

JAN KOŁODYŃSKI<sup>1</sup>, STANISŁAW JANKOWSKI<sup>2</sup>

## Paleomicrobiology – a New Branch of Science

### Paleomikrobiologia – nowa dziedzina nauki

<sup>1</sup> Instytut Genetyki i Mikrobiologii UW we Wrocławiu

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej AM we Wrocławiu

#### Streszczenie

Molekularne techniki pozwalają na identyfikację kwasu nukleinowego drobnoustrojów chorobotwórczych, występującego w archeologicznych szczątkach ludzi i zwierząt. Przedstawione w pracy przykłady dowodzą, że współczesna nauka uzyskała możliwość wykrycia czynników etiologicznych niektórych chorób zakaźnych w dawno wymarłych populacjach (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 1, 121–125).

**Słowa kluczowe:** dawne DNA, gruźlica, mumia, paleomikrobiologia.

#### Abstract

Molecular techniques allow identification of a nucleic acid of infectious microorganisms present in fossil remains of men and animals. The cases presented prove that the contemporary science has acquired a possibility of extinct populations (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 1, 121–125).

**Key words:** ancient DNA, tuberculosis, mummy, paleomicrobiology.

Zainteresowanie kopalnymi szczątkami zwierząt i ludzi doprowadziło do rozwoju nowej dyscypliny medycznej nazwanej paleopatologią. Mała wiedza o chorobach naszych przodków, czerpana jedynie z nielicznych zachowanych źródeł pisanych czy obiektów artystycznych, mogła zostać poddana weryfikacji na podstawie specjalistycznej interpretacji zmian chorobowych widocznych na kościach, zębach lub zmumifikowanych tkankach miękkich.

Dopiero sukcesy paleontologii [1, 2] opierające się na badaniach DNA, który występuje w historycznych i prehistorycznych szczątkach ludzi, zwierząt i roślin, umożliwiły podjęcie poszukiwań śladów chorobotwórczych drobnoustrojów. Po raz pierwszy od ponad dwu wieków istnienia (do niedawna tylko opisowej) paleopatologii wykorzystano najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej w badaniu dawnych chorób człowieka.

### Identyfikacja molekularna

Wykorzystanie metod amplifikacji kwasów nukleinowych, a zwłaszcza reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), umożliwia uzyskanie w laborato-

rium dużej ilości DNA nawet z pojedynczego genu. Taki DNA można zidentyfikować przez oszacowanie stopnia podobieństwa między badanym fragmentem a jego odpowiednikiem w elektronicznych bazach danych lub np. metodą hybrydyzacji ze specyficznymi sondami zawierającymi współczesne sekwencje charakterystyczne dla poszukiwanych mikroorganizmów. Warunkiem jednak *sine qua non* jest przetrwanie w badanych szczątkach choćby śladowej ilości kwasów nukleinowych pochodzących z zakażających je patogenów [3, 4].

DNA jest niestabilną cząsteczką, która, zwykle krótko po zgonie ulega szybkiej i nieodwracalnej degradacji, postępującej w miarę upływu czasu. Silne rozdrobnienie (zwykle odnajduje się odcinki nieprzekraczające 200 bp) i niestabilność cząsteczek DNA utrudnia amplifikację i może prowadzić do powstawania nieswoistych lub błędnych sekwencji. W związku z tym uzyskanie wiarygodnych wyników wymaga starannego doboru systemu PCR, który zapewni możliwość prawidłowej identyfikacji sekwencji charakterystycznej dla poszukiwanego patogenu [4, 5].

W przypadku pozytywnego wyniku badań po-

zostaje udowodnić, że mamy do czynienia z rzecząwiście z dawnym DNA, a nie współczesnym zanieczyszczeniem. Należy podkreślić, że niespełniające tego warunku niektóre publikacje, np. rzekoma identyfikacja DNA dinozaura [6], skutecznie podważają zaufanie do niewątpliwych osiągnięć molekularnej paleologii. Dlatego każde badanie dawnego DNA wymaga przestrzegania rygorystycznych zasad kontrolnych, a uzyskane wyniki powinny być udostępnione dopiero po ich potwierdzeniu przez inne, niezależne i wyspecjalizowane ośrodki naukowe [7, 8].

## Dawne DNA drobnoustrojów chorobotwórczych

Pierwsza próba identyfikacji dawnego bakteriynego DNA dotyczyła prątków gruźlicy. Nie był to przypadek, gdyż gruba, silnie hydrofobowa, bogata w woski i lipidy ściana komórkowa bakterii skutecznie chroni DNA przed działaniem enzymów litycznych uwalnianych z komórek gospodarza bezpośrednio po jego śmierci, a także później przed skutkami długotrwałych, destrukcyjnych oddziaływań czynników środowiskowych. Dzięki wysokiej zawartości guaniny i cytozyny DNA *Mycobacterium* wykazuje większą niż u innych bakterii stabilność. U ludzi chorujących na gruźlicę kości i stawów powstają trwałe zniekształcenia i zaburzenia wzrostowe wywołane nieodwracalnymi zmianami anatomicznymi i fizjologicznymi. Stwierdzenie występowania podobnych zmian kostnych istotnie zwiększa prawdopodobieństwo odnalezienia w nich DNA prątków gruźlicy [5, 9].

Można przyjąć, że nowa gałąź wiedzy – paleomikrobiologia narodziła się wraz z opublikowaniem w 1993 r. przez Spigelman i Lemma [10] wyników potwierdzających obecność DNA prątków gruźlicy w liczących 300–1400 lat kostnych szczątkach ludzkich. W badaniach wykorzystano wysoko konserwatywną sekwencję insercyjną IS6110, występującą w wielu kopiach w genomie *M. tuberculosis*. W 4 z 11 próbek wybranych do badań na podstawie charakterystycznych zmian kostnych wykazano obecność poszukiwanego DNA.

Przydatność PCR w identyfikacji dawnego DNA potwierdziły, opublikowane niewiele później, wyniki badań Salo et al. [11], którzy, wykorzystując identyczny starter IS6110, wykazali obecności prątków gruźlicy w tkance płucnej peruwiańskiej mumii sprzed 1000 lat. Uzyskany przez nich wynik przyczynił się do rozstrzygnięcia dotychczas jałowego sporu epidemiologów – „czy

pojawienie się gruźlicy na kontynencie amerykańskim było czy nie było skutkiem, rozpoczętej w XV wieku, kolonizacji Nowego Świata przez Europejczyków?”

Wprawdzie licząca 123 pary zasad sekwencja IS6110 nie pozwala na zróżnicowanie ściśle spokrewnionych ze sobą gatunków prątków z tzw. grupy *M. tuberculosis* (*MTB complex*), do której zaliczono *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* i *M. canettii*, umożliwia jednak odróżnienie tych chorobotwórczych dla człowieka prątków od saprofitycznych gatunków występujących w środowisku, takich jak: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* i *M. chelonai*. Wielokrotnie potwierdzona swoistość i czułość metody identyfikacji dawnego DNA prątków *MTB complex* za pomocą sekwencji insercyjnej IS6110 umożliwiła jego identyfikację także w próbkach niewykazujących charakterystycznych dla gruźlicy zmian patomorfologicznych. Po raz pierwszy uzyskano nie tylko możliwość ustalenia rzeczywistej częstości występowania gruźlicy w wymarłych populacjach ludzkich, ale i oceny jej wpływu na rozwój historycznych społeczeństw co oznaczało niekwestionowane narodziny molekularnej paleoepidemiologii. Nowe perspektywy nie ograniczają się do porównawczej epidemiologii gruźlicy, ale, jak piszą Zink et al. [5], umożliwiają wgląd w ewolucję prątków i prześledzenie skutków ewolucyjnych oddziaływań między patogenem a jego gospodarzem, co może powiększyć wiedzę o przenoszeniu i szerzeniu się chorób zakaźnych.

Na podstawie wyników prac poświęconych paleoepidemiologii gruźlicy udało się udowodnić, że ta tak stara jak ludzkość choroba występowała zarówno wśród egipskich fellachów, jak i faraonów [12–14], wśród średniowiecznych mieszkańców Europy [15–17] oraz przedkolumbijskich mieszkańców Południowej i Północnej Ameryki [11, 18].

Dalszy postęp badań nad filogenezą i ewolucją prątków gruźlicy był jednak uzależniony od wprowadzenia nowych metod. Szczególne przydatna okazała się spoligotypia, która na podstawie różnic w regionach DR (*direct repeat*) DNA umożliwiła zróżnicowanie gatunkowe wśród prątków tworzących *MTB complex* [19]. Dodatkową jej zaletą jest możliwość porównywania nawet bardzo krótkich odcinków, zwykle silnie zdegradowanego dawnego DNA, co warunkuje podjęcie prób jego poszukiwań w jeszcze starszych materiałach [5].

Czy, dysponując nowymi molekularnymi metodami, można potwierdzić lub wykluczyć powszechnie akceptowaną hipotezę, że źródłem ludzkiej gruźlicy były prątki *M. bovis* pochodzące od udomowionego przed 10000–15000 laty bydła?

W kościach śródstopia bizona, którego wiek

określono na około 17 870 lat przed naszą erą na podstawie stratygrafii i datowania  $C^{14}$ , wykazano ślady gruźliczopodobnej infekcji i stwierdzono obecność DNA, który różnił się od DNA *M. bovis* oraz innych gatunków prątków. Podobnie wyniki spoligotypii DNA prątków z dawnych szczątków ludzkich z Europy [21] i z Egiptu nie wykazały obecności DNA charakterystycznego dla *M. bovis* [5]. W tych ostatnich znaleziono natomiast fragmenty DNA charakterystycznego dla *M. africanum* i *M. tuberculosis*. Obecność *M. africanum* w najstarszych z badanych próbek (2050–1650 r. p.n.e.) wydaje się potwierdzać teorię, że ten gatunek może być prekursorem chorobotwórczych prątków z grupy *MTB complex*, a współczesne gatunki, takie jak *M. tuberculosis* i *M. bovis* rozwijały się niezależnie od siebie [5].

Jak widać, filogeneza prątków jest nadal skomplikowanym problemem, a przekonywające wyjaśnienie historii molekularnej ewolucji, rozwoju i rozprzestrzeniania się gruźlicy wymaga dalszych molekularnych badań wiarygodnych archeologicznych materiałów. Coraz więcej danych potwierdza hipotezę, że brak molekularnego zróżnicowania współczesnych chorobotwórczych szczepów *M. tuberculosis* to wynik znanego w ewolucji gatunków zjawiska „przejścia przez szybką butelkę”, które nastąpiło prawdopodobnie 15 000–20 000 lat temu [22]. Nie wiadomo jednak, czy szczepy *M. tuberculosis* zidentyfikowane w przedkolumbijskiej Ameryce i w innych częściach świata różnią się od zjadliwych, epidemicznych szczepów europejskich [9]. Potwierdzone niedawno możliwości odróżnienia osobników z aktywną i chroniczną postacią gruźlicy na podstawie badań molekularnych umożliwiają analizę wrażliwości gospodarza na zakażenie [23]. Identyfikacja wyznaczników zjadliwości prątków z okresu przedantybiotykowego pozwala na ich porównanie ze współczesnymi szczepami, co paradoksalnie może przyczynić się do opracowania nowych metod ich skutecznego zwalczania [9].

Podobnym zainteresowaniem cieszą się prątki trądu *Mycobacterium leprae*. Jak wiadomo z przekazów historycznych, rzeczywiste lub domniemane ofiary trądu chowano na odrębnych cmentarzach przy leprozoriach. Charakterystyczna dla prątków wytrzymałość na oddziaływanie czynników zewnętrznych i dokonana przez naszych przodków „selekcja materiału” to okoliczności bardzo zwiększające prawdopodobieństwo powodzenia prowadzonych badań. W 1994 r. do identyfikacji DNA *M. leprae* Rafi et al. wykorzystali z powodzeniem sondy RLEP zawierające charakterystyczne fragmenty DNA *M. leprae* [24]. Przydatność metody potwierdziły badania średnio-wiecznych szczątków kostnych z Węgier i Nie-

mieć [25] oraz Szkocji [26]. Dodatkowym motywem, ważnym także dla współczesnych epidemiologów, jest pojawienie się możliwości potwierdzenia hipotezy, która za przyczynę nagłego zaniku trądu na obszarze Europy w XVII w. uznaje szybkie rozprzestrzenianie się gruźlicy.

## Inne drobnoustroje

Identyfikacja DNA *Yersinia pestis* w materiale z zębów pochodzących z XIV w. domniemanych ofiar „czarnej śmierci” z Montpellier [27, 28] miała ostatecznie rozstrzygnąć wątpliwości na temat przyczyny tej największej w historii Europy zarazy, a stała się jedynie zarzewiem burzliwego sporu [29, 30]. Przedstawione przez Gilbert et al. [31] wyniki prac dwu niezależnych zespołów badawczych, powołanych specjalnie w celu wyjaśnienia tego fascynującego zagadnienia, nie potwierdziły uzyskanych we Francji rezultatów. Autorzy wskazują na małe prawdopodobieństwo przetrwania w materiale kostnym DNA bakterii powodujących szybki uogólniony proces chorobowy oraz trudności w odróżnieniu go od zanieczyszczeń pochodzących z otoczenia.

Nie oznacza to jednak, że peleoepidemiologia pozostaje marginalną dziedziną wiedzy ograniczającą się do badań prątków. Coraz częściej wyniki prac eksperymentalnych potwierdzają tezę, że o stopniu przetrwania dawnego DNA w materiałach archeologicznych decydują warunki otoczenia. Na przykład badania 16S rDNA uzyskanego z próbek mumii egipskiego dziecka wskazują na jego septyczne zakażenie spowodowane przez *Escherichia coli* [32], a identyfikacja DNA *Corynebacterium* spp. w próbce z zęba wskazuje na możliwość istnienia błonicy w okresie dynastycznym w Egipcie [33].

Z próbek tkanki płucnej trzech ofiar pandemii grypy z 1918 r., pochowanych w wiecznej zmarlinie na Alasce, i z przechowywanych w laboratoriach, zakonserwowanych w formalinie narządów, uzyskano RNA poszukiwanego wirusa [34, 35]. Ustalenie pełnej sekwencji genu odpowiedzialnego za syntezę swoistej hemaglutyniny umożliwiło przeprowadzenie porównawczych badań molekularnych w celu wyjaśnienia genetycznych podstaw niezwyklej zjadliwości wirusów z 1918 r. oraz filogenetycznych porównań ze znanymi wariantami ludzkiej i ptasiej grypy [36]. Nie trzeba nikogo przekonywać do znaczenia podobnych badań, gdy coraz częściej pojawiają się wirusy łatwo pokonujące międzygatunkowe bariery (np. wirusy gorączki krwotocznej lub koronawirusy ostrej niewydolności oddechowej – SARS).

Duże zainteresowanie wzbudziła molekularna

identyfikacja poprzednio nieznanego szczepu ludzkiego wirusa białaczki T-komórkowej (HTLV-I) w próbkach pochodzących z andyjskiej mumii sprzed 1500 lat [37]. W zmumifikowanych zwłokach zmarłej w 1568 r. Marii Aragońskiej, oprócz HPV 18, stwierdzono obecność DNA prawdopodobnie dotychczas nieznanego papillomawirusa [38].

Warto przypomnieć, że najnowsze molekularne metody pozwalające na identyfikację pasożytów, nie tylko pierwotniaków, są z powodzeniem wykorzystywane w rozwijającej się paleoparazytologii [39].

Prawdopodobnie nie uda się jednak wyjaśnić przyczyn słynnych historycznych epidemii, takich jak biblijna zaraza zesłana na Filistynów lub plaga ateńska z 430 r. p.n.e.

Zwiększająca się liczba prac wykorzystujących metody molekularne do identyfikacji dawnych patogenów może:

- wzbogacić stan współczesnej wiedzy medycznej na temat pochodzenia i zmienności drobnoustrojów chorobotwórczych;
- umożliwić badania historii chorób zakaź-

nych powodowanych przez wirusy, bakterie i pasożyty;

- przyczynić się do wyjaśnienia istoty rozwijających się podczas ewolucji współzależności między patogenem a jego gospodarzem;

- pozwolić na śledzenie dróg rozprzestrzeniania się groźnych chorób zakaźnych w ludzkiej populacji;

- umożliwić przeprowadzenie porównawczych badań naturalnej mikroflory organizmu człowieka od czasów prehistorycznych do współczesności;

- dostarczyć narzędzi pozwalających na obserwację zmienności materiału genetycznego i jej wpływu na ewolucję współczesnych drobnoustrojów.

Wiele nadziei wzbudza możliwość porównania genomów dawnych patogenów, które nie były poddane presji selekcyjnej współczesnej lekoterapii, z genomami obecnie żyjących gatunków drobnoustrojów chorobotwórczych, co być może przyczyni się do opracowania nowych, bardziej skutecznych metod ich zwalczania.

## Piśmiennictwo

- [1] **Pääbo S:** Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 1939–1943.
- [2] **Marota I, Rollo F:** Molecular paleontology. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59, 97–111.
- [3] **Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroğlu M, Pääbo S:** DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 1996, 24, 1304–1307.
- [4] **Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S:** Ancient DNA. *Nat Rev Gen* 2001, 2, 353–359.
- [5] **Zink AR, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG:** Molecular analysis of ancient microbial infections. *FEMS Microbiol Let* 2002, 213, 141–147.
- [6] **Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M:** DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* 1994, 266, 1229–1232.
- [7] **Cooper A, Poinar HN:** Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 2000, 289, 1139.
- [8] **Poinar HN:** The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *Int Congress Ser* 2003, 1239, 575–579.
- [9] **Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Mathenson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR:** Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis* 2004, 4, 584–592.
- [10] **Spigelman M, Lemma E:** The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *Int J Osteoarcheol* 1993, 3, 137–143.
- [11] **Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA:** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Nat Acad Sci* 1994, 91, 2091–2096.
- [12] **Crubezy E, Ludes B, Poveda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D:** Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *CR Acad Sci III* 1998, 321, 941–951.
- [13] **Zink AR, Haas CJ, Reischl U, Szeimies U, Nerlich AG:** Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J Med Microbiol* 2001, 50, 355–366.
- [14] **Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG:** Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol Infect* 2003, 130, 239–249.
- [15] **Haas CJ, Zink A, Molnar E, Szeimies U, Reischl U, Marcsik A, Ardagna Y, Dutour O, Palfi G, Nerlich AG:** Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *Am J Phys Anthropol* 2000, 113, 293–304.
- [16] **Faerman M, Jankauskas R:** Paleopathological and molecular evidence of human bone tuberculosis in Iron Age Lithuania. *Anthropol Anz* 2000, 58, 57–62.
- [17] **Mays S, Taylor GM, Legge AJ, Young DB, Turner-Walker G:** Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in an medieval skeletal collection from England. *Am J Phys Anthropol* 2001, 114, 298–311.
- [18] **Gomez i Prat J, de Souza SMFM:** Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2003, 98 (Suppl.1), 151–159.

- [19] **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden JDA:** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997, 35, 907–914.
- [20] **Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D:** *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17 000 years before the present. *Clin Infect Dis* 2001, 33, 305–311.
- [21] **Mays S, Taylor GM, Legge AJ, Young DB, Turner-Walker G:** Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in a medieval skeletal collection from England. *Am J Phys Anthropol* 2001, 114, 298–311.
- [22] **Kapur V, Whittam TS, Musser JM:** Is *Mycobacterium tuberculosis* 15 000 years old? *J Inf Dis* 1994, 170, 1348–1349.
- [23] **Fletcher HA, Donoghue HD, Holton J, Pap I, Spigelman M:** Widespread occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from 18<sup>th</sup>–19<sup>th</sup> century Hungarians. *Am J Phys Anthropol* 2003, 120, 144–152.
- [24] **Rafi A, Spigelman M, Stanford J, Lemma E, Donoghue H, Zias J:** DNA of *Mycobacterium leprae* detected in ancient bone. *Int J Osteoarchaeol* 1994, 4, 287–290.
- [25] **Haas CJ, Zink A, Palfi G, Szeimies U, Nerlich AG:** Detection of leprosy in ancient human skeletal remains by molecular identification of *Mycobacterium leprae*. *Am J Clin Pathol* 2000, 114, 428–436.
- [26] **Taylor MG, Widdison S, Brown IN, Young D, Molleson T:** A mediaeval case of lepromatous leprosy from 13–14<sup>th</sup> century Orkney, Scotland. *J Archeolog Sci* 2000, 27, 1133–1138.
- [27] **Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D:** Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci* 2000, 95, 12637–12640.
- [28] **Raoult D, Aboudharam G, Crubezy E, Larrouy G, Ludes B, Drancourt M:** Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc Natl Acad Sci* 2000, 97, 12800–12803.
- [29] **Wood J, de Witte-Avina S:** Was the Black Death yersinial plague? *Lancet Infect Dis* 2003, 3, 327.
- [30] **Prentice MB, Gilbert T, Cooper A:** Was the Black Death caused by *Yersinia pestis*? *Lancet Infect Dis* 2004, 4, 72.
- [31] **Gilbert MTP, Cuccui J, White W, Lynnerup N, Titball RW, Cooper A, Prentice MB:** Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims. *Microbiol* 2004, 150, 341–354.
- [32] **Zink A, Reischl U, Wolf H, Nerlich A:** Molecular evidence for bacteremia by gastrointestinal pathogenic bacteria in an infant mummy from ancient Egypt. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124, 1614–1618.
- [33] **Zink A, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG, Miller RL:** Corynebacterium in ancient Egypt. *Med Hist* 2001, 45, 267–272.
- [34] **Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG:** Initial characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus. *Science* 1997, 275, 1793–1796.
- [35] **Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK:** Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci* 1999, 96, 1651–1656.
- [36] **Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Fanning TG, Zheng H, Salvatore M, Perdue ML, Swayne DE, Garcia-Sastre A, Palese P, Taubenberger JK:** Sequence of the 1918 pandemic influenza virus non-structural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci* 2001, 98, 2746–2751.
- [37] **Li HC, Fujiyoshi T, Lou H, Yashiki S, Sonoda S, Cartier L, Nunez I, Munoz I, Horai S, Tajima K:** The presence of ancient human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA in an Andean mummy. *Nat Med* 1999, 5, 1428–1432.
- [38] **Feoli-Fonsenca JC, Oligny LL, Filion M, Simard P, Russo PA, Yotov WV:** A putative novel human papilloma-virus identified by PCR-DS. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 250, 63–67.
- [39] **Araujo A, Ferreira LF:** Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, 95 (Suppl. 1), 89–93.

### Adres do korespondencji:

Jan Kołodyński  
Zakład Mikrobiologii Ogólnej  
Instytut Genetyki i Mikrobiologii UW  
ul. Przybyszewskiego 63/77  
51-114 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 9.05.2005 r.  
Po recenzji: 2.06.2005 r.  
Zaakceptowano do druku: 8.06.2005 r.

Received: 9.05.2005  
Revised: 2.06.2005  
Accepted: 8.06.2005