét SPE-val tisztították. A PBA-PFB-MA származékokat tartalmazó frakciókat nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal (HPLC) reverz fázisú oszlopon elválasztották, a lipideket fluoreszcens detektorral (FLD) detektálták és ismét frakciókat gyűjtöttek. A célmolekulákat tartalmazó frakciókból ezt követően NP-HPLC-FLD eljárással

elválasztották az alfa-, metoxi- és keto-mikolsavakat. A külön-külön gyűjtött mikolsav típusokat külön RP-HPLC-FLD futásokkal analizálták.

A mikolsavak klinikai azonosítására egy másik megközelítés az elmúlt évtized első felében leírt tömegspektrometriás (MS) analízisen alapszik. A módszert az előbbihez hasonlóan, eredetileg tbc klinikai diagnózisához fejlesztették ki (Szewczyk és mtsai 2013). A kimutatás HPLC-MS/MS mérésen alapul, elektropray ionizációs (ESI) ionforrás alkalmazásával. A mintaelőkészítés során származékképzésre nem volt szükség, valamint a mintákat elválasztás nélkül analizálták, így a vizsgálat viszonylag rövid idő alatt elvégezhető. Az eljárás közlése után egy évvel a módszert történeti embertani anyagon is alkalmazták (Borowska-Struginska és mtsai 2014).

Szintén egy lipid biomarker alapú, paleopatológiai alkalmazásra kifejlesztett módszer került bemutatásra 2009-ben, amelyben a mikocerozát (MC) mintázat alapján, illetve a C27-es mikolipenát (ML) jelenléte alapján következtettek a tbc fertőzés jelenlétére (Redman és mtsai 2009). Az optimalizált módszer teszteléséhez és bemutatásához felhasználta minták a „*Coimbra Identified Skeletal Collection*” részét képező embertani maradványokból származtak. A vizsgálatba a C27 ML mellett a C26, C27, C29, C30, C32, C33, C34 MC-eket vonták be. Az extrahált MC-t és ML-t tartalmazó frakciókat először PFB-vel származékképezék majd további extrakciót követően NP-SPE-n tisztították. Az így kinyert frakciókat NP-HPLC-n vizsgálták, amely során a többszörös metilágazást tartalmazó zsírsavak, mint például a mikocerozátok PFB-vel képzett észterei elváltak az egyéb PFB-zsírsav észterektől. Az összegyűjtött PFB-észtereket ezután GC-MS-el analizálták. A mérésekhez negatív kémiai ionizációt alkalmaztak, a keletkezett ionokat kiválasztott ionkövetéssel (SIM) vizsgálták. A módszer optimalizálásához használt *M. tuberculosis* sejtekből a C29, C30 és C32 MC-eket, valamint a C27 ML-t sikerült kivonni a legnagyobb mennyiségben.

Az új módszerek igazolásához és az új makromorfológiai markerek megbízhatóságának becsüléséhez általában jól dokumentált, az antibiotikumok előtti időszakból származó csont- és műmiagyűjteményeket használnak a paleopatológiában (Roberts és mtsai 1994, Santos és Roberts 2001, 2006, Pálfi és mtsai 2012, Spekker 2018, Spekker és mtsai 2020a, b). A Váci Múmiák gyűjteménye az egyike ezeknek a jól dokumentált és széles körben tanulmányozott gyűjteményeknek, amelynek nagy előnye, hogy az egyének korában lejegyzett vonatkozó adatok mellett számos tbc-vel kapcsolatos kutatási eredmény is rendelkezésre áll (Szikossy és mtsai 1997, Pap és mtsai 1999, 2017, Fletcher és mtsai 2003, Chan és mtsai 2013, Kay és mtsai 2015). Mivel ezek a múmiák a modern korból, de még az antibiotikumok elterjedése előtről származnak, rendkívül jó kapcsolatot képeznek a kortárs és régészeti minták között. A váci múmiák makroszkópos vizsgálata során egyes egyéneknél felmerült a tbc fertőzés gyanúja, ezért egy aDNS alapú kiterjedt szűrővizsgálatot végeztek az érintett esetek felkutatására (Fletcher és mtsai 2003). Az aDNS vizsgálatok során 168 egyénből származó 350 mintát elemeztek, amelyek alapján a vizsgált egyének 55%-a MTBC fertőzött volt.

Célkitűzések

Számos esetben igazolták már a MA, MC és C27 ML alapú kimutatási módszerek alkalmazhatóságát a tbc-fertőzés detektálására történeti anyagokon, azonban az eddigi módszerek hosszú mintaelőkészítési eljárásokat tartalmaztak és végrehajtásuk speciális felkészültséget igényelt (Hershkovitz és mtsai 2008, Redman és mtsai 2009, Lee és mtsai 2012, Donoghue és mtsai 2017).

Célunk az volt, hogy egy olyan lipid biomarker alapú HPLC-MS módszert hozzunk létre tbc-fertőzések történeti embertani vizsgálatokban történő azonosításához, amelyhez a szükséges műszerek számos laboratóriumban elérhetők, valamint egy gyors és érzékeny, mindeközben gazdaságos eljárás lehetőségét rejti magában. A dolgozat legfőbb célkitűzései a következő pontokra oszthatók fel:

1. HPLC-MS módszer fejlesztése és optimalizálása a két leggyakrabban használt lipid biomarker csoport kimutatására.
2. Mikolsav- és mikocerozát-profilkönyvtár létrehozása, ami a későbbi kutatások során referenciaként szolgál a diagnózis felállításához.
3. A létrehozott lipid biomarker alapú módszer tesztelése 6 váci múmiából származó csont- és lágyszövet mintán.

Anyagok és módszerek

Az azonosítási eljárások kifejlesztése során kezdetben két referencia törzset *M. tuberculosis* H37Rv (NR-49098) és *M. bovis* (NR-31210), valamint David E. Minnikin által biztosított MA standardot használtunk fel. A referencia törzsek az „American Type Culture Collection”-ből (ATCC) és a BEI Resources-tól (Manassas, Virginia, USA) származtak. A módszer teszteléséhez 5 *M. tuberculosis* complex törzset használtunk fel (az izolált törzsek laboratóriumi azonosítója: MTBC-1/2015; MTBC-254/2000; MTBC-3910/2014; MTBC-242/2000; és MTBC-1/8508/2014), amelyeket pulmonális tuberkulózissal diagnosztizált egyénekből izoláltak. Továbbá 8 különböző eredetű nem-tuberkulotikus *Mycobacterium* (NTM) fajt vontunk be a vizsgálatokba (*M. kansasii* 1959/2018, *M. chelonae* 16/2018, *M. gordonae* 389/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. avium* 16229/2018, *M. chimaera* 619/2018, *M. abscessus ssp. abscessus* 180/2018, és *M. fortuitum complex* 3/2018). A mikocerozát kimutatási módszer teszteléséhez 6 váci múmiából származó csont- és lágyszövet mintát vizsgáltunk. A mintázott egyének korábbi aDNS-vizsgálatok eredményei szerint tbc-pozitívak voltak. A kiválasztott egyének felnőttek voltak, 4 nő és 2 férfi. A vizsgált múmia minták (mind csont-, mind lágyszövetminták) a mellkasrégióból származtak. A vizsgálatok Shimadzu LC-10AD VP HPLC-hez kapcsolt Shimadzu LCMS-2010A Single Quadrupole tömegspektrométeren, valamint egy Dionex Ultimate 3000 UHPLC-hez kapcsolt Q-Exacte Plus MS-en (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) történt. Az elválasztáshoz Gemini – NX C18 (3 µm, 110A, 50 mm × 2 mm) oszlopot (Phenomenex, California, USA) használtunk.

A mikolsav kimutatási módszer fejlesztése során 5 különböző eluens összetételt teszteltünk az egyszeres quadrupole LCMS rendszeren, és 14 eluens összetételt a HPLC-Orbitrap MS rendszeren, elválasztás nélkül, ionforrásként ESI-t alkalmaztunk. A megfigyelt MA csúcsok igazolásához az ionokat párhuzamos reakció megfigyelés (PRM) módban fragmentáltuk, 70 kV ütközési energiával. A mikocerozátokat vizsgáltuk mind gradiens elúciós elválasztással, mind elválasztás nélkül. A módszeroptimalizáció során az ESI és atmoszférikus nyomású kémiai ionozációs (APCI) ionforrás hatékonyságát is teszteltük negatív ion módban.

Eredmények és megvitatásuk

A vizsgált MA csúcsok azonosításához két megközelítést alkalmaztunk. Elsőként a megfigyelt tömegspektrumon a kiválasztott csúcsokon felül további mikolsavakat

detektáltunk, amelyek a mért m/z értékeik szerint besorolhatók voltak 28 Dalton (két metil-csoport) különbséget mutató sorozatokba. Ez a tömegkülönbség a mikolsav homológokra jellemző, azok bioszintézis útvonalát követi (Takayama és mtsai 2005). A mikoslavakat ezután PRM üzemmódban vizsgáltuk, amelynek segítségével a két legjellemzőbb, mások által is gyakran detektált, m/z 365,35767 és 395,38901 fragmenseiket azonosítottuk, amelyek a C24 és C26 α -alkil-láncnak felelnek meg (Szewczyk és mtsai 2013, Song és mtsai 2009, Bhamidi és mtsai 2011, Lehmann és mtsai 2018). Az optimalizációs lépések során a kapilláris és a szárítógáz hőmérsékletének, valamint a kapilláris és az S-lencse feszültségének növelésével a csúcsok mért intenzitása is emelkedett az alkalmazott eluens összetételtől függetlenül, mind a mikolsavak, mind a mikocerozátok esetében.

Az aDNS vizsgálatokkal ellentétben természetesen nincs lehetőség a kivont lipid biomarkerek felsokszorosítására, így az extrakció hatékonysága kiemelten fontos, ezért a mintaelőkészítési protokollt is optimalizáltuk. A szappanosításhoz használt kálium-hidroxid (KOH) oldat esetében a 20% és 30% KOH-koncentráció alkalmazása nem mutatott hatásfokbeli különbséget, azonban a koncentráció 10%-ra történő csökkentése negatívan befolyásolta a mikolsav-kihozatalát. Az extrakciós oldószerek tesztelése során a hexánizomer elegy alkalmazása növelte az alfa- és metoxi-mikolátok extrakciójának hatékonyságát, viszont csökkentette a keto-mikolátok kihozatalát, ezért az eredetileg alkalmazott három ismétlésben történő toluolos extrakció került kiegészítésre egy negyedik, hexános extrakciós lépéssel.

Az optimalizált módszerrel ezután megkezdtük egy mikobakteriális mikolsav könyvtár felépítését, amely a későbbi vizsgálatok során referenciaként szolgálhat 5 MTBC (MTBC-1/2015, MTBC-254/2000, MTBC-3910/2014, MTBC-242/2000, MTBC-1/8508/2014) és 5 NTM (*M. gordonae* 389/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. abscessus ssp. abscessus* 180/2018, *M. kansasii* 1959/2018 és *M. chelonae* 16/2018) törzs felhasználásával. Az összes MTBC törzs esetében a legnagyobb arányban előforduló mikolsav az α -C78 volt. A második legnagyobb mennyiségben előforduló mikolsavak az α -C80 és a m-C85 voltak, továbbá a m-C87 mikolsav is magas arányban volt jelen. Az α -C82, m-C88, k-C87 és a m-C89 mikolsavak magasabb, mint 5%-os arányban fordultak elő. Az egyes mikolsavak csúcsterület értékeit típusonként is összegeztük, azok egymáshoz viszonyított arányát is vizsgáltuk. Az 5 klinikai MTBC-izolátum vizsgálata során 4 esetben az alfa-mikolsavak voltak jelen a legnagyobb arányban, mintegy 40–50%-ban, míg egy törzs esetében a metoxi-mikolátok voltak a legnagyobb relatív mennyiségben, amelyek a többi törzs esetében az alfa-mikolsavaknál kisebb arányban, körülbelül 40%-ban voltak jelen. Legkisebb mennyiségben a keto-mikolsavakat detektáltuk az összes vizsgált törzsben. A nem-tuberkulotikus *Mycobacterium* fajok esetében szintén az α -C78 mikolsav volt jelen a legnagyobb mennyiségben, azonban a hosszabb alkil-lánccal rendelkező alfa-mikolátok, valamint a keto- és metoxi-mikolsavak kisebb mennyiségben voltak reprezentáltak. Habár az NTM fajok mikolsavprofiljára vonatkozó irodalmi adatok nagyobb változatosságot mutatnak (Song és mtsai 2009, Shui és mtsai 2011, Szewczyk és mtsai 2013, Minnikin és Brennan 2020) és a mintánk elemszáma sem teszi lehetővé statisztikai következtetések levonását, úgy tűnik, hogy a HPLC-MS-el felvett lipidprofilok alkalmazása – a metoxi- és keto mikolsavak alacsony előfordulási aránya révén – lehetővé teszi az MTBC- és a NTM-tagok elkülönítését. Mindazonáltal ennek megerősítéséhez a könyvtár további bővítésére van szükség.

A mikocerozát alapú kimutatási módszer esetében, szintén egy lipidkönyvtár felépítésével folytattuk a munkát. Az 5 vizsgált klinikai MTBC-izolátum közül négyben, illetve a *M. tuberculosis* H37Rv standard törzs esetében a C32-es mikocerozát volt jelen a

legnagyobb mennyiségben, a C29-es, valamint C30-as mikocerozát egymással közel azonos mennyiségben volt kimutatható, míg a legkisebb intenzitást a C27-es és a C33-as mikocerozátok mutatták. Egy klinikai MTBC törzset kizártunk a *Mycobacterium tuberculosis*-ra jellemző átlag mikocerozát-eloszlás számításából, mivel annak mikocerozát-profilja jobban korrelált a referencia *M. bovis* törzs esetében megfigyeltéhez.

A vizsgált NTM fajok közül (*M. avium* 16229/2018, *M. chelonae* 16/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. fortuitum* 3/2018, *M. gordonae* 389/2018, *M. abscessus* sp. *abscessus* 180/2018, *M. chimaera* 619/2018, *M. kansasii* 1959/2018) a *M. kansasii* mikocerozát profilja volt megállapítható, mivel a többi vizsgált NTM faj sejtfa nem tartalmaz mikocerozátokat. A megfigyelt baktériumprofilok alapján a pozitív tuberkulózis-diagnózis kritériumaként a kiugró C32, illetve az ezzel együtt előforduló magas C29 és C30 csúcsok detektálásában határoztuk meg. A vizsgáltba bevont mumifikálódott egyének közül 4 esetében *M. tuberculosis*-ra jellemző mikocerozát profilt rögzítettünk, míg 2 egyénből származó minták vizsgálata negatív eredményt adott. A 12 vizsgált minta közül 6 esetében (4 lágy szövet, 2 borda) 4 mikocerozát jelenlétét detektáltuk, míg 2 minta vizsgálata során csak 3 mikocerozát jelenléte volt kimutatható. A C27-es mikocerozát egyetlen esetben sem érte el a detektálási limitet. A két, korábban pozitív aDNS eredményt mutató egyén esetében, akiknél a mikocerozát-analízis negatív eredményt adott, az eltérés a vizsgált minta különbségéből is fakadhat. A mumifikálódott egyének vizsgálata sokkal több lehetőséget nyújt a mintaválasztásban, a lágyszöveteket nélkülöző szkeletizált maradványokkal szemben. Bár a #25 és #79-es egyénekhez tartozó minták negatívnak adódtak, nagyon gyenge jeleket megfigyeltünk, amik az egyénekből származó további minták későbbi vizsgálatát indokoltá teszik.

Következtetések és perspektívák

- A tbc diagnosztizálását lehetővé tevő, történeti embertani leleteken is alkalmazható, lipid biomarkereken alapuló HPLC-HRMS módszer kifejlesztése során első lépésként az alkalmazott HPLC és MS paramétereket finomhangoltuk annak érdekében, hogy hatékonyan detektálhassuk a mikolsavakat és mikocerozátokat. A HPLC-HRMS módszer finomhangolása mellett optimalizáltuk a mintaelőkészítési folyamatot. A munka kezdeti szakaszában, a HPLC-MS vizsgálatok során egy egyszeres quadrupole analizátorral azonosítottuk sikeresen az MTBC-re jellemző mikolsav típusokat, azonban a későbbiekben alkalmazott OrbiTrap analizátor érzékenyebb és szélesebb körű vizsgálatokat tett lehetővé.

A mikolsavak kimutatására alkalmas módszer fejlesztése során 5 különböző eluensösszetételt teszteltünk az egyszeres quadrupole készüléken, valamint 14-et az Orbitrap MS-en. Habár a kezdeti mérések során a kloroform alkalmazása előnyösnek tűnt az egyszeres quadrupole készüléken, a magas kloroform koncentráció negatívan befolyásolta a mikolsavak ionizációját az Orbitrap MS-en. Egy másik apoláris eluens összetevő, a heptán alkalmazásával növelni tudtuk a csúcsok intenzitását, továbbá ennek alkalmazásával sikeresen kifejlesztettünk egy, a mikolsavak és mikocerozátok elválasztását és egyidejű detektálását lehetővé tevő módszert is. Az egyszeres quadrupole készüléken egy eluens összetétellel, az Orbitrap MS-en pedig két eluens összetétellel optimalizáltuk az MS paramétereket a mikolsavak detektálásához. A mikocerozátok kimutatására szolgáló módszer kifejlesztése során egy eluens összetétel alkalmazásával finomhangoltuk az MS paramétereket. Az optimalizációs lépések során a magasabb kapilláris- és szárítógáz-hőmérséklet, valamint a megnövelt kapilláris- és S-lencse-

feszültség pozitív hatását figyeltük meg, a monitorozott csúcsok intenzitása az alkalmazott eluens összetételtől függetlenül nagyobb lett. A mikocerozátok kimutatására alkalmas módszer optimalizációja során az APCI-val szemben az ESI bizonyult a hatékonyabb ionforrásnak, ami az előbbivel szemben egy lágyabb ionizációt biztosító ionforrás (Yunker és mtsai 2014). A mikolsavak kinyerésére szolgáló mintaelőkészítési protokoll optimalizációja során az első lépésben történő elszappanosításra alkalmazott keverék KOH-koncentrációját teszteltük. A 20%-os és a 30%-os KOH-koncentráció esetén semmilyen különbséget sem tapasztaltunk, ugyanakkor 10% koncentráció esetén a mikolsavak kinyerésének hatékonysága csökkent. A KOH-koncentráció optimalizálása mellett 5 különböző oldószert/oldószerkeveréket hasonlítottunk össze. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy habár az extrakcióhoz szükség van apoláris oldószerekre, az apolárisabb oldószer alkalmazása nem jelent nagyobb hatékonyságot.

- Az optimalizált módszerek alkalmazása révén lehetőségünk nyílt egy lipidprofil könyvtár felépítésére mind a mikolsavak, mind a mikocerozátok esetében. Öt klinikai MTBC-izolátum (MTBC-1/2015, MTBC-254/2000, MTBC-3910/2014, MTBC-242/2000 és MTBC-1/8508/2014) és 5 db klinikai NTM-izolátum (*M. gordonae* 389/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. abscessus ssp. abscessus* 180/2018, *M. kansasii* 1959/2018 és *M. chelonae* 16/2018) mikolsav profilját határoztuk meg. Habár a NTM fajok mikolsav-profiljára vonatkozó irodalmi adatok nagyobb változatosságot mutatnak (Song és mtsai 2009, Shui és mtsai 2011, Szewczyk és mtsai 2013) és a mintánk elemszáma sem teszi lehetővé statisztikai következtetések levonását, eddigi vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy az általunk használt HPLC-MS módszerrel felvett lipidprofilok – a metoxi- és keto-mikolsavak alacsony előfordulási aránya révén – alkalmasak az MTBC- és a NTM-tagok elkülönítésére. Mindazonáltal ennek megerősítéséhez a könyvtár további bővítésére van szükség. A mikocerozát-könyvtár felépítéséhez 5 klinikai MTBC-izolátumot (MTBC-1/2015, MTBC-254/2000, MTBC-3910/2014, MTBC-242/2000 és MTBC-1/8508/2014), a *M. tuberculosis* és a *M. bovis* referenciatörzseit, valamint 8 db klinikai NTM-izolátumot (*M. avium* 16229/2018, *M. chelonae* 16/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. fortuitum* 3/2018, *M. gordonae* 389/2018, *M. abscessus sp abscessus* 180/2018, *M. chimaera* 619/2018 és *M. kansasii* 1959/2018) használtunk fel. Az 5 MTBC-izolátum közül 4 esetben, valamint a *M. tuberculosis* H37Rv referencia törzs esetében olyan mikocerozát-mintázatot tapasztaltunk, ami a szakirodalomban leírtak alapján a *M. tuberculosis*-nak felel meg (Redman és mtsai 2009, Lee és mtsai 2012), míg egy esetben a mikocerozátok mintázata *M. bovis*-hoz hasonló. A vizsgált NTM fajok közül egyedül a *M. kansasii* profilját határoztuk meg, mert a többi faj sejtfa nem tartalmaz mikocerozátokat. A vizsgált *M. avium* törzs esetén a C27 mikocerozáttal együtt eluálódó csúcsot detektáltunk, ami további vizsgálatokat tesz szükségessé. A könyvtárépítést követően – a megfigyelt profilok alapján – a pozitív tuberkulózis eseteket a kiugró C32, illetve az ezzel együtt előforduló magas C29 és C30 csúcsok detektálása jelentette a módszer tesztelése során.

- A kifejlesztett lipid biomarker alapú módszer hatékonyságát egy széles körben tanulmányozott múmiagyűjteményen, a Váci múmiák gyűjteményén vizsgáltuk. Mivel a mérések során minimális átszennyezést sem engedhettünk meg, és az apoláris oldószert is tartalmazó eluens összetétel ellenére a mikolsavak elúciója nem volt teljes, végül csak a mikocerozátokra kifejlesztett módszert teszteltük. Míg a vizsgáltba bevont mumifikálódott egyének közül 4 esetben a *M. tuberculosis*-ra jellemző mikocerozát-profilrt rögzítettünk, addig 2 másik egyén esetében a minták vizsgálata negatív eredményt

adott. Korábban az összes vizsgált egyén tbc-pozitívnek bizonyult az aDNS-vizsgálatok alapján, fontos azonban megjegyezni, hogy az általunk vizsgált minták nem azonosak a korábban használtakkal és a mintavétel helye erősen befolyásolhatja a vizsgálatok eredményét. A helyzet tisztázását segítené egy tbc-pozitív egyéneken végzett nagy mintaszámú vizsgálat, amely során számos mintavételi hely bevonásával történhetne a szűrés. A fent említett eltérés ellenére kijelenthető, hogy eredményeink további megerősítéssel és adatokkal szolgálnak a Váci múmiák között széles körben elterjedt tbc-fertőzésről. A kifejlesztett HPLC-ESI-MS módszer új utat nyit a mikocerozátok kimutatásában, mellyel a mikobakteriális fertőzések a történeti anyagokban is detektálhatók, magában foglalva nem csak a tuberkulotikus, de a leprás megbetegedéseket is, illetve azok koinfekciós megjelenését.

- Napjainkban a kivitelezéshez szükséges műszerezettség számos laboratóriumban megtalálható és további technikai fejlesztéssel az eljárás komplexitása és költsége tovább csökkenthető, míg érzékenysége növelhető. A módszer nagy előnye, hogy a célzott lipidek kimutatása nem igényel kémiai származékképzést, a szabad lipidek önmagukban detektálhatók. A későbbiekben tervezzük a módszer bővítését a C27-es mikolipenát bevonásával, ami a pentaacil-trehalózok *M. tuberculosis*-ra jellemző specifikus acil-összetevője (Donoghue és mtsai 2017).

- Bár módszerünkben egyelőre nem oldottuk meg a mikolsavak maradéktalan elúcióját, új eluensek és új megközelítési módok bevonásával egy átfogó, kombinált módszer létrehozása valószínűnek tűnik (Donoghue és mtsai 2017). A paleopatológiában elterjedtebben alkalmazott HPLC-FLD módszer érzékenysége és pontossága több ízben bizonyított (Hershkovitz és mtsai 2008, Donoghue és mtsai 2017), a diagnosztikus mikolsavprofil felvételéhez hosszadalmas származékképzési eljárás, valamint egymást követő RP- és NP-HPLC-eltávolítás szükséges. Ezzel ellentétben egy egyszerű HPLC-MS módszer alkalmazásával a diagnosztikus mikolsavak detektálása egy gyorsabb és egyszerűbb lehetőséget kínálhat.

Felhasznált irodalom

- Aufderheide, A.C., Rodríguez-Martín, C. (1998): *The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology*. Cambridge University Press: Cambridge, UK. pp. 118–141.
- 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., Coqueugnot, H., Dutour, O. (2015): Human tuberculosis predates domestication in ancient Syria. *Tuberculosis*, 95(Suppl. 1): S4–19. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.001)
- Barberis, I., Bragazzi, N.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: E9–12.
- Bhamidi, S., Scherman, M.S., Jones, V., Crick, D.C., Belisle, J.T., Brennan, P.J., McNeil, M.R. (2011): Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26): 23168–23177. DOI: [10.1074/jbc.M110.210534](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210534)
- Borowska-Struginska, B., Druszczyńska, M., Lorkiewicz, W., Szewczyk, R., Ządzińska, E. (2014): Mycolic acids as markers of osseous tuberculosis in the Neolithic skeleton from Kujawy region (central Poland). *Anthropological Review*, 77(2): 137–149. DOI: [10.2478/anre-2014-0012](https://doi.org/10.2478/anre-2014-0012)
- Brites, D., Gagneux, S. (2017): The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: Gagneux S. (Ed.) Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Epidemiology and Control. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1019. Springer, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-64371-7_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_1)

- Brites, D., Loiseau, C., Menardo, F., Borrell, S., Boniotti, M.B., Warren, R., Dippenaar, A., Parsons, S.D.C., Beisel, C., Behr, M.A., Fyfe, J.A., Coscolla, M. és Gagneux, S. (2018): A new phylogenetic framework for the animal-adapted Mycobacterium tuberculosis Complex. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2820. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02820](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820)
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T. (2002): A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6): 3684–3689. DOI: [10.1073/pnas.052548299](https://doi.org/10.1073/pnas.052548299)
- Chan, J.Z.-M., Sergeant, M.J., Lee, O.Y.-C., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Pap, I., Spigelman, M., Donoghue, H.D., Pallen, M.J. (2013): Metagenomic analysis of tuberculosis in a mummy. *New England Journal of Medicine*, 369: 289–290. DOI: [10.1056/NEJMc1302295](https://doi.org/10.1056/NEJMc1302295)
- Daniel, T.M. (2006): The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100: 1862–1870.
- Donoghue, H.D., Taylor, M.G., 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. DOI: [10.3390/d9040046](https://doi.org/10.3390/d9040046)
- Donoghue, H.D., Spigelman, M., Zias, J., Gernaey-Child, A.M., Minnikin, D.E. (1998): Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 265–269.
- Fletcher, H.A., Donoghue, H.D., Holton, J., Pap, I., Spigelman, M. (2003): Widespread occurrence of Mycobacterium tuberculosis DNA from 18th–19th century Hungarians. *American Journal of Physical Anthropology*, 120(2): 144–152. DOI: [10.1002/ajpa.10114](https://doi.org/10.1002/ajpa.10114)
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Power, J.J., Ahmed, A.M.S., Dixon, R.A., Roberts, C.A., Robertson, J.D., Nolan, J., Chamberlain, A. (1998): Detecting ancient tuberculosis. *Internet Archaeology*. http://intarch.ac.uk/journal/issue5/gernaey_index.html
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Dixon, R.A., Middleton, J.C., Roberts, C.A. (2001): Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 81(4): 259–265. DOI: [10.1054/tube.2001.0295](https://doi.org/10.1054/tube.2001.0295)
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V. (2005): Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLOS Pathogens*, 1(1): e5. DOI: [10.1371/journal.ppat.0010005](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005)
- Hershkovitz, I., Greenwald, C.M., Latimer, B., Jellema, L.M., Wish-Baratz, S., Eshed, V., Dutour, O., Rotschild, B.M. (2002): *Serpens endocrania symmetrica* (SES): a new term and a possible clue for identifying intrathoracic disease in skeletal populations. *American Journal of Physical Anthropology*, 118(3): 201–216. DOI: [10.1002/ajpa.10077](https://doi.org/10.1002/ajpa.10077)
- Hershkovitz, I., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Lee, O.Y.-C., Gernaey, A.M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C.L., Lemma, E., Bar-Gal, G.K., Spigelman, M. (2008): Detection and molecular characterization of 9000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PLOS ONE*, 3(10): e3426. DOI: [10.1371/journal.pone.0003426](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426)
- Kay, G.L., Sergeant, M.J., Zhou, Z., Chan, J.Z.-M., Millard, A., Quick, J., Szikossy, I., Pap, I., Spigelman, M., Loman, N.J., Pallen, M.J. (2015): Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe. *Nature Communications*, 6: 6717. DOI: [10.1038/ncomms7717](https://doi.org/10.1038/ncomms7717)
- Lee, O.Y.-C., Wu, H.H.T., Donoghue, H.D., Spigelman, M., Greenblatt, C.L., Bull, I.D., Rothschild, B.M., Martin, L.D., Minnikin, D.E., Besra, G.S. (2012): Mycobacterium tuberculosis complex lipid virulence factors preserved in the 17,000-year-old skeleton of an extinct bison, *Bison antiquus*. *PLOS ONE*, 7: e41923. DOI: [10.1371/journal.pone.0041923](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041923)
- Lehmann, J., Cheng, T.-Y., Aggarwal, A., Park, A.S., Zeiler, E., Raju, R.M., Akopian, T., Kandor, O., Bach, Sacchetti J.C., Sieber, S.A. (2018): An antibacterial β -lactone kills Mycobacterium tuberculosis by infiltrating mycolic acid biosynthesis. *Angewandte Chemie International edition in English*, 57(1): 348–353. DOI: [10.1002/ange.201709365](https://doi.org/10.1002/ange.201709365)

- Luna, L.H., Aranda, C.M., Santos, A.L., Donoghue, H.D., Lee, O.Y.-C., Wu, H.H.T., Besra, G.S., Minnikin, D.E., Llewellyn, G., Williams, C.M., Ratto, N. (2020): Oldest evidence of tuberculosis in Argentina. *Tuberculosis*, 125: 101995. DOI: [10.1016/j.tube.2020.101995](https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101995)
- Maczel, M. (2003): „On the traces of tuberculosis” *Diagnostic criteria of tuberculosis affection of the human skeleton and their application in Hungarian and French anthropological series*. PhD thesis. University of La Méditerranée, Aix Marseille II Faculty of Medicine, Marseille, France, University of Szeged, Faculty of Science, Szeged, Hungary.
- Marcsik, A., Molnár, E., Ósz, B., Donoghue, H.D., Zink, A., Pálfi, Gy. (2009): Adatok a lepra, tuberculosis és syphilis magyarországi paleopatológiájához. *Folia Anthropologica*, 8: 5–34.
- Marcsik, A., Szentgyörgyi, R., Gyetvai, A., Finnegan, M., Pálfi, Gy. (1999): Probable Pott’s paraplegia from the 7th–8th century AD. In: Pálfi, Gy., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (Eds) *Tuberculosis: past and present*. TB Foundation: Szeged, Hungary, Golden Book Publisher, Budapest, Hungary. pp. 331–336.
- Mariotti, V., Zuppello, M., Pedrosi, M.E., Bettuzzi, M., Brancaccio, R., Peccenini, E., Morigi, M.P., Belcastro, M.G. (2015): Skeletal evidence of tuberculosis in a modern identified human skeletal collection. *AJBA*, 157(3): 389–401. DOI: [10.1002/ajpa.22727](https://doi.org/10.1002/ajpa.22727)
- Masson, M., Bereczki, Zs., Molnár, E., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Lee, O.Y.-C., Wu, H.H.T., Besra, G.S., Bull, I.D., Pálfi, Gy. (2015): 7000-year-old tuberculosis cases from Hungary – Osteological and biomolecular evidence. *Tuberculosis*, 95(Suppl. 1): S13–17. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.007](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.007)
- Minnikin, D.E., Bolton, R.C., Hartmann, S., Besra, G.S., Jenkins, P.A., Mallet, A.I., Wilkins, E., Lawson, A.M., Ridell, M. (1993): An integrated procedure for the direct detection of characteristic lipids in tuberculosis patients. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 73(Suppl. 1): 13–24.
- Minnikin, D.E., Brennan, P.J. (2020): Lipids of Clinically Significant Mycobacteria. In: Goldfine, H. (Ed.) *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils and Lipids*. Springer, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-72473-7_7-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7_7-1)
- Minnikin, D.E., Lee, O.Y.-C., Wu, H.H.T., Nataraj, V., Donoghue, H.D., Ridell, M., Watanabe, M., Alderwick, L., Bhatt, A., Besra, G.S. (2015): Pathophysiological implications of cell envelope structure of Mycobacterium tuberculosis and related taxa. In: Ribon, W. (Ed.) *Tuberculosis – Expanding Knowledge*. InTech, Open Access Publisher. pp. 145–175. DOI: [10.5772/59585](https://doi.org/10.5772/59585)
- Molnár, E., Donoghue, H.D., Lee, O.Y.-C., Wu, H.H.T., Besra, G.S., Minnikin, D.E., Bull, I.D., Llewellyn, G., Williams, C.M., Spekker, O., Pálfi, Gy. (2015): Morphological and biomolecular evidence for tuberculosis in 8th century AD skeletons from Bélmegeyer-Csömöki domb, Hungary. *Tuberculosis*, 95(Suppl. 1): S35–41. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.032](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.032)
- Ortner, D.J. (2003): Infectious diseases: tuberculosis and leprosy. In: Ortner, D.J. (Ed.) *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp. 227–271.
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M. (2016): Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2: 16076. DOI: [10.1038/nrdp.2016.76](https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76)
- Paja, L., Coqueugnot, H., Dutour, O., Willmon, R., Farkas, Gy.L., Palkó, A., Pálfi, Gy. (2015): Knee ankyloses associated with tuberculosis from the Medieval Hungary – Differential diagnosis based on medical imaging techniques. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, 25(3): 352–360. DOI: [10.1002/oa.2284](https://doi.org/10.1002/oa.2284)
- Pálfi, Gy., Bereczki, Zs., Ortner, D.J., Dutour, O. (2012): Juvenile cases of skeletal tuberculosis from the Terry Anatomical Collection (Smithsonian Institution, Washington, D.C., USA). *Acta Biologica Szegediensis*, 56(1): 1–12.
- Pálfi, Gy., Maixner, F., Maczel, M., Molnár, E., Pósa, A., Kristóf, L.A., Marcsik, A., Balázs, J., Masson M., Paja, L., Dutour, O. (2015): Unusual spinal tuberculosis in an Avar Age skeleton (Csongrád-Felgyő, Ürmös-tanya, Hungary): A morphological and biomolecular study. *Tuberculosis*, 95(Suppl1): S29–34. DOI: [10.1016/j.tube.2015.02.033](https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.033)

- Pálfi, Gy., Marcsik, A. (1999): Palaeoepidemiological data of tuberculosis in Hungary. In: Pálfi, Gy., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book, TB Foundation, Budapest, Szeged. pp. 531–540.
- Pálfi, Gy., Molnár, E. (2009): The Paleopathology of specific infectious diseases from South-eastern Hungary: a brief overview. *Acta Biologica Szegediensis*, 53(2): 111–116.
- Pap, I., Józsa, L., Repa, I., Bajzik, G., Lakhani, S.R., Donoghue, H.D., Spigelman, M. (1999): 18–19th century tuberculosis in naturally mummified individuals (Vác, Hungary). In: Pálfi, Gy., Dutour, O., Deák, J., Hutás, I. (Eds) *Tuberculosis: Past and Present*. Golden Book, TB Foundation, Budapest, Szeged. pp. 419–428.
- Pap, I., Pálfi, Gy., Molnár, E., Karlinger, K., Kovács, K.B., Korom, Cs., Schultz, M., Schmidt-Schultz, T.H., Spigelman, M., Donoghue, H.D., Kustár, Á., Szikossy, I. (2017): A tuberkulózis előfordulása egy XVIII. századi váci családban. *Anthropológiai Közlemények*, 58: 37–47. DOI: [10.20330/AnthropKozl.2017.58.37](https://doi.org/10.20330/AnthropKozl.2017.58.37)
- Redman, J.E., Shaw, M.J., Malle, A.I., Santos, A.L., Roberts, C.A., Gernaey, A.M., Minnikin, D.E. (2009): Mycobactericidal acid biomarkers for the diagnosis of tuberculosis in the Coimbra skeletal collection. *Tuberculosis*, 89(4): 267–277. DOI: [10.1016/j.tube.2009.04.001](https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.04.001)
- Riojas, M.A., McGough, K.J., Rider-Riojas, C., Rastogi, N., Hazbón, M.H. (2018): Phylogenomic analysis of the species of the Mycobacterium tuberculosis complex demonstrates that Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae, Mycobacterium microti and Mycobacterium pinnipedii are later heterotypic synonyms of Mycobacterium tuberculosis. *IJSEM*, 68(1): 324–332. DOI: [10.1099/ijsem.0.002507](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002507)
- Roberts, C.A., Lucy, D., Manchester, K. (1994): Inflammatory lesions of ribs: an analysis of the Terry Collection. *AJPA*, 95(2): 169–182. DOI: [10.1002/ajpa.1330950205](https://doi.org/10.1002/ajpa.1330950205)
- Santos, A.L., Roberts, C.A. (2001): A picture of tuberculosis in young Portuguese people in the early 20th century: a multidisciplinary study of the skeletal and historical evidence. *American Journal of Physical Anthropology*, 115(1): 38–49. DOI: [10.1002/ajpa.1054](https://doi.org/10.1002/ajpa.1054)
- Santos, A.L., Roberts, C.A. (2006): Anatomy of a serial killer. *American Journal of Physical Anthropology*, 130(1): 38–49. DOI: [10.1002/ajpa.20160](https://doi.org/10.1002/ajpa.20160)
- Shui, G., Bendt, A.K., Jappar, I.A., Lim, H.M., Laneelle, M., Hervé, M., Via, L.E., Chua, G.H., Bratschi, M.W., Rahim, S.Z.Z., Wenk, M.R. (2012): Mycolic acids as diagnostic markers for tuberculosis case detection in humans and drug efficacy in mice. *European Molecular Biology Organization, Molecular Medicine*, 4: 27–37. DOI: [10.1002/emmm.201100185](https://doi.org/10.1002/emmm.201100185)
- Song, S.H., Park, K.U., Lee, J.H., Kim, E.C., Kim, J.Q., Song, J. (2009): Electrospray ionisation-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *Journal of Microbiological Methods*, 77(2): 165–177. DOI: [10.1016/j.mimet.2009.01.023](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.023)
- Spekker, O. (2018): Evaluation of endocranial bony changes in relation to tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (Washington, DC, USA). PhD Thesis. University of Szeged, Faculty of Science and Informatics, Szeged, Hungary.
- Spekker, O., Hunt, D.R., Paja, L., Molnár, E., Pálfi, Gy., Schultz, M. (2020a): Tracking down the White Plague: The skeletal evidence of tuberculous meningitis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection. *PLOS ONE*, 15(3): e0230418. DOI: [10.1371/journal.pone.0230418](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230418)
- Spekker, O., Hunt, D.R., Váradi, O.A., Berthon, W., Molnár, E., Pálfi, Gy. (2018): Rare manifestations of spinal tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28: 343–353. DOI: [10.1002/oa.2658](https://doi.org/10.1002/oa.2658)
- Spekker, O., Schultz, M., Paja, L., Váradi, O.A., Molnár, E., Pálfi, Gy., Hunt, D.R. (2020b): Tracking down the White Plague. Chapter two. *PLOS ONE*, 15(9): e0238444. DOI: [10.1371/journal.pone.0238444](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238444)
- Szewczyk, R., Kowalsky, K., Janiszewska-Drobinska, B., Druszczyńska, M. (2013): Rapid method for Mycobacterium tuberculosis identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76: 298–305. DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.025](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.025)

- Szikossy, I., Bernert, Zs., Pap, I. (1997): Anthropological investigation of the 18th–19th century ossuary of the Dominican Church, Vác, Hungary. *Acta Biologica Szegediensis*, 42: 145–150
- Takayama, K., Wang, C., Besra, G.S. (2005): Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1): 81–101. DOI: [10.1128/CMR.18.1.81-101.2005](https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.81-101.2005)
- World Health Organization (2020): *TB disease burden*. In: *Global tuberculosis report 2020*. WHO: Geneva, Italy. pp. 23–70.
- Yunker, L.P., Stoddard, R.L., McIndoe, J.S. (2014): Practical approaches to the ESI-MS analysis of catalytic reactions. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(1): 1–8. DOI: [10.1002/jms.3303](https://doi.org/10.1002/jms.3303)

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

- Váradi, O.A., Rakk, D., Spekker, O., Terhes, G., Urbán, E., Berthon, W., Pap, I., Szikossy, I., Maixner, F., Zink, A., Vágvölgyi, Cs., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Szekeres, A., Pálfi, Gy. (2021): Verification of tuberculosis infection among Vác mummies (18th century CE, Hungary) based on lipid biomarker profiling with a new HPLC-HESI-MS approach. *Tuberculosis*, 126: 102037. DOI: [10.1016/j.tube.2020.102037](https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102037)
- Spekker, O., Hunt, D.R., Váradi, O.A., Berthon, W., Molnár, E., Pálfi, Gy. (2018): Rare manifestations of spinal tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA). *International Journal of Osteoarchaeology*, 28(3): 343–353. DOI: [10.1002/oa.2658](https://doi.org/10.1002/oa.2658)
- Spekker, O., Schultz, M., Paja, L., Váradi, O.A., Molnár, E., Pálfi, Gy., Hunt, D.R. (2020): Tracking down the White Plague. Chapter two: The role of endocranial abnormal blood vessel impressions and periosteal appositions in the paleopathological diagnosis of tuberculous meningitis. *PLOS ONE*, 15(9): e0238444. DOI: [10.1371/journal.pone.0238444](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238444)

A doktori értekezéshez kapcsolódó további publikációk

- Váradi, O.A., Kecskeméti, A., Spekker, O., Molnár, E., Bereczki, Zs., Szekeres, A., Vágvölgyi, Cs., Pálfi, Gy. (2016): Cases of tuberculosis infection verified by lipid biomarker analysis in Hungarian archaeological samples. In: Gál, Sz.S. (Szerk.) *The talking dead. New results from Central and Eastern European osteoarchaeology. Proceedings of the First International Conference of the Török Aurél Anthropological Association from Targu Mures*. Mega Publishing House, Kolozsvár, Románia, 129–142.
- Váradi, O.A., Szikossy, I., Spekker, O., Rakk, D., Terhes, G., Urbán, E., Berthon, W., Pap, I., Maixner, F., Zink, A., Vágvölgy, Cs., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Pálfi, Gy., Szekeres, A. (2020): Lipid biomarker-based verification of TB infection in mother's and daughter's mummified human remains (Vác Mummy Collection, 18th century, CE, Hungary). *Acta Biologica Szegediensis*, 64(2): 99–109. DOI: [10.14232/abs.2020.2.99-109](https://doi.org/10.14232/abs.2020.2.99-109)

Levelezési cím: Váradi Orsolya Anna
Mailing address: Embertani Tanszék
Szegedi Tudományegyetem
Közép fasor 52.
6726 Szeged
Hungary
varadi.orsolya.90@gmail.com