

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**STŘEVNÍ PARAZITI V ARCHEOLOGICKÉM MATERIÁLU
ZE STŘEDOVĚKU**

Diplomová práce

Bc. Pavlína Bruzlová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Eva Myšková

České Budějovice 2014

Bruzlová, P., 2014: Střevní paraziti v archeologickém materiálu ze středověku. [Intestinal parasites in archeological material from medieval period. Mgr. Thesis, in Czech.] – 57 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE:

The aim of this thesis was to search for and identify human and/or animal intestinal parasite eggs in archeological material from medieval period in Brno and Prague. Concentration methods - sedimentation and flotation were used for parasite identification. Polymerase chain reaction (PCR) was used for the detection of parasite DNA. The results were put into context with other data published in similar studies and research.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 23. 4. 2015

.....
Bc. Pavlína Bruzlová

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi CSc. za výborné vedení této diplomové práce, za odborné rady a připomínky, a také za zadání velmi zajímavého tématu ke zkoumání a zpracování. Další velký dík patří mé školitelce specialiste RNDr. Evě Myškové, bez které bych byla v laboratoři naprosto ztracená a metodiku bych se jen těžko sama učila. Dále děkuji za ochotu pracovníkům oddělení veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Poděkování patří i doc. RNDr. Miroslavu Králíkovi, Ph.D. za poskytnutí archeologického materiálu z brněnského naleziště a Mgr. Petru Starcovi za zaslání archeologických vzorků z naleziště na Václavském náměstí. V neposlední řadě bych moc ráda poděkovala své rodině, která je mi vždy velkou oporou a umožnila mi studium na této škole. Největší poděkování však patří mému budoucímu manželovi, který je ochotný mi vždy se vším pomoci nebo poradit.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1. Paleoparazitologické techniky.....	1
1.2. Výskyt střevních parazitů člověka ve světě	3
1.2.1. Trematoda	3
1.2.2. Cestoda	6
1.2.3. Nematoda	9
1.2.4. Jednobuněční paraziti a paleoparazitologická analýza.....	14
2. CÍLE PRÁCE	17
3. POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY.....	18
3.1. Místa archeologického výzkumu.....	18
3.1.1. Ulice Vídeňská, Brno	18
3.1.2. Václavské náměstí, Praha	20
3.2. Materiál.....	21
3.3. Metody.....	24
3.3.1. Rehydratace	24
3.3.2. Flotace dle Kozáka a Mágrové (KOMA)	24
3.3.3. Sedimentace AMS III	25
3.3.4. Mikroskopické vyšetření	26
3.3.5. Izolace parazitární DNA.....	26
3.3.6. Polymerázová řetězová reakce	27
3.3.7. Elektroforéza.....	30
4. VÝSLEDKY	31
4.1. Mikroskopické vyšetření	31
4.1.1. Vídeňská, Brno	31
4.1.2. Václavské náměstí, Praha.....	32

4.2. Fotografická dokumentace	33
4.3. Molekulární metody.....	40
5. DISKUZE.....	42
6. ZÁVĚR.....	47
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

1. ÚVOD

Paleoparazitologie je interdisciplinárním oborem, který se nachází na rozhraní mezi paleontologií, archeologií, antropologií, ekologií, medicínskými vědami a samozřejmě parazitologií. Cílem paleoparazitologie, poměrně mladého vědního oboru, je najít a identifikovat parazity v paleontologickém nebo archeologickém materiálu pomocí metodologických postupů. Metody, obzvláště pak molekulárně biologické techniky, umožňují nahlédnout do systému hostitel – parazit – prostředí a zjistit tak hodnotné informace o vzniku, vývoji parazitů, vztahu člověk – parazit a řadu dalších informací. Nálezy parazitů v archeologických vzorcích mohou tedy pomoci pochopit život populací v průběhu času na naší Zemi, to jak lidé dříve žili a jaké měli stravovací a hygienické návyky (Araújo et al. 2003, Bouchet et al. 2003b, Fernandes et al. 2005). Kromě toho nám tyto metody mohou poskytnout informace o nemocech vztahujících se k přítomnosti parazitů v uplynulých dobách (Reinhard 1992, Florenzano et al. 2012).

Za úplně první archeologický nález parazitů je považován histologický nález kalcifikovaných vajíček helminta *Schistosoma haematobium*. Tato vajíčka objevil Marc Armand Ruffer v roce 1910 v infikovaných ledvinách tři tisíce let starých mumií (Ruffer 1910, Florenzano et al. 2012). Nicméně obor paleoparazitologie se začal rozvíjet až o mnoho let později a velkého rozvoje dosáhl hlavně v 80. letech 20. století. Tento obor se však nadále vyvíjí díky novým technologiím.

Nejlépe bývají zachována vajíčka parazitů v suchém prostředí nebo naopak v prostředí vlhkém, ale bez přístupu kyslíku. Paraziti, nebo alespoň jejich DNA, mohou být získáni ze starověkých koprolitů (fosilních výkalů) nebo organických sedimentů (utvářených během staletí různými vlivy). Organické sedimenty bývají původu fekálního s antropogenním charakterem. Tento typ materiálu bývá dnes získáván ze starých jímek, latrín a žump. Mimo jiné se provádějí i analýzy vzorků ze středověkých pohřebišť a nejčastěji nacházenými parazity jsou vajíčka helmintů (motolic a tasemnic), či střevních protist (Gonçalves 2003, Rocha da et al. 2006).

1.1. PALEOPARAZITOLOGICKÉ TECHNIKY

Při zjišťování přítomnosti parazitů ve vzorcích se musíme spolehnout buď na přímý průkaz druhů z fosilního či archeologického materiálu, anebo se musíme spolehnout na identifikaci či sekvenování DNA parazitů. U přímého průkazu je nezbytné vzorek nejdříve

rehydratovat, například podle metody navržené Callenem a Cameronem (1960). Mnohá data byla získána použitím roztoku fosforečnanu sodného Na_3PO_4 po dobu 48-72 hodin. Pro paleoparazitologické účely jsou dále využívány klasické diagnostické parazitologické techniky s různými modifikacemi. Nicméně tyto techniky jsou limitovány tím, že nejsme v některých případech schopni přesně určit druh a případně ani rod (Reinhard 1992, Reinhard et al. 1988). Proto například u sedimentačních technik byla v některých případech doplněna i metoda ELISA pro detekci antigenů u mumií, aby se potvrdila přítomnost krevniček (Deelder et al. 1990).

Flotační metody bývají naopak vhodné pro nalézání lehčích parazitických vajíček či oocyst. Tato metoda je založená na rozdílných specifických gravitacích (SG) vajíček a flotačního roztoku. Existuje celá řada flotačních roztoků s různými specifickými gravitacemi například Sheatrův roztok, roztok zinku a sulfátu nebo roztok saturované soli. Pro dosažení požadovaných výsledků je tedy zcela jasné, že musí být SG roztoku větší než SG vajíček.

Sedimentační metody jsou užitečné k tomu, abychom mohli najít těžká vajíčka parazitů či vajíčka opatřená víčkem (operkulovaná vajíčka). Díky použití správného roztoku pro sedimentaci (a zčásti také díky hypertonickému efektu) taková vajíčka klesají ke dnu. Vzorky připravené flotační a sedimentační metodou se dále prohlížejí v mikroskopu. Mikroskopie je stále nezbytnou metodou při diagnóze (Dryden et al. 2005).

Použití aDNA (ancient DNA) k paleoparazitologické analýze bylo dalším významným krokem v historii tohoto oboru. I když může být aDNA velmi často degradovaná (zejména jaderná DNA) nebo kontaminovaná, tak jsme dnes schopni získat relevantní výsledky díky molekulárně biologickým technikám, jako jsou PCR a sekvenování genomu (Willerslev 2005). V současné době existuje mnoho důkazů o aDNA u celé škály různých parazitů. Příkladem mohou být studie zaměřené na aDNA helmintů – jako jsou *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* nebo *Enterobius vermicularis*. DNA těchto druhů byla detekována za použití specifických primerů zaměřených na konkrétní oblasti určitých genů. Například u *A. lumbricoides* byly primery zaměřeny na 142 bp gen pro cytochrom b mitochondriálního genomu (Leles et al. 2008). Ve studii, kterou provedli v roce 2014 Jaegr a Iñiguez, byla použita metoda MPH (Molecular Paleoparasitological Hybridization). Tato metoda umožnila prokázat aDNA roupa dětského z archeologického materiálu pomocí specifických sond, které byly zaměřeny na cox I gen.

Další možností identifikace je popřípadě genotypování celého genomu parazitů, které bývá v dnešní době také hojně využíváno, zejména u DNA z koproliť, sedimentů z latrín a z tkání mumií (Eisen 2007).

1.2. VÝSKYT STŘEVNÍCH PARAZITŮ ČLOVĚKA VE SVĚTĚ

Během života na Zemi se člověk stal hostitelem pro pár stovek druhů parazitů – pro přibližně 300 druhů helmintů a 70 druhů jednobuněčných parazitů. Pro většinu z nich je člověk pouze náhodným hostitelem a nakazí se jimi pouze v ojedinělých případech. Nicméně existuje i několik významných druhů, které u člověka způsobovaly a nadále způsobují velmi závažná onemocnění (Ashford et Crewe 1998).

Většina parazitárních onemocnění se vyskytuje hlavně v tropických a subtropických oblastech. Díky migraci obyvatel ve světě, usidlování imigrantů na nových místech a otevřením obchodních cest se paraziti z tohoto ohniska postupně rozšiřovali do celého světa. Do Nového světa se noví paraziti dostali hlavně díky obchodování s otroky.

V tenkém i tlustém střevě lidí mohou žít odlišné skupiny intestinálních parazitů – Cestoda (tasemnice), Nematoda (škrkavky, roupi, tenkohlavci), Trematoda (motolice), které se dohromady označují jako helminti a protista (jednobuněčné organismy). Některé druhy zůstávají ve střevech, jiné mohou proniknout mimo střevo do jiných orgánů. Většina těchto parazitů se vyvíjí v lidském těle a také se zde rozmnožuje. Vajíčka se potom dostávají z těla ven stolicí a mohou kontaminovat okolí.

1.2.1. TREMATODA

Třída **Trematoda** (motolice) je početnou skupinou platyhelmintů, která je charakteristická nepřímým vývojem parazita. Každý parazit mívá většinou 1-3 mezihostitele a prvním mezihostitelem bývá zpravidla měkkýš. Motolice se mohou nacházet v celé řadě orgánů, ale často osidlují trávicí trakt. Tělo je dorzoventrálně zploštělé, může mít oválný či kopinatý tvar. Motolice jsou převážně hermafrodité, ale najdou se i výjimky (Schistosomatidae). Oplozené vajíčko střevních motolic (Obr. 1) se dostává ven se stolicí a postupně se v něm vytváří obrvená larva – miracidium.

1.2.1.1. ČELEĎ FASCIOLIDAE

Fasciolopsis buski je střevní motolice, která parazituje u člověka i jiných savců ve východní a jihovýchodní Asii. Dospělá motolice naklade vajíčka ve střevě a ty se dostávají ven se stolicí. Další vývoj je vázaný na vodu, proto se vajíčko musí dostat do vhodného prostředí (27-30 °C a pH = 6,5-7,2), aby se mohla vylíhnout obrvená larva. Miracidium

hledá svého prvního hostitele, kterým bývají vodní plži rodu *Segmentina*, *Hippeutis* nebo *Gyraulus*. Uvnitř plže dochází k dalšímu vývoji, kdy nepohlavním množением vznikají postupně stádia: sporocysta, redie a cercarie. Zralé cercarie opatřené ocáskem opouštějí tělo plže, procesem encystace se opouzdří na vodní vegetaci (např. lotos, vodní kaštan, vodní bambus...) a vzniká stádium označované jako metacercarie. Ty mohou plavat i na vodní hladině a definitivní hostitel se pak může nakazit pitím takto kontaminované vody, nebo pozřením tepelně neupravených rostlin s metacercariemi. Onemocnění může být pro člověka fatální. Způsobuje ulcerace, hemoragie, abscesy a záněty střevní sliznice. Při těžkých napadeních se mohou objevit i alergické a toxické reakce (Graczyk et al. 2001).

O archeologických nálezích vajíček tohoto parazita se nepodařilo najít skoro žádné záznamy. Důvodem zřejmě může být fakt, že se tento parazit vyskytuje výhradně v JV Asii a není známo, že by byl zavlečen do jiných oblastí (nenalezl by 1. mezihostitele pro nepohlavní vývoj). Lidí, kteří trpí tímto onemocněním v dnešní době, také není mnoho (v porovnání s ostatními známějšími parazity) a zřejmě tomu tak bylo i v předešlých dobách (Reinhard et al. 2008).

Fasciola hepatica je kosmopolitně rozšířeným parazitem, ale na rozdíl od *F. buski* parazituje hlavně v játrech člověka (člověk je pouze náhodným hostitelem a nakazí se metacercariemi na rostlinách). Ve svém životním cyklu má také pouze jednoho mezihostitele – plž rodů *Galba*, *Lymnaea* a *Fossaria*. Paleoparazitologických nálezů je však známo o mnoho více, než je tomu u *F. buski*. Ze středověkých archeologických nálezů můžeme zmínit nálezy vajíček z Německa (Braunschweig, Hameln, Freiburg) a z Francie (Paříž) (Bouchet et al. 2003b, Herrmann 1985, Gonçalves et al. 2003).

1.2.1.2. ČELEĎ SCHISTOSOMATIDAE

Nejvýznamnějšími druhy z medicínského hlediska jsou *Schistosoma haematobium* (krevnička močová), *Schistosoma japonicum* (krevnička jaterní) a *Schistosoma mansoni* (krevnička střevní). Krevničky střevní a jaterní osidlují cévy mezenteria (krevnička jaterní osidluje i cévy vedoucí do jater a krevnička močová osidluje cévy obklopující urogenitální trakt) a dospělé samičky zde produkují vajíčka. Vajíčka pak za pomoci typického trnu a proteolytických enzymů provrtávají stěnu kapilár a přes tkáň se dostávají do střev a jsou tak vylučována se střevním obsahem. Ve vodném prostředí se líhnou miracidia, hledají si vhodného mezihostitele, kterým bývají buď plicnatí plži *Bulinus* (*S. haematobium*), *Biomphalaria* (*S. mansoni*) nebo předožábří plži *Oncomelania* (*S. japonicum*) a v něm se vyvíjejí v cercarei s vidličkovitým ocáskem (= furkocercarie). Toto stádium musí najít

vhodného definitivního hostitele do 72 hodin. Při kontaktu s kůží hostitele se do ní zavrtávají a vytvářejí stádium schistosomuly (stádium bez ocásku). Krevním řečištěm putují do příslušného orgánu a zde dozrávají v dospělce odděleného pohlaví. Infekce u člověka bývá provázena krvavými průjmy a zánětem střev a velkými bolestmi břicha. *S. mansoni* v dnešní době parazituje u lidí ve více než 50 státech v Africe, na Arabském poloostrově a v jižní Americe (Gryseels et al. 2006).

Schistosomóza je prastarým onemocněním, důkazem je nález vajíček krevničků v ledvinách egyptské mumie XX. dynastie (Ruffer 1910). Horne a jeho kolega Redford také zaznamenali vajíčka schistozom ve tkáních egyptských mumií (1995). Jedním z takových případů je nález vajíček *S. mansoni* a *S. haematobium* současně v latríně jednoho středověkého domu (z 15-16. století) ve Francii (Montbéliard). Nalezená vajíčka byla velmi dobře zachovalá díky vlhkému prostředí bez přístupu kyslíku. Nálezy v latrínách ze středověké Evropy však často odráží pouze importované případy z Afriky (ve střední Evropě nebyl vhodný mezihostitel, ve kterém by se mohla schistozoma vyvíjet). Obyvatelé domu si buďto přivezli tuto nákazu z Afriky anebo tato nemoc mohla být přivezena s africkými otroky do Evropy. Vlastnit africké otroky bylo pro bohaté francouzské rodiny v 16. století běžné (Bouchet et al. 2002).

Vajíčka *S. japonicum* byla nalezena v Číně u 2100 let staré kostry (Liangbiao et Tao 1981). Další nález z Číny zaznamenal Wei, který našel schistozomozu u osoby ženského pohlaví z dynastie Han přibližně z 2. století před našim letopočtem (Wei 1973).

1.2.1.3. ČELEĎ ECHINOSTOMATIDAE

Echinostoma spp. (např. *E. ilocanum*, *E. revolutum*, *E. malayanum*...) jsou dalšími intestinálními parazity, kteří způsobují echinostomózu, onemocnění vyskytující se zejména v jihovýchodní Asii (Taiwan, Indie, Korea, Malajsie, Filipíny). Přibližně 16 druhů parazituje u člověka, jiné druhy mohou infikovat savce nebo vodní ptáky. Životní cyklus je podobný jako u ostatních motolic. Echinostomy mívají dva mezihostitele. Několik druhů plžů může sloužit jako první mezihostitel (např. *Bithynia*) a druhým mezihostitelem potom mohou být buď jiní plži, ryby, obojživelníci nebo mlži. Člověk se nakazí pozřením těchto tepelně neupravených živočichů, kteří jsou napadeni metacerkáriemi. Pacienti nejčastěji trpí bolestmi břicha, bolestmi hlavy, závratěmi, anémií a průjmy. Při masivnějších nálezích jsou také časté záněty střevní sliznice a úbytek tělesné hmotnosti (Carny 1991, Chai 2009).

Archeologická lokalita - jeskyně Lapa do Boquete (z 8- 14. stol.) v Brazílii je prvním místem, kde byla nalezena vajíčka parazita *Echinostoma* sp. Byla nalezena v koprolitech

z částečně mumifikovaného lidského těla. Nicméně diagnostika založená pouze na morfologii vajíček nebyla schopná zařadit nálezy k jednotlivým druhům. Analýza ukázala i přítomnost jiných parazitů, například měchovců (viz kapitola 1.2.3.5). Takovéto nálezy vypovídají o dřívějších stravovacích návycích našich předků (Sianto et al. 2005).

První molekulární paleoparazitologickou analýzu pro echinostomy provedli Leles a jeho kolegové v roce 2014. Byly navrženy specifické primery pro oblast ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), která je dlouhá 126 párů bází. Dále byla amplifikována oblast na mitochondriální DNA pro cytochrom oxidázu 1. Tato diagnostika samozřejmě umožňuje i zařazení tohoto parazita do specifických druhů (Leles et al. 2014).



Obr. 1: Trematoda – vajíčka střevních parazitů nalezená a identifikovaná v archeologickém materiálu: **A** – *Fasciolopsis buski* (Ballal et Martena 2012), **B** – *Schistosoma mansoni* (Gryseels et al. 2005), **C** – *Echinostoma* sp. (Sianto et al. 2005).

1.2.2. CESTODA

Cestoda (tasemnice) je název pro skupinu ploštěnců, ve které všichni žijí parazitickým způsobem života. Typicky se nacházejí v trávicím traktu obratlovců, ale výjimkou nejsou ani výskyty v játrech či mozku. Člověk se může nakazit pozřením tepelně neupraveného masa (vepřového, hovězího nebo rybího) nebo přípravou jídel ve špatných hygienických podmínkách. Každá tasemnice je tvořena hlavičkou (scolex) a různým počtem článků (proglotidy). Většina tasemnic má na hlavičce věnec háčků (rostelum). Životní cyklus je poměrně složitý a zahrnuje jednoho či několik mezihostitelů. Dospělá tasemnice se přisává pomocí přísavných disků na scolexu ke stěně střeva a bere si od svého hostitele potřebné

živiny. Při pohlavním množení vzniká velké množství vajíček (Obr. 2) ve člancích a ty se dostávají ven do prostředí se stolicí.

1.2.2.1. ČELEĎ TAENIIDAE

Taenia saginata (tasemnice bezbranná) a *Taenia solium* (tasemnice dlouhočlenná) jsou běžně se vyskytující tasemnice, které mohou v dospělosti dorůst až do délky několika metrů. Zralé články tasemnic obsahují velké množství vajíček (50-80 tisíc), která se dostávají se stolicí ven do prostředí a vody. Mezihostitel skot (u *T. saginata*), prase a člověk (u *T. solium*) se nakazí pozřením těchto infekčních vajíček. Ve střevech mezihostitele se z vajíčka vyvine další stádium - larva (onkosféra), která se dostává penetrací přes střevní stěnu do různých tkání (játra, mozek, srdce), kde se vyvíjí v cysticerkus – opouzdřené stádium. Z medicínského hlediska je onemocnění cysticerkóza u člověka mnohem závažnější. Životní cyklus je dokončen, když definitivní hostitel pozře syrové či nedostatečně tepelně upravené maso s cysticerky. Ty se ve střevě uvolní a přichytí ke střevní stěně a vyvinou se v dospělce (Dorny et Praet 2007).

Přítomnost *T. saginata* ve střevech nezpůsobuje žádné závažné onemocnění, dokonce průběh bývá ve většině případů asymptomatický. *Taenia solium* způsobuje anémie, bolesti břicha a nevolnost. Rozlišení těchto dvou druhů není úplně jednoduché. Vajíčka se morfologicky nedají od sebe rozlišit. Není proto vůbec jasné, zda v archeologickém materiálu jsou nacházena vajíčka *T. solium* nebo *T. saginata*. Rozpoznávacím znakem mohou být pouze počty uterinních větví ve člancích či přítomnost háčků na hlavičce tasemnice a samozřejmě molekulární diagnostika (González et al. 2000, Jimenez et al. 2010).

Taenia saginata se vyskytuje v podstatě bez výjimky ve všech zemích, kde se konzumuje hovězí. Tasemnici *Taenia solium* můžeme najít v Latinské Americe (zejména u asijských imigrantů), Africe a v některých Asijských zemích. Nejstarší archeologický záznam vajíček *Taenia* sp., který byl dán do souvislosti s lidskými pozůstatky, pochází z neolitického období (3200 před n. l.). Vajíčka byla nalezena ve významném francouzském nalezišti Chalain v koproliitech (Demmelier et al. 1998). Velmi zachovalá vajíčka byla nalezena v tenkém střevě egyptské mumie datované přibližně do roku 1100 před n. l. K diagnostice byl v tomto případě použit skenovací elektronový mikroskop (Horne et Lewin 1977). Nálezy tasemnic ze středověkých nalezišť, která stojí za zmínku, jsou Newfoundland v Kanadě, Göttingen v Německu a Amsterdam v Nizozemí (Herrmann 1985, Horne et Tuck 1996, Jansen et Boersema 1972).

V archeologických pozůstatcích nalezených v honosných domech francouzské šlechty byla také běžně nalézána vajíčka tasemnic. Je známo, že šlechta jídávala nedostatečně uvařené či syrové maso, a tak se nakazili taeniózou. Nálezy mimo Francii nejsou tak běžné, vajíčka se zde nedochovala. Zřejmě z toho důvodu, že vajíčka *Taenia* spp. mají poměrně křehký obal. Dalším možným vysvětlením může být to, že chudí lidé nejedli tolik maso anebo ho dostatečně tepelně upravovali (Reinhard et al. 1986, Bouchet et Paicheler 1995b).

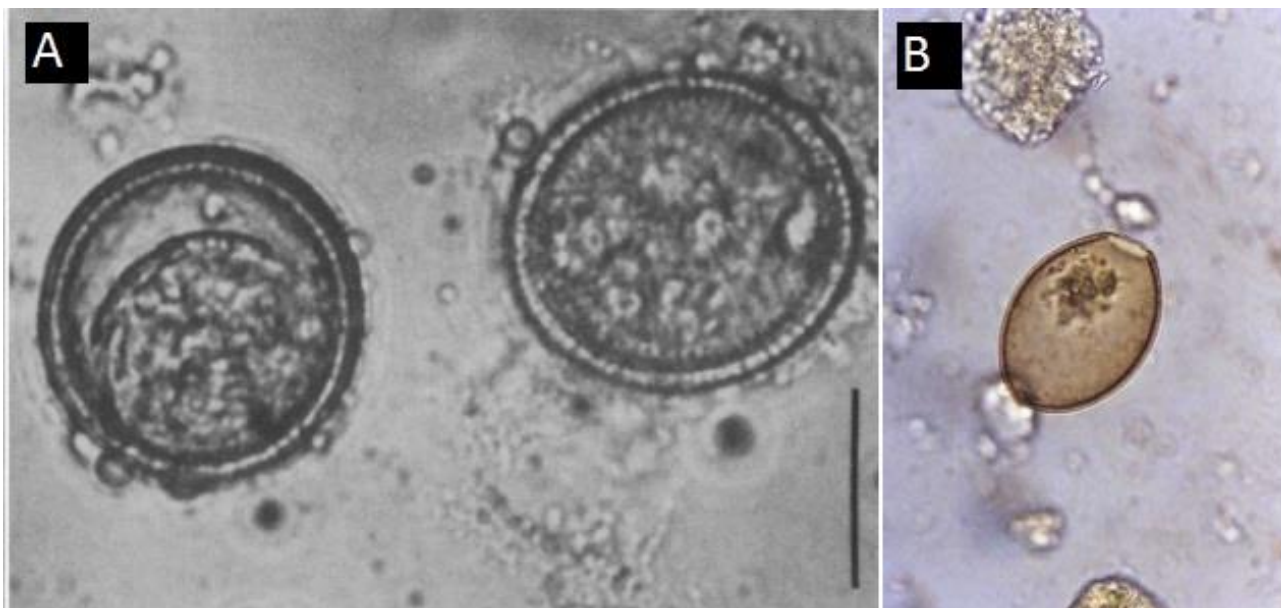
1.2.2.2. ČELEĎ DIPHYLLOBOTHRIDAE

Diphyllobothrium latum (škulovec široký) je endoparazitem s poměrně složitým životním cyklem, který zahrnuje dva mezihostitele a jednoho definitivního hostitele. Důležitou úlohu hrají i parateničtí hostitelé (např. větší ryby – jeseter, okoun, štika), ve kterých nedochází k žádnému vývoji parazita, ten zde pouze čeká, až bude pozřen definitivním hostitelem. *Diphyllobothrium latum* je vůbec nejdelším parazitem (20m), který může u člověka parazitovat. Je možné se nakazit pozřením uzených, syrových a solených ryb. Můžeme se tedy nakazit rybami, které neprošly dostatečnou tepelnou úpravou. Rozšíření tohoto parazita po světě je dáno přítomností vhodných mezihostitelů, ve kterých se může tato tasemnice vyvíjet (Severní Amerika, Evropa, Asie). Mírné a střední nákazy probíhají bezpříznakově, ale u těžkých nákaz se může objevit megaloblastická anémie z nedostatku vitamínu B12, spotřebovaného tasemnicí (Santos et Faro 2005, Lee et al. 2007).

Vajíčka se dostávají ven ze střev se stolicí. Jakmile se dostanou do vody, tak se vylíhne larva (koracidium). Ta čeká, až bude pozřena prvním mezihostitelem, kterým je malý vodní korýš – buchanka. Zde vzniká další infekční stádium procerkoid. Druhým mezihostitelem jsou malé ryby, které se živí korýši. Uvnitř ryby se stádium plerocerkoid usazuje v rybí svalovině. V definitivním hostiteli (pes, vlk, tuleň, prase, člověk) se pak vyvíjí dospělá tasemnice, která produkuje obrovské množství vajíček (Santos et Faro 2005).

Vajíčka nalezená v archeologickém materiálu odpovídají rozšíření parazita *D. latum* v moderním světě. Naleziště jsou hlavně v oblastech, kde jsou lidskou obživou převážně ryby (významným zdrojem jsou zejména alpská jezera). Zajímavý nález učinili Bouchet a kolektiv v roce 1995 – našli *Diphyllobothrium latum* v lidských koprolitech (3200 před n. l.) z jezerní oblasti v Chalain ve Francii a o deset let později Le Bailly (2005) a jeho kolektiv učinili ten samý nález ve Švýcarsku a Německu. Co se týče nálezů z Německa (Hornstaad-Hörnle), tak se jednalo o nejstarší objev tohoto parazita vůbec (neolit 3900 před n. l.). Ze středověkých nalezišť můžeme zmínit lokality z Norska (Oslo), kde byla nalezena

vajíčka ve vrstvách organického sedimentu z latrín; z Německa (Schleswig, Hameln, Freiburg, Regensburg) (Jones 1982, Herrmann 1985, Le Bailly et Reinhard 2013). Vajíčka škulovce datovaná přibližně do 13-16. století byla identifikována i z archeologického naleziště v Hradební ulici v Chrudimi (Bartošová et al. 2011).



Obr. 2: Vajíčka nejvýznamnějších druhů tasemnic nalezená v archeologickém materiálu: **A** – *Taenia* sp. (Reinhard et al. 1987), **B** – *Diphyllobothrium latum* (Le Bailly et Bouchet 2013).

1.2.3. NEMATODA

Nematoda (hlístice) jsou oblí helminti s červovitým tvarem těla. Jde o jednu z nejrozšířenějších a nejpočetnějších skupin na světě. Mnoho druhů žije parazitickým způsobem života u rostlin a živočichů, někteří žijí volně v prostředí. Pro hlístice jsou významné kutikulární zuby, kterými mohou penetrovat, či jinak poškozovat tkáň hostitele. Stavba těla hlístů je následující – mají válcovité pružné tělo, ke koncům ztenčené. Dospělci se rozmnožují pohlavně a samičky produkují velká množství vajíček. Ta bývají lehká a odolná vůči vlivům prostředí. Vajíčka jednotlivých hlístic (Obr. 3) jsou popsána dále v textu.

1.2.3.1. ČELEĎ ASCARIDIDAE

Ascaris lumbricoides (škrkavka dětská) je asi jedním z nejznámějších střevních parazitů vůbec. V dnešní době je infikováno přibližně 1,2 miliardy obyvatel na celém světě -

podle dostupných informací podaných CDC¹ (URL 1). Člověk se může nakazit fekálně-orálním transportem, čili pozřením infekčních vajíček v kontaminovaných potravinách a vodě. Ve střevech se vylíhne larva, která migruje skrze střevní stěnu do krevního oběhu a přes srdce se dostane do plic, kde je vykašlána a následně spolknuta. Dospělci se pak vyvíjejí ve střevě, kde samička klade tlustostěnná vajíčka (v ohromném množství 200 tisíc/den). Nakladená vajíčka se dostávají ven ze střev se stolicí (Siniah 2009).

Ascarióza je považována za velmi staré onemocnění. První zmínky jsou datovány už okolo 2500 před n. l. v Peru, kde byla nalezena vajíčka *A. lumbricoides* v koproliotech. Další nálezy byly lokalizovány v Egyptě nebo Brazílii (Patrucco et al. 1983). Bohaté nálezy vajíček parazitů ze středověku svědčí o nízké úrovni hygieny a vysoké hustotě obyvatel v rozšiřovaných vesnicích. Nálezy, které stojí za zmínku, pocházejí z Anglie (York, Winchester, Worcester), Francie (Montbéliard, Paříž), Německa (Schleswig, Berlín, Braunschweig, Hameln, Höxter), Norska (Oslo) nebo například z USA (Arizona) (Bouchet 1995a, Gonçalves et al. 2003, Herrmann 1985, Moore 1981, Pike et al. 1975).

Ascaris suum je škrkavka, která parazituje u prasat. Morfologicky jsou však *A. lumbricoides* a *A. suum* zcela nerozlišitelné. V současné době už jsou tyto dva druhy škrkavek považovány za jeden. Při sekvenaci mitochondriální DNA obou druhů bylo totiž zjištěno, že se liší pouze v několika málo nukleotidech a mají velmi podobnou velikost genomu (Anderson 1993, Leles et al. 2012, Liua et al. 2012).

Toxocara canis (škrkavka psi) a *Toxocara cati* (škrkavka kočičí) jsou další druhy škrkavek, kterými se mohou infikovat také lidé (zoonóza). U psovitých, případně kočkovitých šelem, *Toxocara* dospívá ve střevech a samičky zde produkují vajíčka, kterými se mohou nakazit mláďata anebo lidé. U člověka tento druh způsobuje toxokarózu, kdy larvy migrují tělem (larva migrans). Ve většině případů jde o asymptomatický průběh, ale v některých případech může dojít k poškození různých orgánů, zejména plic a očí (Wolfe et Wright 2003).

Na archeologickém nalezišti ve Francii (Menez-Dregan, Brittany) byla provedena paleoparazitologická analýza, která prokázala přítomnost velmi dobře zachovalých vajíček *T. canis*. Tento nález by mohl být zařazen do doby přibližně před půl milionem let (pleistocén). Vajíčka byla zachována zřejmě díky pevnému chitinóznímu obalu, a tak na ně nepůsobily tafonomické procesy (Bouchet et al. 2003a). Vajíčka *T. cati* byla nalezena v Jižní Americe (Piauí) v koproliotech kočkovitých šelem (Sianto et al. 2014).

¹ Centers for Disease Control and Prevention

1.2.3.2. ČELEĎ TRICHURIDAE

Trichuris trichiura (tenkohlavec lidský) je dalším kosmopolitně rozšířeným helmintem, který osidluje tlusté střevo člověka (případně i slepé střevo). Vyskytuje se hlavně v oblastech s nízkými hygienickými standardy a se špatnou či žádnou výstavbou kanalizace. Člověk se infikuje kontaminovanou vodou či špatně omytou zeleninou, která obsahuje typická vajíčka s pólovými zátkami (umožňují specifickou diagnózu). Vajíčko pro další vývoj potřebuje adekvátní vlhké podmínky a stejně tak tomu je i u *A. lumbricoides*. Tyto dva druhy parazitů se velmi často vyskytují současně u jednoho hostitele (Fernandes et al. 2005). Trichurióza mívá většinou asymptomatický průběh, jinak způsobuje průjemy, anémii, krvácení sliznice, záněty a někdy i vyhřeznutí konečníku a chronická dyzentérie. Při masivnějších nákazách mohou mít pacienti ve střevech 200 až 1000 dospělých jedinců. (Bundy et Cooper 1989).

Nejznámějším hostitelem helminta *T. trichiura* byla zřejmě mumie člověka zvaného Ůtzi, který žil přibližně 4150 let před n. l. v Evropě v Ůtztaltských Alpách (Oeggl 2009). Další nálezy vajíček, které jistě stojí za zmínku, jsou z Nizozemska (Valkenburg) z římského období, z Německa (Vilshofen, Bremerhaven, Schlezig, Berlín, Hameln), z Francie (Bobigny), z Anglie (Southampton, Winchester, York, Worcester) hlavně ze středověkých nalezišť (Jansen Jr et Over 1966, Herrmann 1985, Moore 1981, Pike et al. 1975). U těchto nálezů vajíček v archeologickém materiálu šlo s největší pravděpodobností o lidské koproliity.

V novější belgické studii bylo nalezeno kolem stovky vajíček tenkohlavce lidského. Jednalo se o středověkou archeologickou oblast Raversijde. Všechny vzorky, které byly analyzovány, měly pozitivní nález. Vajíčka byla změřena a jejich rozměry se pohybovaly mezi 53,5-55,7 μm x 25,0-27,1 μm (Fernandes et al. 2005).

1.2.3.3. ČELEĎ OXYURIDAE

Nákaza parazitem *Enterobius vermicularis* (roup dětský) je stále jednou z nejrozšířenějších nákaz na světě, která postihuje převážně děti (nezávisle na pohlaví). Tento kosmopolitně rozšířený parazit je vysoce infekční a postihuje zejména tlusté střevo a konečník. Dospělý člověk, respektive dítě, se může nakazit velmi jednoduše, a to spolknutím vajíček roupů, ať už při kontaktu s infekční osobou nebo dotykem kontaminovaných předmětů. Ve střevech se vylíhnou larvy, které dospívají v samičky a samečky. V noci vylézají oplozené samičky k řitnímu otvoru a kladou zde vajíčka (až

11000). Hlavními symptomy jsou bolesti hlavy, nespavost, bolesti břicha a úporné svědění způsobené pohybem samiček v rektu. Závažnými komplikacemi potom mohou být záněty slepého střeva nebo záněty močového a pohlavního ústrojí u dívek a žen (Cook 1994).

Archeologické nálezy vajíček roupů ze Starého světa bývají poměrně vzácné, a to hlavně z toho důvodu, že vajíčka jsou tenkostěnná. Je tedy velmi pravděpodobné, že se vlivem vnějšího prostředí nezachovávají. Některé paleoparazitologické studie prokázaly přítomnost vajíček v lidských 10 tisíc let starých koproliitech z USA (Utah), Chile nebo Peru. Ze středověkého naleziště (Německo – Göttingen) je známý pouze jeden případ, kde byla nalezena vajíčka parazita *Enterobius vermicularis* (Herrmann 1985, Ferreira et al. 1984). Novější studie potvrdily výskyt roupů i ve východní Asii. U mumie pohřbené v 17. století v Joseonově hrobce v Koreji byla také prokázána enterobióza. Při analýze trávicího traktu, který byl ve velmi zchovalém stavu, byla nalezena vajíčka roupů (Shin et al. 2011).

V dnešní době se stále více používají molekulární metody pro paleoparazitologickou analýzu. Iñiguez a jeho kolektiv (2003) navrhli specifické primery pro oblast na 5S ribozomální podjednotce *Enterobius vermicularis*, tím byla umožněna jeho identifikace ze vzorků koproliitů z Ameriky.

1.2.3.4. ČELEĎ CAPILLARIIDAE

Bylo popsáno více než 250 druhů čeledi *Capillariidae*, ale u člověka parazitují pouze tři druhy. Jsou to *Paracapillaria philippinensis* způsobující intestinální kapilariózu, *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*), který je původcem jaterního onemocnění a *Eucoleus aerophilus* postihující hlavně plíce. *Paracapillaria philippinensis* prodělává část svého životního cyklu v rybách, čili vývoj tohoto parazita je vázaný na vodní prostředí. Malé druhy ryb pozřou infekční vajíčka a pak se v nich vyvíjí larvy. Člověk se může nakazit požitím nedostatečně tepelně upravených ryb. Postižení pacienti nejčastěji trpí vodnatými průjmy, úbytkem váhy, bolestmi břicha a nedostatečným vstřebáváním tuků a cukrů. S největší pravděpodobností je to důsledek působení proteolytických enzymů produkovaných tímto parazitem (Chunlenthrit et al. 1992).

Nejstarší nálezy vajíček v Evropě pocházejí z období neolitu. Z této doby byla objevena naleziště ve francouzských Alpách (Chalain, Arbon, Concise). Například v oblasti Chalain bylo zjištěno 21 pozitivních vzorků z lidských koproliitů (z 23). Další záznamy o nálezech vajíček rodu *Capillaria* jsou z Belgické oblasti Namur. Jedná se o oblast z 12-13. století. Tato vajíčka jsou velmi podobná vajíčkům jiného parazitického červa *T. trichiura* a někdy bývají velmi špatně vzájemně rozpoznatelná (Bouchet 1997, Rocha da et al. 2006).

1.2.3.5. ČELEĎ ANCYLOSTOMATIDAE

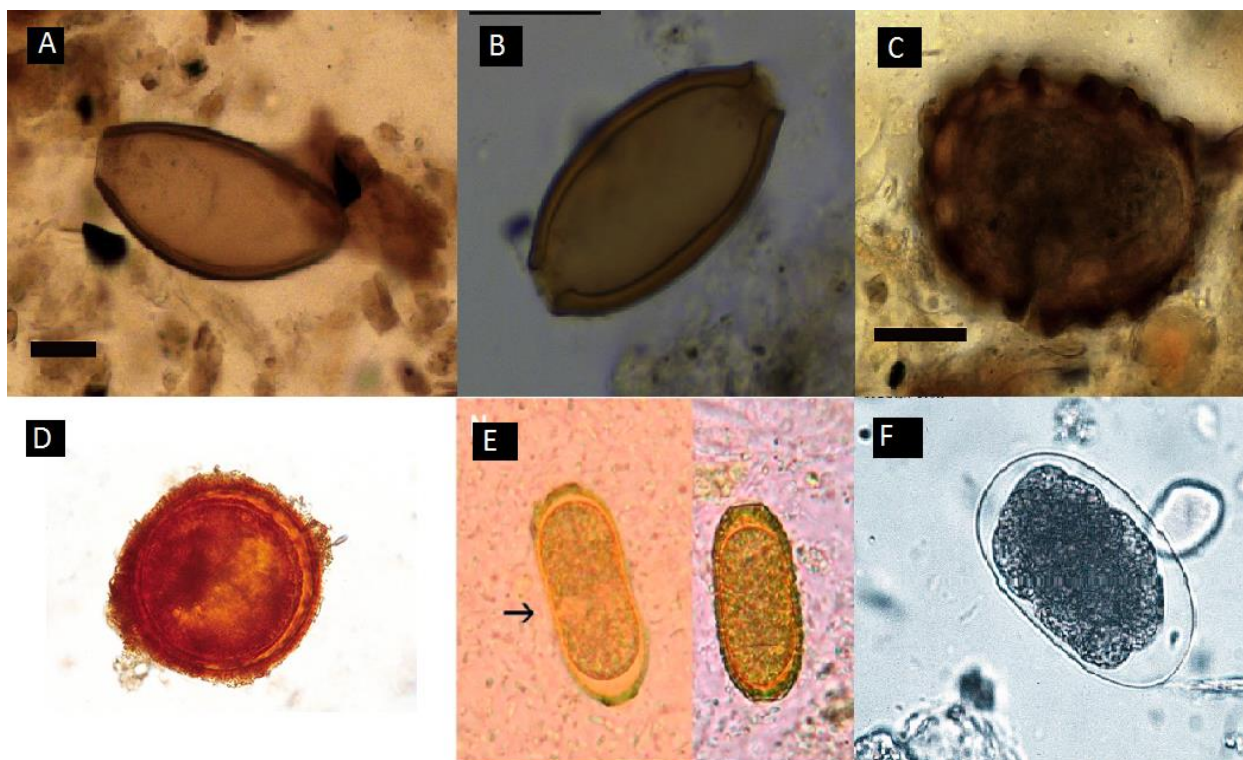
Ancylostoma duodenale (měchovec lidský) a *Necator americanus* (měchovec americký) jsou hlísti s velmi podobným životním cyklem. Dospělci žijí v tenkém střevě a mohou zde způsobit velké krevní ztráty (ulcerace klků). Nakladená vajíčka se dostávají ven se stolicí a mohou kontaminovat okolí. Z vajíčka se vylíhne larva, svléká se v neinfekční larvu (rhabditoidní larva) a při druhém svlékání se stává infekční larvou (filariformní larva), která se provrtává do hostitele skrz pokožku. Lymfatickými cestami a krevním řečištěm se larva dostává do plic, kde je vykašlána a následně spolknuta. Vývoj se uzavírá ve střevě, kde se larvy mění v dospělé odděleného pohlaví. Hlavními symptomy onemocnění měchovci jsou bledost, anémie z nedostatku železa a únava (Adenusi et Ogunyomi 2003).

Nejčastější archeologické nálezy měchovců pocházejí z Ameriky, nicméně nálezy z archeologických nalezišť ve starém světě také nejsou výjimkou. Centrum výskytu je zejména v tropech a subtropích anebo na místech, která imitují klimatické podmínky těchto prostředí – například doly, cihelny. Za zmínku stojí příklad nákazy dělníků, kteří stavěli Gothardský tunel v Alpách. Trpěli anémií a několik jich na tuto nákazu dokonce zahynulo, při pitvě byla potom nalezena vajíčka měchovce (Peduzzi et Piffareti 1983). Nálezy ze středověku nejsou tak časté, významné jsou novější nálezy z USA - z Aljašky (Bouchet et al. 1999)

1.2.3.6. ČELEĎ STRONGYLOIDIDAE

Strongyloides stercoralis (hádě střevní) má nejsložitější životní cyklus ze všech hlístic, zahrnuje totiž parazitické i volně žijící generace. Dospělá samička klade vajíčka v tenkém střevě, z těch se vylíhnou larvy prvního stádia a se stolicí se dostávají do prostředí, kde žijí volně v půdě. Po svlékání se z nich stává infekční filariformní larva, která je schopná penetrovat pokožku hostitele a přes krevní oběh se dostává do plic a po spolknutí do střev, jako klasická nematoda. Někdy může také larva dozrát v infekční larvu už ve střevě a poté penetruje střevní stěnu (Ericsson et al. 2001).

Záznamů o nálezech *S. stercoralis* není mnoho. Důvodem je zřejmě fakt, že se jedná o parazita, který tvoří velmi tenkostěnná vajíčka a k vylíhnutí larvy dochází v mnoha případech už ve střevě. Nejzajímavějším nálezem tohoto parazita je nález ve střevech 3000 let staré mumie Asru v Egyptě (Gonçalves et al. 2003).



Obr. 3: Vajíčka hlístic nalezená v archeologickém materiálu: **A** – *Enterobius vermicularis* (Yeh et al. 2014), **B** – *Trichuris trichiura* (Anastasiou et Mitchell 2013), **C** – *Ascaris lumbricoides* (Yeh et al. 2014), **D** – *Toxocara canis* (Bouchet et al. 2003a), **E** – *Paracapillaria philippinensis* (Attia et al. 2012), **F**- *Ancylostomatidae* sp. (Bethony et al. 2006).

1.2.4. JEDNOBUNĚČNÍ PARAZITI A PALEOPARAZITOLOGICKÁ ANALÝZA

Intestinální jednobuněční paraziti (Protista) obvykle žijí uvnitř hostitele v lumen střeva nebo uvnitř střevních epitelálních buněk. Infekčním stádiem bývají cysty nebo oocysty. Tato stádia však nejsou tak odolná vůči tlení a dalším rozkladným procesům jako vajíčka helmintů. Infekce způsobené jednobuněčnými parazity není jednoduché identifikovat v archeologickém materiálu. Takové nálezy jsou dokonce velmi vzácné. Jednobuněční paraziti jsou velmi špatně zjistitelní klasickými metodami, jako jsou koncentrační metody, ale je možné je detekovat pomocí jejich antigenů (glykoproteinové antigeny) nebo je možné amplifikovat jejich aDNA ze vzorků. (Bouchet et al. 2003c, Gonçalves et al. 2002).

1.2.4.1. DIPLOMONADINA

Celosvětově rozšířeným parazitem je také *Giardia intestinalis* (lamblie střevní). Parazituje ve střevech, buď volně anebo přichycená k enterocytům přísavným diskem.

Lamblie tvoří cysty vejčitého tvaru. Po pozření hostitelem se excystují v žaludku a vytvoří se stádium označované jako trofozoit (pohyblivé, osově souměrné stádium s osmi bičíky). Množí se v tenkém střevě, hlavně v duodenu. Přítomnost giardií ve střevě se může projevit bezpříznakově nebo může dojít k závažnému poškození střevních buněk a jejich funkcí - porušení schopnosti vstřebávat živiny, bolestem břicha a průjmům (Ali et Hill 2003).

K diagnostice giardií z koprolitů se využívá trichromové barvení nebo metoda přímé imunofluorescence. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je však stále nejpreferovanější metodou. Mnoho výsledků potvrdilo spolehlivost imunologie při detekci antigenů protist v starověké populaci.

Většina archeologických nálezů giardií pochází především z Nového Světa. Faulkner a jeho kolektiv (1989) potvrdili přítomnost *G. intestinalis* v koproлитеch z 3. stol. před n. l. v USA (Tennessee) za použití metody IFA (immunofluorescence assay). Další podobný nález učinili v roce 2003 Ortega and Bonavia. V archeologickém nalezišti v Chevenez ve Švýcarsku byla také zaznamenána přítomnost lamblíí ze středověku (Le Bailly et al. 2008).

1.2.4.2. ENTAMOEBIIDAE

Entamoeba histolytica (měňavka úplavičná) a *Entamoeba dispar* jsou dva druhy améb, které jsou morfologicky nerozlišitelné. Jako hlavní metoda pro rozlišení těchto druhů sloužilo v ještě nedávné době použití monoklonálních protilátek. Dnes už se hojně využívají molekulárně diagnostické metody, například specifické DNA sondy. *Entamoeba dispar* je považována za nepatogenní druh, a to díky asymptomatickému průběhu infekce. Naopak améba *E. histolytica* je poměrně invazivní druh, protože produkuje proteinázy narušující sliznici střeva. K pomnožení slouží stádium trofozoit a infekčním stádiem je cysta, která se dostává ze střeva se stolicí. *Entamoeba histolytica* způsobuje vodnaté a krvavé průjmy s velkými bolestmi břicha (Stanley 2003).

Použitím komerčně dostupného ELISA kitu pro detekci adhezinu (povrchová molekula entaméb) bylo zjištěno přibližně 20 pozitivních vzorků z archeologických míst z Argentiny, USA, Francie, Belgie nebo Švýcarska. Detekce je možná díky proteinům, které se zachovávají až po staletí v koproлитеch i pod vlivem environmentálních podmínek. Další oblastí, kde se v minulosti vyskytoval tento parazit, je Chile (Tihuanaco, Cabuza, Atacamenha). Přítomnost tohoto parazita byla prokázána v koproлитеch (Fouant et al. 1982).

1.2.4.3. MIKROSPORIDIE

Intracelulární paraziti *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi* napadají střevní trakt člověka – enterocyty. Oba druhy se mohou dále rozšířit i do jiných tkání v těle (např. do plic nebo do ledvin). Vyvolávají spíše asymptomatické infekce s občasnými průjmy. Při větších napadeních pak může docházet ke ztrátě tělesné hmotnosti a nedostatečnému vstřebávání tuků a vitamínu B12 ve střevě. Mikrosporidie jsou řazeny mezi velmi invazivní parazity, a to hlavně díky charakteristickému polárnímu tělísku. Tyto druhy také vytváří tlustostěnné, velmi odolné cysty, které odolávají i podmínkám vnějšího prostředí (Okhuysen 2001).

Ancient DNA parazita *Encephalitozoon intestinalis* byla prokázána v archeologickém materiálu z Prahy. K analýze vzorků z 18/19. století byly použity molekulární metody. Nebylo však možné prokázat, zda se jedná o lidské či zvířecí koprolyty. Důvodem je to, že se tento parazit může vyskytovat hojně u zvířat, ale právě i u lidí (Myšková et al. 2014).

1.2.4.4. KRYPTOSPORIDIE

Existuje mnoho druhů kryptosporidií, které parazitují u různých druhů hostitelů. *Cryptosporidium parvum* je nejčastěji se vyskytující druh v České Republice parazitující u člověka. Parazituje v tenkém i tlustém střevě a způsobuje hlavně asymptomatická onemocnění. Nicméně může také způsobit průjmová onemocnění provázená bolestmi břicha označované jako kryptosporidióza. Nejzávažnější průběh bývá u imunodeficientních pacientů a HIV pozitivních lidí. Oocysty jsou velmi rezistentní vůči chlorované vodě a mohou přežít ve vodním prostředí po velmi dlouhou dobu (Okhuysen 2001).

Nálezy parazita *Cryptosporidium parvum* v archeologických nálezích nejsou časté. Můžeme například zmínit nález v koprolytech z před-kolumbijské doby v Americe z 11. století před n. l. a nález u peruánských mumii datovaných přibližně do 24. století před n. l. (Le Bailly et al. 2008).

2. CÍLE PRÁCE

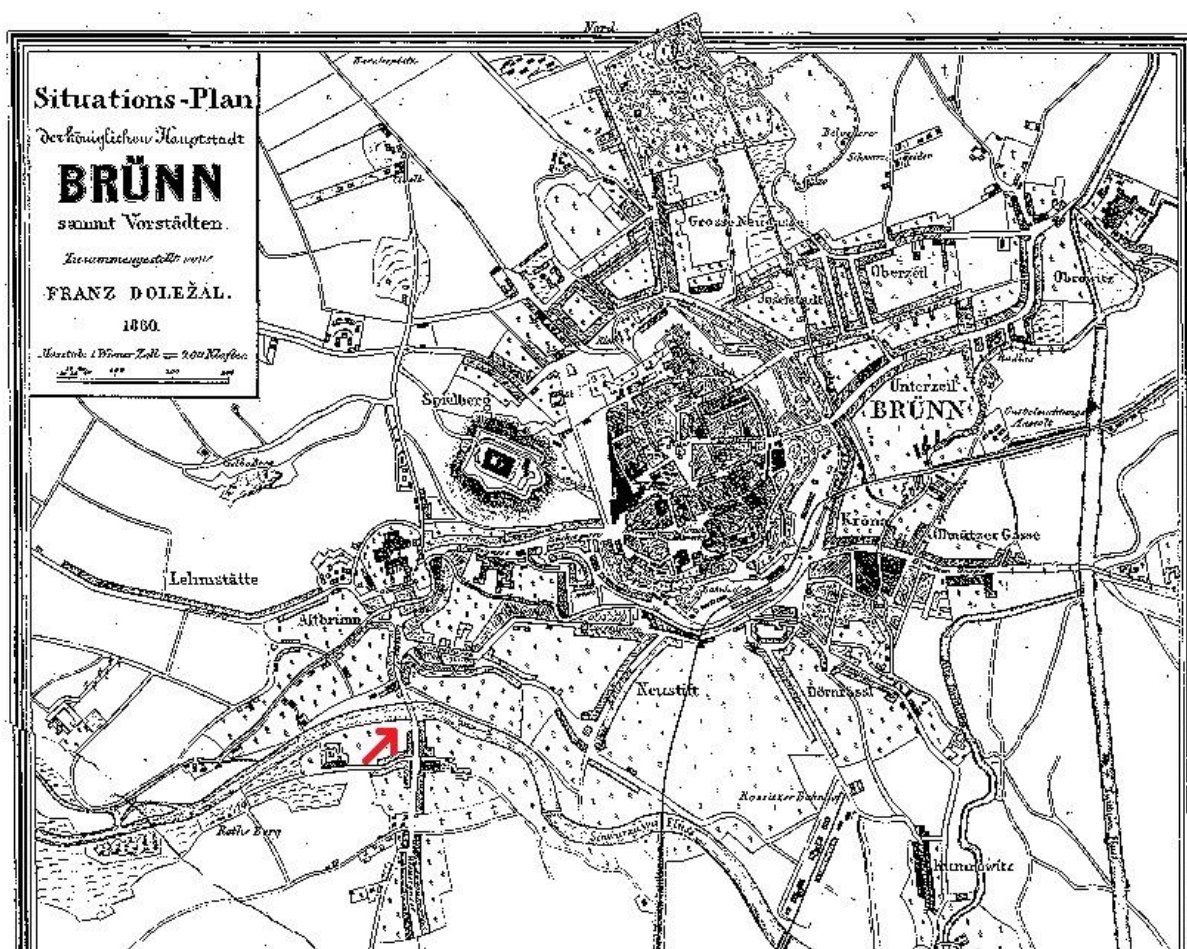
1. Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu.
2. Koncentračními metodami vyšetřit vzorky odebrané na pohřebištích z doby stěhování národů, ze středověkých pohřebišť na jižní Moravě a z vrtů provedených na Václavském náměstí, s cílem identifikovat vajíčka helmintů parazitujících u člověka.
3. Pomocí molekulárních metod identifikovat ve vybraných vzorcích DNA jednobuněčných parazitů.
4. Výsledky dát do souvislosti s dostupnými informacemi o příslušných archeologických nalezištích.

3. MATERIÁLY A METODY

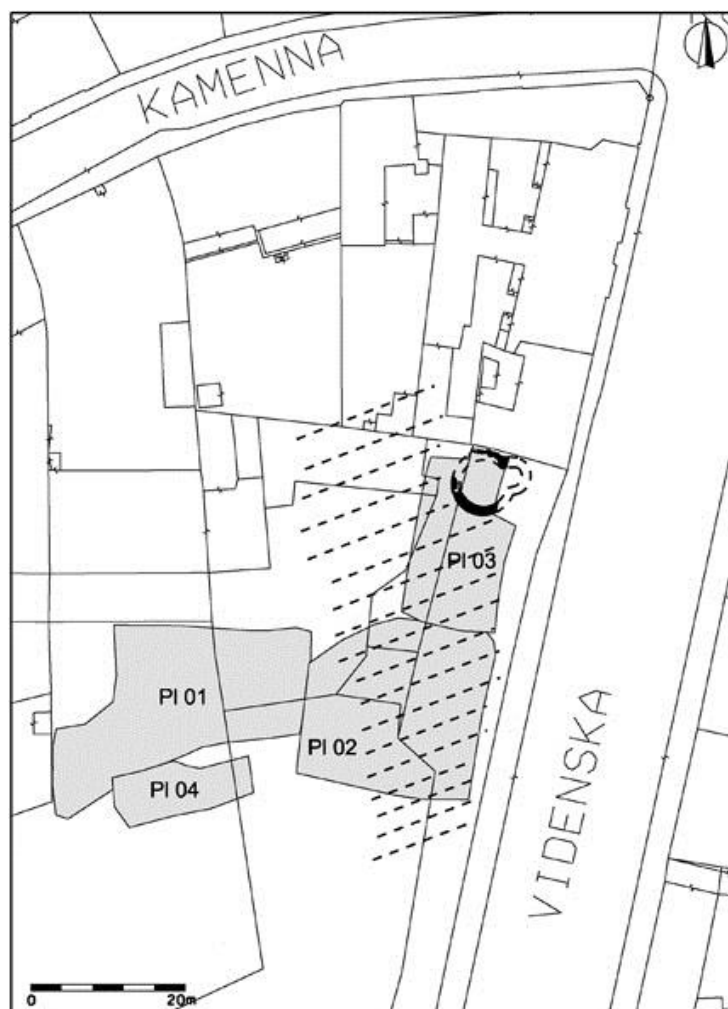
3.1. LOKALITY ARCHEOLOGICKÉHO VÝZKUMU

3.1.1. ULICE VÍDEŇSKÁ, BRNO

Vzorky byly odebrány v rámci záchranného archeologického výzkumu při ulici Vídeňská v Brně (místo vyznačené na obrázku 4 a 5) v průběhu roku 2013. Kromě paleolitického a pravěkého osídlení bylo v této lokalitě zjištěno ranně středověké pohřebiště přibližně z 2. poloviny 11. století. Z archeologického hlediska zde byl také učiněn významný objev pozůstatků rotundy, která byla součástí zmíněného pohřebiště, ale poměrně záhy zanikla a ani se neví, komu byla rotunda zasvěcena. Je však zřejmé, že se jedná o jednu z nejstarších církevních staveb na Moravě.



Obr. 4: Plánek města Brna z 19. století s vyznačeným místem archeologického naleziště (Dostupné z Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta: URL 2).



Obr. 5: Nákres archeologického naleziště v Brně při ulici Vídeňská. Šedě je vyznačena zkoumaná plocha a místa zvýrazněná šrafováním představují pohřebiště s vyznačeným půdorysem rotundy (Dostupné z Archaia Brno: URL 3).

Rotunda byla nalezena v místech, kde se dnes předpokládá, že leželo raně středověké Brno s tyčícím se přemyslovským hradem. Dřívější předpoklady naopak mluví spíše o petrovském návrší jako o počátku města. Archeologické a záchranné akce přinesly důkazy o tom, že původní přemyslovský hrad měl velmi výhodnou pozici a ovládal přechod přes řeku Svratku. V místě, kde byla rotunda nalezena má stát nový bytový dům, další záměry a pokročilejší výzkum této oblasti je však prozatím v jednání u stavebního úřadu a památkářů.

Z paleolitického období (starší doba kamenná) byla dochována kamenná štípaná industrie - soubor kamenných a kostěných nástrojů, množství různých zvířecích kostí (mamuta, nosorožce, krávy nebo koně), ale také například ohniště. Tyto nálezy vypovídají o osídlení brněnské oblasti již v období přibližně před 18 tisíci lety a s největší pravděpodobností oblast sloužila jako lovecká či zpracovatelská stanice. Moravská keramika se naopak dochovala zřejmě z neolitického (mladší doba kamenná) období. Co se týká

středověkého nálezu, tak do něj bez pochyby může být zahrnut objev přibližně jedné stovky hrobů. Zajímavé je, že 20 z těchto odhalených hrobů patřilo právě dvouletým i mladším dětem (URL3, URL4).

3.1.2. VÁCLAVSKÉ NÁMĚSTÍ, PRAHA

V letech 2007-2008 probíhal záchranný archeologický výzkum v trase výkopu pro ochranu STL plynovodu v dolní části Václavského náměstí č. p. 773/II až č. p. 785/II (Obr. 6). Po standardním začišťení stěn rozsáhlého výkopu po obou stranách STL plynovodu byla dále využita linie výkopu pro sondáž níže položených archeologických terénů. Vrty byly zhotoveny v pravidelných intervalech za pomoci ruční zarážecí sondy. Primárním cílem této akce bylo získat informace o geologickém podloží a charakteru souvrství. Ruční zarážecí sondou se podařilo získat vzorky antropogenních uloženin a podložních sedimentů.

Pod povrchem nynější vozovky byla nalezena dlažba, která se v délce výkopu měnila. Byly nalezeny velké říční valouny, lomová opuka a kameny, které sloužily ke zpevnění terénu. Dále byly nalezeny heterogenní soubory úlomků rezných hrncových nádob, zlomky kuchyňské keramiky, úlomky pálených střešních krytin a cihel, železné předměty (zejména hřeby) a kůže (Starec, ústní sdělení).



Obr. 6: Mapa části staré Prahy pocházející z 19. století. Červené šipky vymezují oblast archeologického výkopu (Dostupné z Historická mapa Prahy: URL 5).

Vzorky, které byly podrobeny paleoparazitologické analýze pocházely z vrtů, jejichž obsahem byly zejména deponované středověké odpadky antropogenního charakteru. Odebraný materiál pochází zřejmě z 1. poloviny 14. století, tedy z doby, kdy se na Václavském náměstí vyskytoval Koňský trh (tento název se užíval v období 1362-1848), který byl založen Karlem IV.

Na Koňském trhu, který byl druhým největším středověkým náměstím v Čechách, se obchodovalo hlavně s koňmi, dále se slámou, senem a obilovinami. Trh nebyl v této době vydlážděný a podle toho také vypadala kvalita povrchu. Trhovci se sem sjížděli z různých koutů země na týdenní trhy a obzvláště pak na výroční jarmarky. Na trh si také lidé chodili pro vodu do veřejné studny a blízko tržiště se nacházela dokonce i šibenice.

3.2. MATERIÁL

Celkově bylo v lokalitě pohřebiště odkryto zhruba 300 ostatků. Z vybraných koster a pozůstatků byly odebrány vzorky sterilním způsobem. Šlo o odběr z pánevní a bederní oblasti okolo páteře, kde bychom hledali pozůstatky střev. Hroby byly situovány směrem k rotundě, a proto se s největší pravděpodobností jedná o jedno z nejstarších pohřebišť s vlastní bohoslužebnou stavbou.

Paleoparazitologické analýze byly podrobeny vzorky z hrobů z Brna, viz seznam vzorků v tabulce I (Tab. I). Kostí a celé kostry byly postupně po jednotlivých vrstvách odkrývány archeology (Obr. 6, 7) a baleny do sterilních pytlů pro zbytkovou analýzu. Předtím byl však u některých hrobů odebrán vzorek z pánevní oblasti, který byl podroben důkladnější analýze. Tyto vzorky byly odebírány do uzavíratelných plastových krabiček, zabaleny do sáčků popsány identifikačním číslem hrobu. Před zpracováním byly uloženy v krabici a uskladněny v chladu.

Vzorky ze sond a vrtů z Václavského náměstí (Tab. II) byly odebírány do pytlů pro makrozbytkovou analýzu. Z těchto balení byly vybrány pouze ty vzorky pro paleoparazitologickou analýzu, které obsahovaly hodně organického materiálu. Vzorky připravené pro analýzu byly baleny do uzavíratelných igelitových sáčků a popsány identifikačním číslem sondy nebo vrtu. Před zpracováním byly také uloženy v chladicí místnosti. Šest vzorků z vrtů bylo zpracováno pro pylovou analýzu (u těchto vzorků se také předpokládá zachování vajíček parazitů v materiálu).

Tab. I: Seznam vzorků odebraných z hrobů na archeologickém nalezišti při ulici Vídeňská v Brně. Tyto vzorky byly podrobeny paleoparazitologické analýze.

Seznam vzorků z hrobů

1	H 4875 3	10	H 5830 3	19	H 5848 4	28	H 6820 3
2	H 4875 4	11	H 5830 4	20	H 5852 3	29	H 6820 4
3	H 4884 3	12	H 5833 3	21	H 5852 4	30	H 6834 3
4	H 4884 4	13	H 5833 4	22	H 5855 3	31	H 6834 4
5	H 5801 3	14	H 5836 3	23	H 5876 3	32	H 6856 3
6	H 5801 4	15	H 5836 4	24	H 5876 4	33	H 6856 4
7	H 5808 4	16	H 5846 3	25	H 6804 3	34	H 6863 3
8	H 5821 3	17	H 5846 4	26	H 6804 4	35	H 6863 4
9	H 5821 4	18	H 5848 3	27	H 6808 4	36	H 6881 4

Tab. II: Vzorky odebrané ze sond/vrtů na archeologickém nalezišti v Praze na Václavském náměstí, které byly podrobeny paleoparazitologické analýze.

Vzorky zpracované na pylovou analýzu

10/7	10/8	10/9	17/6	17/7	17/8
Pevný materiál sondy					
10/7	10/8	10/9	27/8	27/9	27/10
P1 plocha C vrt 17 – vzorky 6, 7, 8					
P1 plocha C vrt 23 – vzorky 7, 8, 9					



Obr. 7: Kosterní pozůstatky nalezené při záchranné archeologické akci Vídeňské ulici (Dostupné z Archaia Brno: URL 3).



Obr. 8: Kosterní pozůstatky z hrobu s identifikačním číslem H5836 (Dostupné z Archaia Brno: URL 3).

3.3. METODY

Celý obsah sáčku či krabičky se vzorkem byl promíchán a plastovou lžičkou byly odebrány přibližně 1-2 gramy vzorku do připravené zkumavky. Z každého sáčku a krabičky byla provedena analýza flotační a sedimentační technikou.

3.3.1. REHYDRATAČE

Před samotným zpracováním byly vzorky nejdříve podrobeny rehydrataci po dobu nejméně 72 hodin. Tento postup se používá pro zlepšení výsledků – rehydratací se půda rozvolní, oddělí a to umožní uvolnění více vajíček ze zeminy.

Do zkumavek s odebraným materiálem bylo přidáno 10 ml 0,5M Na_3PO_4 a celý obsah byl řádně promíchán. Abychom zabránili plísňovému a bakteriálnímu růstu, tak byl do vzorků přidán 10% formaldehyd. Zkumavky byly překryty alobalem a umístěny do lednice (5 °C). Rehydratované vzorky byly dále vyšetřovány koncentračními metodami – metodou flotační a sedimentační.

3.3.2. FLOTACE DLE KOZÁKA A MÁGROVÉ (KOMA)

Roztok KOMA byl složen z dílu roztoku A, dílu roztoku B a glycerolu.

Roztok A:

- 560 g ZnSO_4
- 1000 ml destilované vody

Roztok B:

- 920 g MgSO_4
- 1000 ml destilované vody

Postup:

- 1) vzorek rozmíchat a slít přes gázu do další zkumavky
- 2) centrifugovat 3 minuty (2000 otáček/minutu)
- 3) slít supernatant
- 4) sediment rozmíchat v malém množství roztoku KOMA

- 5) dolít zkumavku roztokem KOMA cca půl centimetru pod okraj (nezátkovat)
- 6) centrifugovat 3 minuty (2000 otáček/minutu)
- 7) mikrobiologickou kličkou přenést povrchovou blanku na podložní sklíčko a překrýt krycím sklíčkem o rozměrech 24x40x0,13 mm

Jiná flotační technika, která byla použita, byla metoda s roztokem SHEATER:

- 454 g sacharózy v granulové formě
- 355 ml destilované vody
- 6 ml 37% formaldehydu

Vzorky byly stáčeny na 5 minut při 2500 otáčkách za minutu (v bodě 2 a 6 u roztoku KOMA).

3.3.3. SEDIMENTACE AMS III

Roztok pro sedimentační metodu AMS III (o hustotě 1,08 g/ml):

- 115,2 g (bezvodého) Na_2SO_4
- 540 ml HCl
- 660 ml destilované H_2O

Roztok Tritonu:

- 16,5 ml Tritonu X-100 (isooctylphenoxypolyethoxyphenol)
- 33,5 ml destilované H_2O .

Postup:

- 1) centrifugovat 2 minuty (2000 otáček /minutu)
- 2) slít supernatant
- 3) sediment smíchat se 6 ml roztoku
- 4) slít přes gázu a nálevku do další zkumavky
- 5) přidat 3ml diethyletheru a 3 kapky Tritonu, uzavřít gumovou zátkou a protřepat
- 6) centrifugovat 2 minuty (2000 otáček /minutu)
- 7) opatrně slít supernatant

8) plastovou pipetou přenést 2 kapky sedimentu na podložní sklíčko a přiklopit krycím sklíčkem (24x40x0,13 mm)

3.3.4. MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ

Jednotlivé vzorky byly prohlíženy mikroskopem typu Olympus BX51. Při práci byly hlavně používány objektivy 20x a 40x a při tomto zvětšení byla pořízena veškerá fotodokumentace. Nalezená vajíčka parazitů byla určována podle charakteristických morfologických znaků a vlastní velikosti stanovené v programu Quick Photo 3.1.

3.3.5. IZOLACE PARAZITÁRNÍ DNA

DNA byla izolována kitem PSP Spin Stool Kit (Invitek)

Postup:

- 1) do zkumavky Ependorf navážit 200-400 mg čerstvého či zmraženého vzorku
- 2) přidat skleněné a zirkonové kuličky a připipetovat 0,8-1,2 ml Lysis Buffer P, vortexovat 1 minutu a rozbít homogenizátorem FastPrep 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s
- 3) inkubovat 10 minut při 95 °C v termobloku, protřepávat během inkubace
- 4) centrifugovat 1 minutu (11000 otáček/minutu)
- 5) přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 sekund vortexovat, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 3 minuty (14000 otáček/minutu)
- 6) supernatant přepipetovat do čistých zkumavek Ependorf, centrifugovat 3 minuty (14000 otáček/minutu)
- 7) do čistých zkumavek Ependorf přidat pipetou 25 µl Proteinase K a 400 µl supernatantu, lehce zvortexovat
- 8) inkubovat 10 minut při 70 °C, protřepávat během inkubace
- 9) přidat 200 µl Binding Buffer P, vortexovat
- 10) přendat pipetou veškerý objem do Spin Filter + Tube, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu (11000 otáček/minutu)
- 11) vylít odpad ze zkumavek Ependorf, napipetovat 500 µl Wash Buffer I, centrifugovat 1 minutu (11000 otáček/minutu)

- 12) vylít odpad ze zkumavek Ependorf, napipetovat 700 μ l Wash Buffer II, centrifugovat 1 minutu (11000 otáček/minutu)
- 13) vylít naposledy odpad a centrifugovat 4 minuty (11000 otáček/minutu)
- 14) na kolonku dát čistou zkumavku Ependorf, napipetovat 200 μ l Elution Buffer D nebo 200 μ l čisté deionizované vody temperované na 70 °C, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu (11000 otáček/minutu)
- 15) vzorky uskladnit v mrazáku pro následné použití v PCR

3.3.6. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Objem reakční směsi pro každou PCR byl 25 μ l. Cílem bylo prokázat přítomnost DNA parazitů *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* a *Trichuris trichiura*.

- *Enterocytozoon bieneusi*

program primární PCR 57 °C

program sekundární PCR 55 °C

Tab. III: Směs pro primární PCR.

Počet vzorků:		1x [μ l]	10x [μ l]
H₂O	-----	13,10	131,00
MgCl₂	(25 mM)	1,20	12,00
10xbuffer	-----	2,00	20,00
dNTP	(10 mM)	0,40	4,00
Primer forward	(10 μ M)	0,40	4,00
Primere reverse	(10 μ M)	0,40	4,00
Taq polymeráza	(1 U/1 μ l)	0,50	5,00
DNA	-----	2,00	20,00

Tab. IV: Směs pro sekundární PCR.

Počet vzorků:		1x [μl]	10x [μl]
H2O	-----	13,10	131,00
MgCl₂	(25 mM)	1,20	12,00
10xbuffer	-----	2,00	20,00
dNTP	(10 mM)	0,40	4,00
Primer forward	(10 μM)	0,40	4,00
Primere reverse	(10 μM)	0,40	4,00
Taq polymeráza	(1 U/1 μl)	0,50	5,00
DNA	-----	2,00	20,00

Primery pro primární PCR:

For – MSP - 1 TGA ATG KGT CCC TGT

Rev – MSP - 2A TCA ATA GCC GCT ACT

Primery pro sekundární PCR:

For – MSP - 3 GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT

Rev – MSP - 4A CCA AGC TTA TGC TTA AGT YMA ARG GGT

- *Encephalitozoon intestinalis*

program pro primární i sekundární PCR 58 °C

Tab. V: Směs pro primární PCR.

Počet vzorků:		1x [μl]	10x [μl]
H2O	-----	18,87	188,70
MgCl₂	(25 mM)	1,50	15,00
10xbuffer	-----	2,50	25,00
dNTP	(10 mM)	0,50	5,00
Primer forward	(10 μM)	0,50	5,00
Primere reverse	(10 μM)	0,50	5,00
Taq polymeráza	(1 U/1 μl)	0,63	6,30
DNA	-----	3,00	30,00

Tab. VI: Směs pro sekundární PCR.

Počet vzorků:		1x [μl]	10x [μl]
H2O	-----	16,87	168,70
MgCl₂	(25 mM)	1,50	15,00
10xbuffer	-----	2,50	25,00
dNTP	(10 mM)	0,50	5,00
Primer forward	(10 μM)	0,50	5,00
Primere reverse	(10 μM)	0,50	5,00
Taq polymeráza	(1 U/1 μl)	0,63	6,30
DNA	-----	2,00	20,00

Primery pro primární PCR:

For – MSP - 1 TGA ATG KGT CCC TGT

Rev – MSP - 2B GTT CAT TCG CAC TAC T

Primery pro sekundární PCR:

For – MSP - 3 GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT

Rev – MSP - 4B CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG

- *Trichuris trichiura*

program pro PCR 52 °C

Tab. VII: Směs pro PCR reakci.

Počet vzorků:		1x [μl]	12x [μl]
H2O	-----	13,87	166,44
MgCl₂	(25 mM)	1,50	18,00
10xbuffer	-----	2,50	30,00
dNTP	(10 mM)	0,50	6,00
Primer forward	(10 μM)	0,50	6,00
Primere reverse	(10 μM)	0,50	6,00
Taq polymeráza	(1 U/1 μl)	0,63	7,56
DNA	-----	5,00	60,00

Primery pro PCR reakci

For - TCCGAACGGCGGATCA

Rev - CTCGAGTGTCACGTCGTCCTT

3.3.7. ELEKTROFORÉZA

Agarová elektroforéza slouží k separaci fragmentů molekul DNA podle velikosti. Jednotlivé fragmenty putují gelem od anody ke katodě a nejdále doputují fragmenty o nejmenší velikosti. Pro elektroforézu byl použit 1% gel připravený z 0,4 g agarózy a 40 ml TAE pufru. Do každého takto připraveného gelu byl přidán 1 μ l ethidium bromidu, abychom mohli výsledky gelu prohlédnout pod UV světlem. Po ztuhnutí gelu a po jeho vložení do elektroforetické vany, byly do jednotlivých jamek nanесeny vzorky (20 μ l), pozitivní a negativní kontrola a 100 bp DNA ladder (4 μ l). Elektroforéza probíhala při 70 V po dobu 45 minut. Produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru ((Electronic UV transilluminator) při vlnové délce 302 nm.

4. VÝSLEDKY

4.1. MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ

Ve vzorcích z hrobů z brněnského naleziště bylo nalezeno pouze jedno vajíčko helminta a to konkrétně *Taenia* sp. Tedy více než 99 % vzorků bylo negativních. Tento velmi malý nález vedl k příbrání dalších vzorků pro paleoparazitologickou analýzu. Byly to vzorky z Václavského náměstí a v těchto vzorcích byly nálezy o něco zajímavější. Nicméně byly nalezeny pouze čtyři druhy střevních helmintů a nejpočetnějším nálezem bylo 10 vajíček *Trichuris trichiura* ve vzorku číslo 17/8 (pylová analýza).

4.1.1. VÍDEŇSKÁ, BRNO

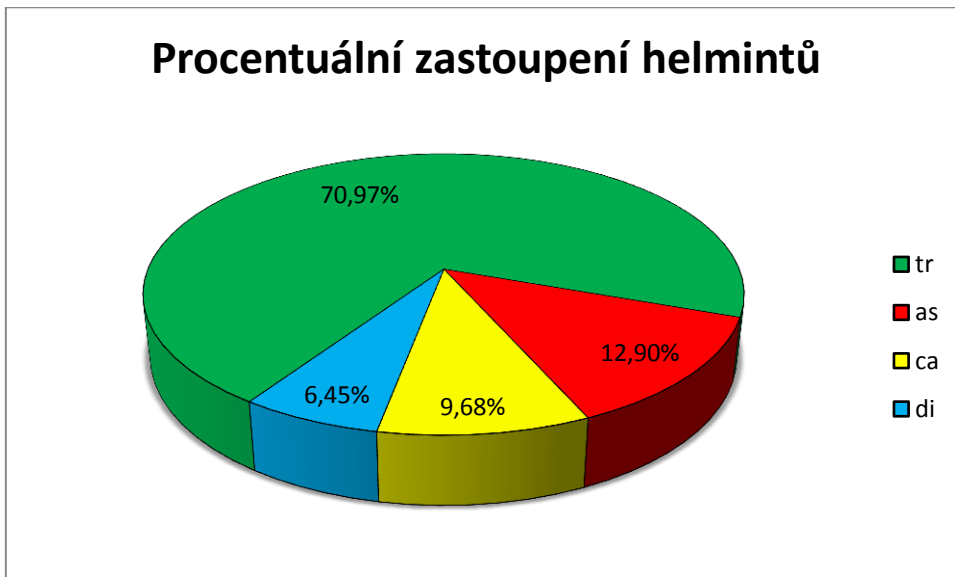
Tab. VIII: Přehled výsledků koncentrační analýzy vzorků z Brna.

Vzorek	Sedimentace S1	Sedimentace S2	Flotace	Vzorek	Sedimentace S1	Sedimentace S2	Flotace
H 4875 3	-	-	-	H 5848 4	-	-	-
H 4875 4	-	-	-	H 5852 3	-	-	-
H 4884 3	-	-	-	H 5852 4	-	-	-
H 4884 4	-	-	-	H 5855 3	-	-	-
H 5801 3	-	-	-	H 5876 3	-	-	-
H 5801 4	-	-	-	H 5876 4	-	-	-
H 5808 4	-	-	-	H 6804 3	-	-	-
H 5821 3	-	-	-	H 6804 4	-	-	-
H 5821 4	-	-	-	H 6808 4	-	-	-
H 5830 3	-	-	-	H 6820 3	-	-	-
H 5830 4	-	-	-	H 6820 4	-	-	-
H 5833 3	-	-	-	H 6834 3	-	-	-
H 5833 4	-	-	-	H 6834 4	-	-	-
H 5836 3	-	-	-	H 6856 3	-	-	-
H 5836 4	-	<i>Taenia</i> sp.	-	H 6856 4	-	-	-
H 5846 3	-	-	-	H 6863 3	-	-	-
H 5846 4	-	-	-	H 6863 4	-	-	-
H 5848 3	-	-	-	H 6881 4	-	-	-

4.1.2. VÁCLAVSKÉ NÁMĚSTÍ, PRAHA

Tab. IX: Výsledky koncentrační analýzy vzorků z Václavského náměstí, Praha. V závorce jsou uvedené počty nalezených vajíček.

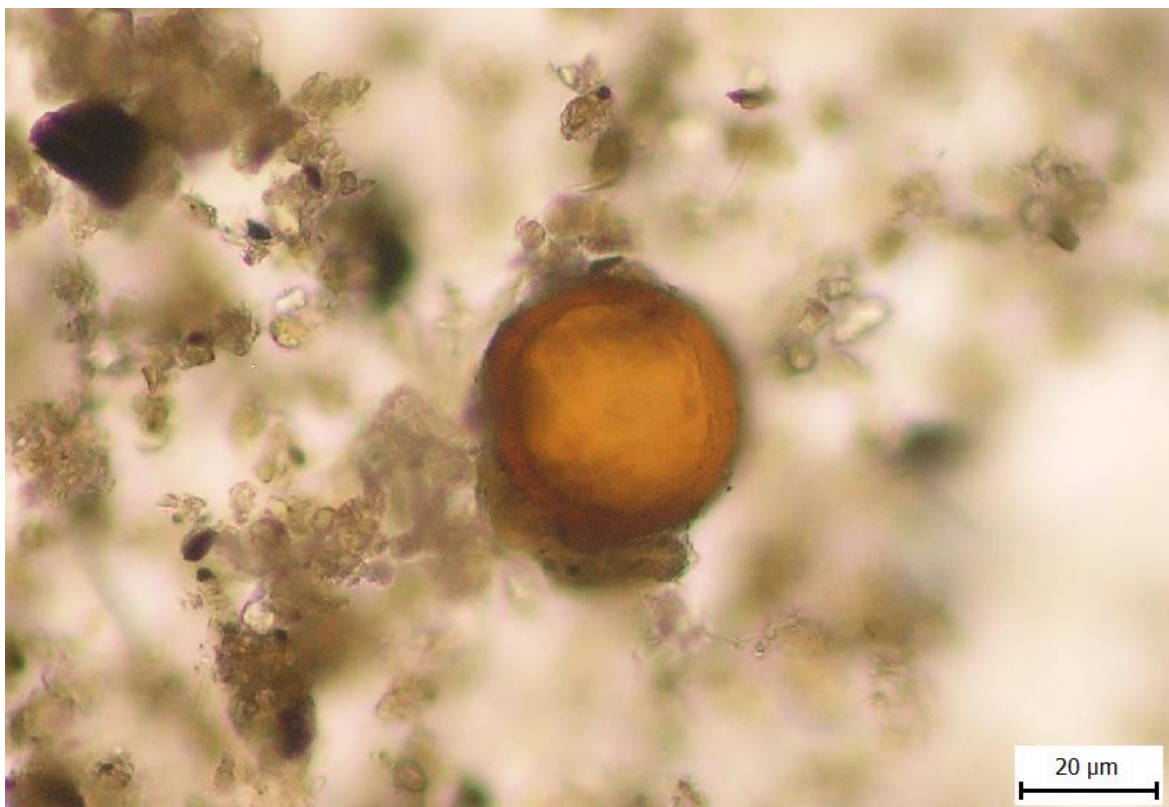
Vzorek - pylová analýza	Sedimentace S1	Sedimentace S2	Flotace
10/7	-	-	-
10/8	<i>Trichuris</i> (2)	-	-
10/9	-	-	-
17/6	-	-	-
17/7	-	<i>Calodium</i> (1)	-
17/8	-	<i>Trichuris</i> (10)	-
Vzorek - pevné sondy	Sedimentace S1	Sedimentace S2	Flotace
10/7	<i>Trichuris</i> (1)	-	-
10/8	<i>Trichuris</i> (1)	-	-
10/9	-	-	-
27/8	<i>Ascaris</i> (3)	<i>Trichuris</i> (1)	-
27/9	-	-	<i>Dicrocoelium</i> (2)
27/10	<i>Ascaris</i> (1)	-	-
6 (vrt 17)	-	-	-
7 (vrt 17)	-	<i>Ascaris</i> (1)	-
8 (vrt 17)	-	-	-
7 (vrt 23)	<i>Trichuris</i> (2)	<i>Calodium</i> (2)	-
8 (vrt 23)	-	<i>Trichuris</i> (4)	-
9(vrt 23)	-	<i>Trichuris</i> (1)	-



Obr. 9: Spektrum vajíček nalezených při paleoparazitologické analýze v archeologických vzorcích z Václavského náměstí. Význam zkratk: tr – *Trichuris trichiura*, as – *Ascaris lumbricoides*, ca – *Calodium hepaticum*, di – *Dicrocoelium dendriticum*

4.2. FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE

- CESTODA

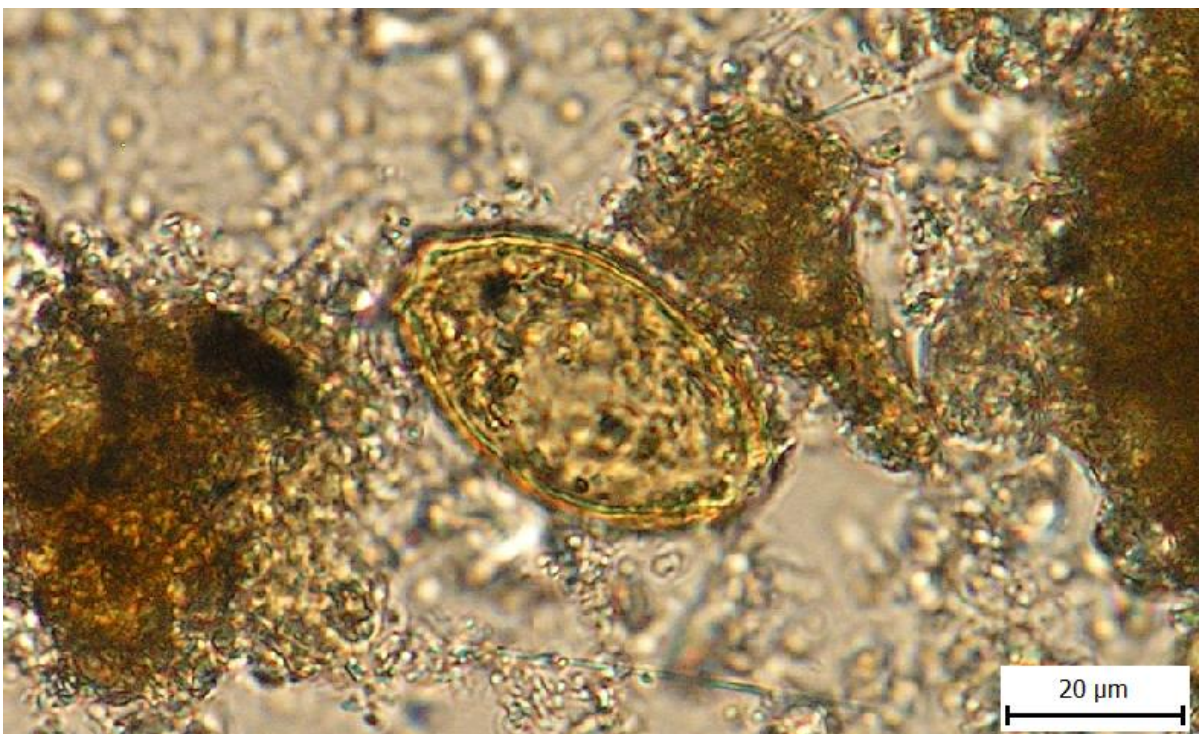


Obr. 10: *Taenia* sp. ze vzorku H5836 4, sedimentace. Kulaté vajíčko bez vnitřního obsahu.

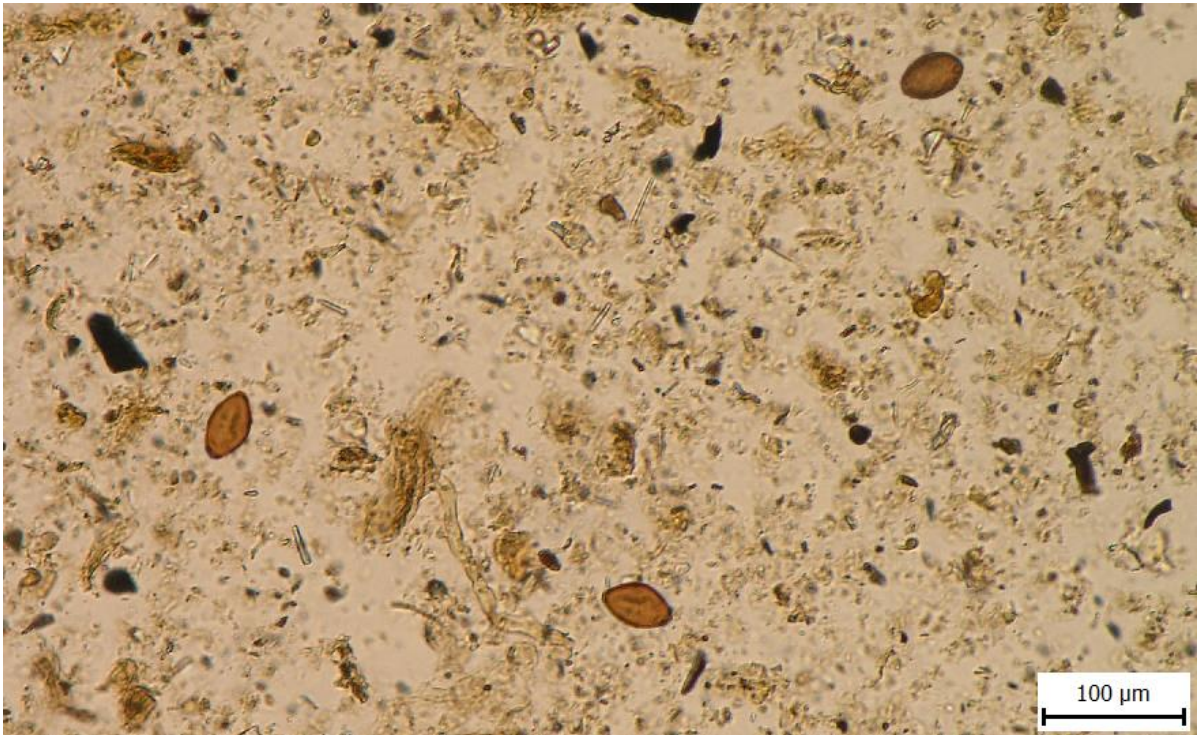
- NEMATODA



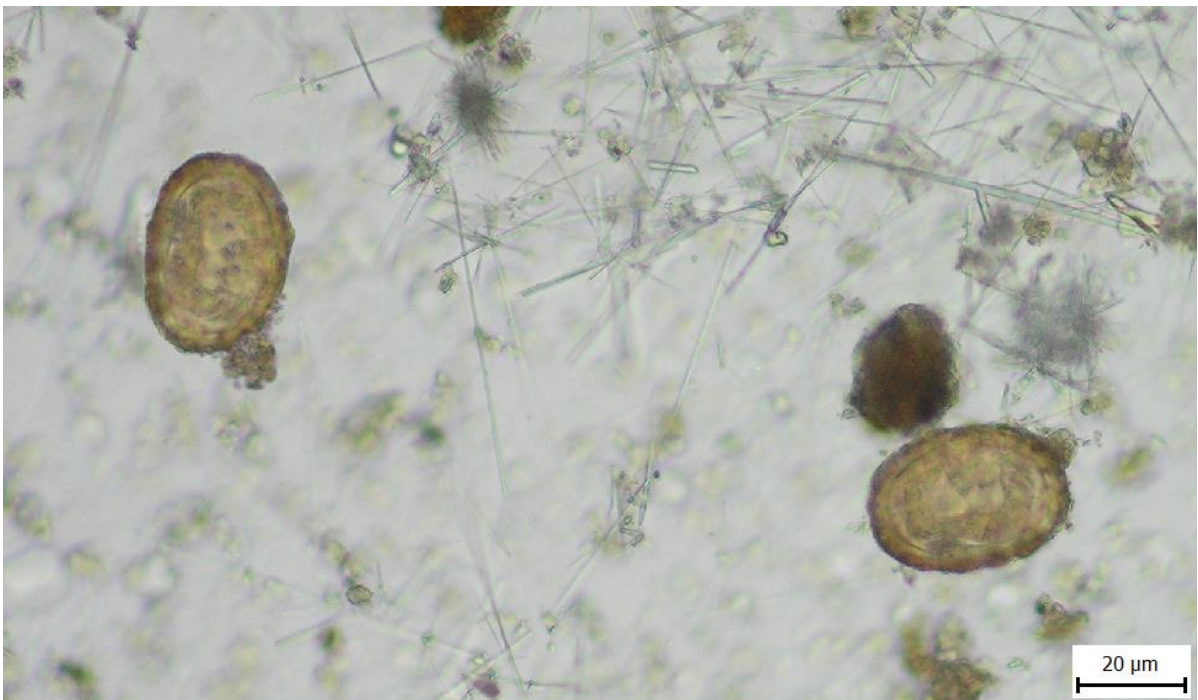
Obr. 11: *Trichuris trichiura* ze vzorku číslo 7 (vrt 23), sedimentace, vajíčko baz znatelného vnitřního obsahu.



Obr. 12: Vajíčko čeledi *Capillariidae*, pravděpodobně *Calodium hepaticum* ze vzorku číslo 17/7 (pylová analýza), sedimentace, bez znatelného vnitřního obsahu.



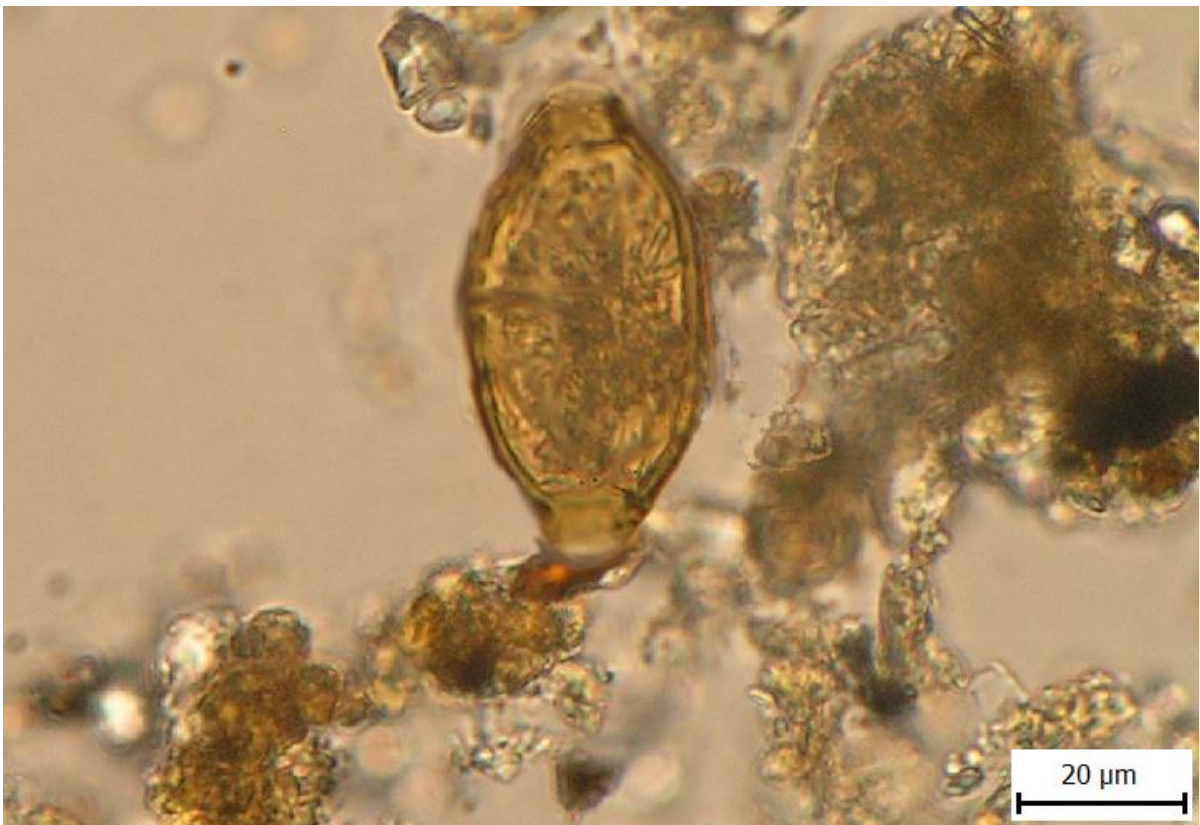
Obr. 13: Vajíčka *Trichuris trichiura* ze vzorku číslo 17/7 (pylová analýza), sedimentace.



Obr. 14: Vajíčka *Ascaris lumbricoides* ze vzorku číslo 27/8, sedimentace, bez mineralizovaného vnitřního obsahu.



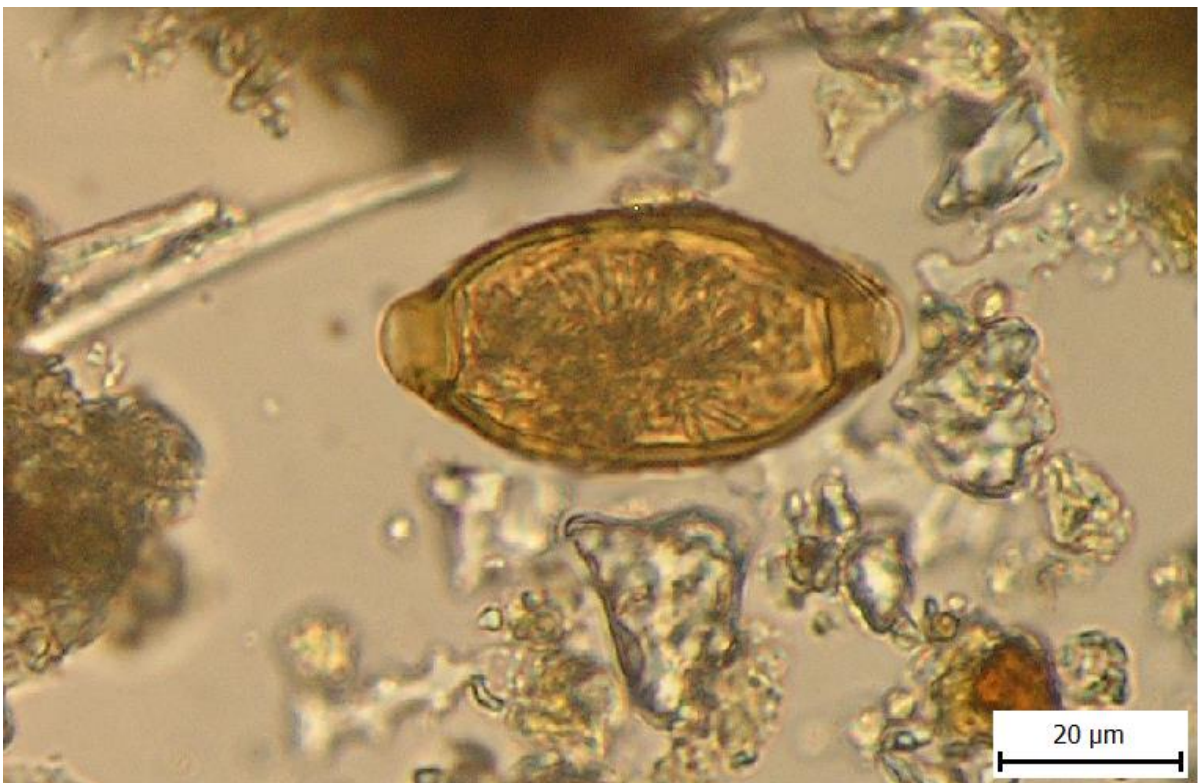
Obr. 15: *Ascaris lumbricoides* ze vzorku číslo 27/10, sedimentace.



Obr. 16: *Trichuris trichiura* ze vzorku číslo 10/8 (pevný materiál), sedimentace, mineralizovaný obsah.



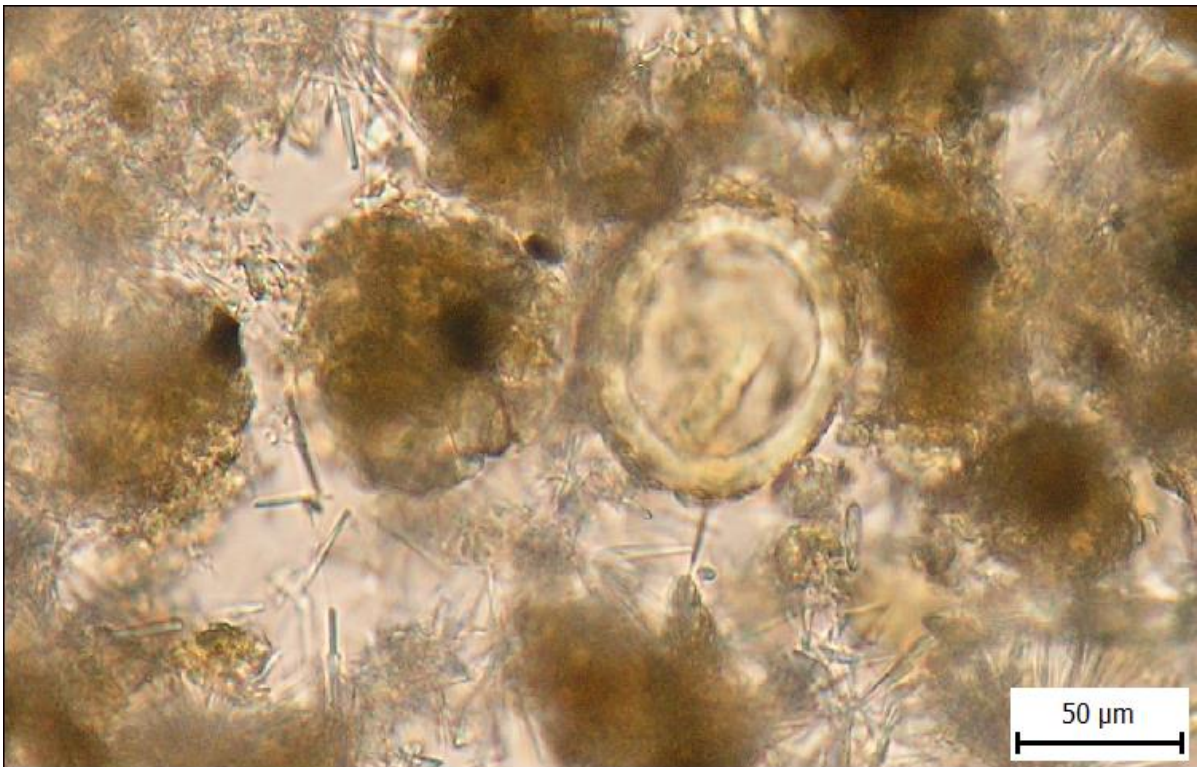
Obr. 17: *Trichuris trichiura* ze vzorku číslo 10/7 (pevný materiál), sedimentace.



Obr. 18: *Trichuris trichiura* ze vzorku číslo 10/8 (pylová analýza), sedimentace. Klasický citronový tvar s pólými zátkami, mineralizovaný obsah.



Obr. 19: *Trichuris trichiura* ze vzorku číslo 27/8 (pevný materiál), sedimentace, bez zřetelného vnitřního obsahu.



Obr. 20: *Ascaris lumbricoides* ze vzorku číslo 7 (vrt 17), sedimentace.



Obr. 21: Vajíčko čeledi *Capillariidae*, pravděpodobně *Calodium hepaticum* ze vzorku číslo 7 (vrt 23), sedimentace, bez znatelného vnitřního obsahu.

- TREMATODA



Obr. 22: Pravděpodobně *Dicrocoelium dendriticum* ze vzorku číslo 27/9, flotace.

4.3. MOLEKULÁRNÍ METODY

Pro molekulární analýzu vzorků z Brna jsem vybrala náhodně deset vzorků z toho jeden, ve kterém jsem našla vajíčko tasemnice, abych ověřila, zda se ve vzorcích nachází parazitární DNA (Tab. X). Vzorky byly testovány na přítomnost mikrosporidií – *Encaphalitozoon bieneusi*, *Enterocytozoon intestinalis* a na přítomnost hlístice *Trichuris trichiura*. Nicméně všechny vzorky z Brna vyšly negativně. U vzorků z Václavského náměstí také byla provedena PCR pro již zmíněné parazity (Tab. XI).

Tab. X: Výsledky polymerázové řetězové reakce pro vzorky z ulice Vídeňská ulice, Brno.

Číslo /identifikace vzorku	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Encaphalitozoon intestinalis</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
H5836 4	-	-	-
H5855 3	-	-	-
H5876 4	-	-	-
H58523	-	-	-
H5848 3	-	-	-
H6881 4	-	-	-
H6863 3	-	-	-
H6804 4	-	-	-
H6808 4	-	-	-
H5855 3	-	-	-

Tab. XI: Výsledky polymerázové řetězové reakce pro vzorky z Václavského náměstí, Praha.

Číslo /identifikace vzorku	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Encephalitozoon Intestinalis</i>	<i>Enterocytozoon bienewsi</i>
10/8 (pyl. analýza)	-	-	-
17/7 (pyl. analýza)	-	-	-
17/8 (pyl. analýza)	Ano	-	-
10/7	-	-	-
10/8	Ano	-	-
27/8	Ano	-	-
27/10	-	-	-
7 (vrt 23)	-	-	-
8 (vrt 23)	-	-	-
9 (vrt 23)	-	-	-

5. DISKUZE

Parazitismus se vyvinul ve stejné době, jako se objevil život na naší planetě. Na Zemi neexistují žádné organismy, u kterých bychom nenalezli parazity. Je s velkým podivem, že se přesto do poměrně nedávné doby předpokládalo, že paraziti po sobě nezanechávají žádné stopy v archeologickém materiálu. K vyvrácení tohoto „mýtu“ vedl Rufferův nález vajíček schistosom v ledvinách egyptské mumie. Tento nález stojí za vznikem nového oboru - paleoparazitologie, který je dnes velmi perspektivním oborem. Za pomoci mikroskopických a molekulárních technik se snaží prokázat přítomnost parazitů či jejich DNA v archeologickém materiálu.

Díky paleoparazitologii je možné zjistit a odhalit potřebné informace o evoluci parazitů a jejich hostitelů, o stravovacích návycích dřívějších populací, o jejich stylu bydlení, kultuře a v neposlední řadě také o jejich hygienických návycích a sanitárních zařízeních. Archeologický materiál, který je podrobován paleoparazitologické analýze, pochází především ze studní/jímek/vrtů, koprolitů, mumifikovaných těl, ale také hrobů, což může být doloženo mnohými pracemi a studii.

Ve své diplomové práci jsem analyzovala dva druhy materiálu. Prvním byl archeologický materiál odebraný při záchranné akci při ulici Vídeňská v Brně. Šlo o vzorky, které pocházely ze středověkých hrobů. Druhým analyzovaným materiálem byly organické sedimenty – deponovaný odpad ze sond a vrtů z Václavského náměstí z Prahy. Pro všechny vzorky jsem použila dvě koncentrační metody – sedimentaci a flotaci. Vhodné bylo i použití rehydratace, která se doporučuje pro lepší oddělení částic půdy či sedimentu. Díky použití fosforečnanu trisodného pak na mikroskopickém preparátu nacházíme mnohem méně rušivých shluků, než u preparátů připravovaných bez rehydratace. Výhodou je také fakt, že nedochází téměř k žádné změně velikosti vajíček helmintů, která napomáhá jejich přesné identifikaci (Goncavales et al. 2003, Confalonieri et al. 1985).

Z materiálu brněnského pohřebiště jsem našla za použití sedimentační techniky pouze jedno vajíčko tasemnice. Flotační metodou potom nebylo zaznamenáno žádné vajíčko. Nálezů z hrobů a pohřebišť je všeobecně jen velmi málo. Existuje pouze několik studií a výzkumů, které se zabývají stejným archeologickým materiálem – čili nálezy střečních parazitů v hrobech. Může to být i tím, že nejběžnější biologický materiál, který se zkoumá a podrobuje paleoparazitologické analýze jsou koprolity (zkamenělé/mineralizované výkaly), organické sedimenty z latrín nebo pánevní a břišní oblasti mumifikovaných těl (Bouchet et al. 2003b).

Fugassa a kolektiv se ve své studii z roku 2008 zabývali archeologickým materiálem kostí z 12. - 15. století, které už byly vyčištěny pro účely muzea. Přesto byla v organickém sedimentu kosti křížové nalezena vajíčka nematod identifikovaná jako *Capillaria* sp. a *Ascaris* spp. Novější studie z roku 2012 také popisuje paleoprazitologickou analýzu lidských ostatků ze hřbitova z 18. století v archeologické lokalitě Praça, Rio de Janeiro, Brazílie. Vzorky sedimentu z kostí zde byly odebrány z 10 koster a u 8 z nich byly pozitivní. Nejčastěji byla nacházena vajíčka *Trichuris trichiura* (26), vajíčko *Ascaris lumbricoides* bylo nalezeno pouze jedno, jedno vajíčko blíže neurčené tasemnice a 2 cysty jednobuněčných intestinálních parazitů (Jaeger et al. 2013a). Vzorky tedy byly výrazně bohatší na parazity, než vzorky z pohřebiště zkoumané v této diplomové práci. Lidské ostatky z tohoto naleziště měly představovat příležitost pro studium infekčních a parazitických chorob z oblasti Brna ze středověku. Nicméně osamoceným nálezem tasemnice nemohu potvrdit, ale ani vyvrátit možné nákazy v Brně v 11. stol. S vysokou pravděpodobností však jde o vajíčko lidské tasemnice, protože bylo nalezeno v pánevní oblasti lidské kostry.

Pro srovnání uvádím ještě další příklady paleoparazitologických analýz kosterních pozůstatků. Opět zmíním oblast Ria de Janeiro a to konkrétně oblast archeologického naleziště Nossa Senhora do Carmo (pohřebiště evropských dobyvatelů s kostelem). Vzorky z této lokality byly také odebrány z pánevní oblasti koster. Procentuální úspěšnost zde byla o něco nižší (pouze 2 pozitivní nálezy). Nalezena byla vajíčka *T. trichiura* (14) a jedno vajíčko *A. lumbricoides* (Jaeger et al. 2013b). Také se ukázala větší úspěšnost nálezů při použití sedimentační techniky, než při použití techniky flotační (Bouchet et al. 2003b, Jaeger et al. 2013b). Ve své bakalářské práci Myšková (2011) také analyzovala mimo jiné i několik vzorků z hrobů (5) z archeologického naleziště na Národní třídě v Praze. Vzorky byly klasicky odebrány z pánevní oblasti koster a analyzovány sedimentační a flotační technikou. Nicméně zde Myšková žádná vajíčka parazitů nenalezla.

Bylo mnohokrát potvrzeno, že infekce parazity *Ascaris lumbricoides* a *Trichuris trichiura* odráží špatné hygienické a sanitární podmínky. Jsou to nejčastěji se vyskytující paraziti v evropských archeologických lokalitách, která jsou datována do středověkých a historických období (Bouchet et al. 2003b).

V archeologických nálezech z Václavského náměstí v Praze jsem zaznamenala čtyři druhy parazitů – *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Calodium hepaticum* a *Dicrocoelium dendriticum*, přičemž *T. trichiura* byl nejhojněji nacházený druh. Nálezy jsou ve shodě s obdobnými studiemi a výzkumy v Evropě i ve světě (Gonçalves et al. 2003,

Rocha da et al. 2006, Eisen 2007, Sianto et al. 2005, Demmelier et al. 1988, Bouchet et al. 1995, Patrucco et al. 1983, Iñiguez et al. 2003). Dvě třetiny (12 z 18) všech zkoumaných vzorků vyšly pozitivně, což by mohlo svědčit o častém fekálně-orálním transportu parazitů, jako důsledek nízké hygieny ve středověkém období (Bouchet et al. 2003b).

Stejně jako u vzorků z brněnské lokality, tak i u těchto vzorků jsem použila metodu flotace a sedimentace. Metody flotace - SHEATER i KOMA se nejevily jako příliš úspěšné metody. Metodou flotace jsem našla pouze dvě vajíčka (*Dicrocoelium dendriticum*). V některých studiích je metoda flotace velmi výnosná, a proto je i nadále velmi hojně užívanou metodou (Reinhard et al. 1988, Gonçalves et al. 2003).

Ve srovnání s bakalářskou prací Myškové (2011) a diplomovou prací Bartošové (2009), které se sice také zabývaly paleoparazitologickou analýzou archeologického materiálu (ale z latrín a studní) z České Republiky, jsem našla ve svém zkoumaném materiálu výrazně méně vajíček parazitů (co se druhů i počtu týče). Archeologické naleziště na Václavském náměstí, kde bylo dříve tržiště a obchodovalo se tam se zvířaty a jiným zbožím, patří zřejmě mezi parazitologicky chudší oblast nebo se nedochovala velká část vajíček střevních parazitů, která jsem v materiálu zkoumala. Svou roli také jistě hrají náhodné fluktuace počtu parazitů při výběru konkrétní části vzorku podrobené paleoparazitologické analýze. Nicméně ve všech třech pracích byl nalezen největší počet vajíček právě *T. trichiura*.

Trichuris trichiura byl sice jednoznačně dominujícím parazitem ve zkoumaných vzorcích, nicméně musíme vzít v úvahu, že některá vajíčka parazitů jsou náchylnější k rozkladu a některé druhy parazitů produkují více a jiné méně vajíček. Proto se také nemusela v archeologickém materiálu vůbec dochovat. Některá vajíčka jako například *Enterobius vermicularis* jsou tenkostěnná, a to by mohlo být hlavním důvodem jejich malého nálezu v archeologickém materiálu (Reinhard 1992).

Poměrně hodně nacházeným parazitem v archeologickém materiálu je *Capillaria* spp. (Bouchet 1997, Dittmar et Teegen 2003, Fernandes et al. 2005). Ve zkoumaném materiálu jsem s největší pravděpodobností našla vajíčka *Calodium hepaticum*. Jde o parazita, který pro svůj vývoj využívá hlodavce – myši a krysy. Takoví živočichové jsou pro středověk velmi typičtí. *Calodium hepaticum* je sice parazit, který může parazitovat i v lidských játrech, ale infekční vajíčka se dostávají do střev žlučovými cestami a pak jsou vylučována společně se stolicí.

Dalším parazitem, kterého jsem našla ve vzorcích z Václavského náměstí, byla škrkavka *A. lumbricoides*. Tento parazit je také velmi často nacházený v koproliitech

archeologického materiálu (Bouchet et al. 2003c, Gonçalves et al. 2003, Leles et al. 2008). Podle dat uvedených ve studii, kterou provedl Gonçalves a jeho kolektiv (2003), vyplývá, že vajíčka *T. trichiura* a *A. lumbricoides* byla nalezena přibližně v 80 % evropských archeologických nalezištích. Oba tyto druhy produkují větší množství silnostěnných vajíček, což by mohlo být důvodem jejich častého zachování.

Nález vajíček motolice *Dicrocoelium dendriticum* můžeme poměrně jednoduše interpretovat. Jedná se s největší pravděpodobností o zvířecí motolici, protože se na trhu obchodovalo se zvířaty. Tato motolice se velmi často nachází u přežvýkavců, ale velmi zřídka u lidí. Nicméně existují i případy pravého parazitismu u lidí, ale většina případů je pseudoparazitismus. Když máme k dispozici k analýze pouze koprolity, tak prakticky nemůžeme rozlišit pravou infekci a pseudoparazitismus u lidí. Mohou to být původem zvířecí vajíčka parazitů, kdy člověk pozře játra infikovaného přežvýkavce (Taylor 1955, Gonçalves et al. 2003).

Ve vzorcích jsem nenalezla žádné vajíčko tasemnic (*Taenia* spp.), nicméně zkoumané vzorky pocházejí z tržiště, kde byl uložený různý organický materiál - lidského i zvířecího původu. Nemůžeme tedy potvrdit, zda se obyvatelstvo v této oblasti živilo syrovým hovězím či vepřovým masem (Bouchet et al. 2003b). Je však známo, že se v Čechách nerozšířil zvyk konzumace syrového či polosyrového masa (což přetrvává i do dnes), jak bývalo zvykem u francouzské šlechty a jiných bohatých měšťanů (Rocha da et al. 2006).

Ve vzorcích jsem také nepotvrdila přítomnost parazitů *Toxocara canis/cati*, kteří jsou také nacházeni v archeologickém materiálu. Nález takovýchto parazitů by potvrdil přítomnost psů a koček v dané lokalitě, i když je známo, že se tato zvířata běžně vyskytovala ve městech, ale také i v měšťanských domech (Vondruška 2007). Je velmi pravděpodobné, že domácí mazlíčci vyprazdňovali střevní obsah venku a na rozdíl od lidských výkalů se jejich trus nedostal mezi deponovaný odpad.

Období středověku je charakteristické rychlým nárůstem populace spojeným s rozšiřováním měst a nízkou úrovní hygienických podmínek, které umožnily šíření infekcí a parazitárních nemocí mezi lidskou i zvířecí populací (Jaeger et al. 2013). Následkem rychlého růstu populace došlo i ke zvýšení hustoty obyvatel v příbytcích, a tím i ke zmenšení životního prostoru. Často totiž žily v příbytku až tři generace (Rocha da et al. 2006). Mytí nepatřilo ke každodenní hygieně ve středověku. Důvodem mohl být zaprvé nedostatek vody, protože lidé neměli často vlastní studnu (tu si mohli dovolit pouze zámožní obyvatelé) a museli proto chodit pro vodu do místní kašny na náměstí. Zadruhé se ve středověku

tradovala představa o tom, že umývání vodou může oslabovat tělo a celkově škodit lidskému organismu (Vondruška 2007). Proto lidé byli v dřívější době více zamořeni parazity.

Co se týká potravin, které mohou představovat riziko nákazy parazity, tak jsou to zejména všechny potraviny, které jsou nedostatečně tepelně upravené (ať už je to kontaminovaná zelenina nebo maso). Člověk se může infikovat i zemědělskými plodinami, které byly hnojené lidskými/zvířecími výkaly nebo zavlažované kontaminovanou vodou. Významným zdrojem parazitárních infekcí byla v dřívějších dobách (a stále zůstává) kontaminovaná pitná voda.

Pozitivní nálezy v sondách/vrtech na Václavském náměstí v Praze, které jsou ve shodě s obdobnými výsledky ve světě, potvrzují správnost použité metody. V organickém sedimentu z hrobů z archeologického naleziště z Brna tedy vajíčka parazitů zřejmě nebyla, nedochovala se nebo jsem neměla takové štěstí, při vybírání konkrétní části vzorku pro paleoparazitologickou analýzu.

Jako perspektivní metoda se v dnešní době samozřejmě jeví izolace DNA a detekce DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pomocí těchto metod jsem se snažila ověřit/ případně pouze zjistit přítomnost DNA parazitů a to konkrétně *Trichuris trichiura*, *Ecephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi*. Tři vzorky, které se jevíly pozitivní na *T. trichiura* v elektroforéze byly zaslány na sekvenaci, abychom tento nález mohli opravdu potvrdit. Dva zmíněné druhy mikrosporidií se nepodařilo vůbec prokázat (i když bývají spory těchto parazitických hub velmi rezistentní). Například Myšková a kolektiv (2014) v publikované studii prokázali přítomnost mikrosporidie *E. intestinalis* právě touto metodou i se stejnými primery. Vyšly jim tři pozitivní vzorky.

Při využití dnešních moderních technologií je možné také sekvenovat část genomu parazita z izolované DNA a tím konkrétně určit o jaký druh se jedná. Snaha je také o amplifikaci celkové DNA ze vzorku. Problémem těchto metod však může být kontaminace či určitý stupeň degradace aDNA. Novější metody (tzv. multiplex DNA) umožňují využití více primerů v jedné PCR reakci, které jsou zaměřeny na různé sekvence v jednom vzorku obsahující izolovanou DNA. V následných reakcích je pak možné zvolit pouze jednu určitou sekvenci pro amplifikaci (Bisset et al. 2014).

6. SOUHRN

- Na archeologickém nalezišti při ulici Vídeňská v Brně z druhé poloviny 11. století bylo za pomoci paleoparazitologické analýzy nalezeno pouze jedno vajíčko parazita *Taenia* sp.
- Vzorky z Václavského náměstí v Praze z první poloviny 14. století obsahovaly mnohem více parazitů, než jsem našla v Brně. Šlo o druhy tenkohlavce *Trichuris trichiura*, kapilárie *Calodium hepaticum*, škrkavky *Ascaris lumbricoides* a motolice *Dicrocoelium dendriticum*.
- Metodou PCR se podařilo zjistit přítomnost DNA parazita *Trichuris trichiura* ve třech vzorcích pocházejících z vrtů archeologického naleziště v Praze. Tyto tři vzorky byly ještě zaslány na sekvenaci, abychom mohli tento nález potvrdit.
- Metodou PCR nebyla zjištěna přítomnost DNA mikrosporidií *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi* v archeologickém materiálu.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADENUSI A. A., OGUNYOMI E. O. A. (2003) – Relative prevalence of the human hookworm species, *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* in an urban community in Ogun State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 2 (11): 470-473.

ALI S. A., HILL D. R. (2003) – *Giardia intestinalis*. *Current opinion in infectious diseases*, 16 (5): 453-60.

ANASTASIOU E., MITCHELL P. D. (2013) – Human intestinal parasites from a latrine in the 12th century Frankishcastle of Saranda Kolones in Cyprus. *The International Journal of Paleopathology* 3: 218-223.

ANDERSON T. J. C., ROMERO-ABAL M. E., JAENIKE J. (1993) – Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *The Journal of Parasitology* 107: 319-334.

ARAÚJO A., JANSEN A. M., BOUCHET F., REINHARD K., FERREIRA L. F. (2003) – Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I): 5-11.

ASHFORD R. W., CREWE W. H. (1998) – The Parasites of Homo Sapiens: An Annotated Checklist of the Protozoa, Helminths and Arthropods for which We are Home. *Liverpool School of Tropical Medicine* 128 p.

ATTIA R. A. H., TOLBA M. E. M., YONES D. A., BAKIR H. Y., ELDEEK H. E. M., KAMEL S. J. (2012) – *Capillaria philippinensis* in Upper Egypt: Has It Become Endemic? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (1): 126-133.

BALLAL M., MARTENA S. (2012) – An unusual presentation of diarrhea by *Fasciolopsis Buski*, *Taenia* Spp. and *Aspergillus* Spp. In a retro positive patient. A first case report from rural coastal India - Manipal, Karnataka. *Annals of tropical medicine and public health* 5 (5): 543-545.

BARTOŠOVÁ L. (2009) – Paleoparazitologická analýza organických sedimentů archeologického naleziště v Chrudimi. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, diplomová práce* 55 p.

- BARTOŠOVÁ L., DITRICH O., BENEŠ J., FROLÍK J., MUSIL J. (2010) – Paleoparasitological findings in medieval and early modern archaeological deposits from Hradebni Street, Chrudim, Czech Republic. *Interdisciplinaria Archaeologica – Natural Sciences in Archaeology* 2: 27-38.
- BETHONY J., BROOKER S., ALBONICO M., GREIGER S. M., LOUKAS A., DIEMERT D., HOTEZ P. J. (2006) – Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet* 367: 1521-32.
- BISSET S. A., KNIGHT J. S., BOUCHET C. L. G. (2014) – A multiplex PCR-based method to identify strongylid parasite larvae recovered from ovine faecal cultures and/or pasture samples. *Veterinary Parasitology* 200 (1–2): 117-127.
- BOUCHET F. (1995a) – Recovery of helminth eggs from archaeological excavations of the Grand Louvre (Paris, France). *The Journal of Parasitology* 81: 785-787.
- BOUCHET F., PAICHELER J. C. (1995b) – Presumption of Bilharziose on an archaeological site from XV century in Montbéliard (Doubs, France). *CR Academy Science* 318: 811-814.
- BOUCHET F., PÉTREQUIN P., PAICHELER J. C., DOMMELIER S., (1995c) – Première approche paléoparasitologique du site néolithique de Chalain (Jura, France). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 88: 265-268.
- BOUCHET F. (1997) – Intestinal capillariasis in neolithic inhabitants of Chalain (Jura, France). *The Lancet* 349: 256.
- BOUCHET F., LEFEVRE C., WEST D., CORBETT D. (1999) – First paleo-parasitological analysis of a midden in the Aleutian Island (Alaska): results and limits. *The Journal of Parasitology* 85: 369-372.
- BOUCHET F., HARTE S., PAICHELER J. C., ARAÚJO A., FERREIRA L. F. (2002) – First recovery of *Schistosoma mansoni* eggs from latrine in Europe (15-16th century). *The Journal of Parasitology* 88 (2): 404-405.
- BOUCHET F., ARAÚJO A., HARTE S., CHAVES S. M., DUARTE A. N., MONNIER J. L., FERREIRA L. F. (2003a) – *Toxocara canis* (Werner, 1782) eggs in the Pleistocene site of Menez-Dregan, France (300,000-500,000 years before present). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I): 137-139.

- BOUCHET F., GUIDON N., DITTMAR K., HARTER S., FERREIRA L. F., CHAVES S. M., REINHARD K., ARAÚJO A. (2003b) – Parasite remains in archeological sites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I): 47-52.
- BOUCHET F., HARTER S., LE BAILLY M. (2003c) – The state of the art of paleoparasitological research in the Old World. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I): 95-101.
- BUNDY D. A. P., COOPER E. S. (1989) – Trichuris and trichuriasis in humans. *Advances in Parasitology* 28: 107-73.
- CALLEN E. O., CAMERON T. W. M. (1960) – A prehistoric diet revealed in coprolites. *New Scientist* 8: 35–40.
- CARNEY W. P. (1991) – Echinostomiasis - a snail-borne intestinal trematode zoonosis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 22: 206–211.
- CHAI J. (2009) – Echinostomes in humans. The Biology of Echinostomes: from the molecule to the community. *New York: Springer* 147-184.
- CHUNLERTRITH K., MAIRIANG P., SUKEEPAISARNJAROEN W. (1992) – Intestinal capillariasis: a cause of chronic diarrhea and hypoalbuminemia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 23: 433-436.
- CONFALONIERI U. E., RIBERO-FILHO B. M., FERREIRA L. F., ARAÚJO A. (1985) – The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of Trichuris Trichiura eggs. *Paleopathology Newsletter* 51: 9-11.
- COOK G. C. (1994) – *Enterobius vermicularis* infection. *Journal Gut* 35 (9): 1159–1162.
- DEELDER A. M., MILLER R., JONGE De N., KRIJGER F. (1990) – Detection of schistosome antigen in mummies. *The Lancet* 335: 724-725.
- DITTMAR K., TEEGEN W. R. (2003) – The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4500 year old archeological site in the Saale-Unstrut valley, Germany. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I):141-143
- DOMMELIER S., BENTRAD S., PAICHELER J. C., PETREQUIN P., BOUCHET F. (1998) – Parasitoses liées a l' alimentation chez les populations néolithiques du lac de Chalain (Jura, France). *Journal of experimental Antropology and zoology* 27: 41-49.

- DORNY P., PRAET N. (2007) – *Taenia saginata* in Europe. *Veterinary Parasitology* 149: 22–24.
- DRYDEN M. W., PAYNE P. A., RIDLEY R., SMITH V. (2005) - Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Veterinary Therapeutics* 6 (1): 15-28.
- EISEN J. (2007) – Environmental shotgun sequencing: Its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *Public Library of Science, Biology* 5 (3): 82-85.
- ERICSSON CH. D., STEFFEN R., SIDDIQUI A. A., BERK S. L. (2001) – Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clinical Infectious Diseases* 33 (7): 1040-1047.
- FAULKNER C. T., PATTON S., JOHNSON S. S. (1989) – Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *The Journal of Parasitology* 75: 461-463.
- FERREIRA L. F., RIBEIRO B., ARAUJO A., CONFALONIERI U., NUNEZ L. (1984) – *Enterobius vermicularis* eggs in precolumbian human coprolites from Chile. *Paleopathology Newsletter* 46: 4-5.
- FERNANDES A., FERREIRA L. F., GONÇALVES M. L. C., BOUCHET F., KLEIN C. H., IGUCHI T., SIANTO L., ARAÚJO A (2005) – Intestinal parasite analysis in organic sediments collected from a 16th-century Belgian archeological site. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro* 21(1): 329-332.
- FLORENZANO A., MERCURI A. M., PEDERZOLI A., TORRI P., BOSI G., OLMI L., RINALDI R., MAZZANTI B. (2012) – The Significance of Intestinal Parasite Remains in Pollen Samples from Medieval Pits in the Piazza Garibaldi of Parma, Emilia Romagna, Northern Italy. *Geoarchaeology: An International Journal* 27: 34-47.
- FOUANT M. M., ALLISON M., GERSZTEN E., FOCACCI G. (1982) – Intestinal parasites among pre-Columbian Indians. *The Journal of Chilean Anthropology* 9: 285-299.
- FUGASSA M., SARDELLA N. H., GUICHÓN R. A., DENEGRI G. M., ARAUJO A. (2008) – Paeoparasitological analysis applied to museum-curated sacra from Meridional Patagonian collections. *Journal of Archaeological Science*. 35 (5): 1408-1411.
- GONÇALVES M. L. C., ARAÚJO A., DUARTE R., da SILVA J. P., REINHARD K., BOUCHET F., FERREIRA L. F. (2002) – Detection of *Giardia duodenalis* antigen in

- coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 640-643.
- GONÇALVES M. L. C., ARAÚJO A., FERREIRA L. F. (2003) – Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I): 103-118.
- GONÇALVES M. L. C., SILVA DA V. L., ANDRADE DE C. M., KARL REINHARD, ROCHA DA G. CH., LE BAILLY M., BOUCHET F., FERREIRA L. F., ARAUJO A. (2004) – Amoebiasis distribution in the past: first steps using an immunoassay technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (2): 88-91.
- GONZÁLEZ L. M., MONTERO¹ E., HARRISON L. J. S., PARKHOUSE R. M. E., GARATE T. (2000) – Differential Diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* Infection by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2): 737-744.
- GRACZYK T. K., GILMAN R. H., FRIED B. (2001) – Fasciolopsiasis: is it a controllable food-borne disease? *The Parasitology Research* 87 (1): 80-83.
- GRYSEELS B., POLMAN K., CLERINX J., KESTENS L. (2006) – Human schistosomiasis. *The Lancet* 368 (9541): 1106-1118.
- HERRMANN B. (1985) – Parasitologisch - Epidemiologische Auswertungen Mittelalterlicher Kloaken. *Archäologie des Mittelalters* 13: 131-161.
- HORNE P. D., LEWIN P. K. (1977) – Electron microscopy of mummified tissue: autopsy of an Egyptian mummy. *Canadian Medical Association Journal* 117: 472-473.
- HORNE P. D., REDFORD S. (1995) – Aspergillosis and dracunculiasis in mummies from the tomb of Parannefer. *The Paleopathology Newsletter* 92: 10-12.
- HORNE P. D., TUCK J. A. (1996) – Archaeoparasitology at a 17th century colonial site in Newfoundland. *The Journal of Parasitology* 82: 512-515.
- IÑÍGUEZ A. M., REINHARD K., ARAÚJO A., FERREIRA L. F., VICENTE A. C. P. (2003) – *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south American human coprolites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98 (Suppl. I): 67-69.

- JAEGER L. H., TAGLIORETTI V., FUGASSA M. H., DIAS O., NETOC J., IÑIGUEZ A. M. (2013a) – Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica* 125: 282-286.
- JAEGER L. H., TAGLIORETTI V., DIAS O., IÑIGUEZ A. M. (2013b) – Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Paleopathology* 3: 214-217.
- JAEGER L. H., IÑIGUEZ A. M. (2014) – Molecular Paleoparasitological Hybridization Approach as Effective Tool for Diagnosing Human Intestinal Parasites from Scarce Archaeological Remains. *PLoS ONE* 9 (8): 1-5.
- JANSEN J., BOERSEMA J. H. (1972) – Helminth eggs from the latrines of the Olofskapel Gatehouse, Amsterdam. *The Paleopathology Newsletter* 2: ab7-ab8
- JANSEN Jr. J., OVER H. J. (1966) – Observations on helminth infections in a roman army-camp. *Proceedings of the First International Congress of Parasitology*, Italy 791 p.
- JIMENEZ J. A., RODRIGUEZ S., MOYANO L. M., CASTILLO Y., GARCÍA H. H. (2010) – Differentiating Taenia eggs found in human stools: does Ziehl-Neelsen staining help? *Tropical Medicine & International Health* 15 (9): 1077-1081.
- JONES A. K. G. (1982) – Human parasite remains: prospects for a quantitative approach. *Council for British Archaeology* 43: 66-70.
- LE BAILLY M., GONÇALVES M. L. C., HARTER-LAILHEUGUE S., PRODÉO F., ARAÚJO A., BOUCHET F. (2008) – New finding of *Giardia intestinalis* (Eukaryote, Metamonad) in Old World archaeological site using immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 103 (3): 298-300.
- LE BAILLY M., BOUCHET F. (2013) – Diphyllbothrium in the past: Review and new records. *International Journal of Paleopathology* 3 (3): 182-187.
- LEE E. B., SONG J. H., PARK N. S., KANG B. K., LEE H. S., HAN Y. J., KIM H-J., SHIN E-H., CHAI J-Y. (2007) – A case of *Diphyllbothrium latum* infection with a brief review of diphyllbothriasis in the republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology* 45 (3): 219-223.

- LELES D., ARAÚJO A., FERREIRA L. F., VICENTE A. C. P., IÑÍGUEZ A. M. (2008) – Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: New scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 106-108.
- LELES D., GARDNER S., REINHARD K., IÑÍGUEZ A. ARAÚJO A. (2012) – Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasites & Vectors* 5 (42): 1-7.
- LELES D., CASCARDO P., FREIRE A. S., MALDONADO JR. A., SIANTO L., ARAÚJO A. (2014) – Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. *Parasitology International* 63 (4): 646-649.
- LIANGBIAO C., TAO H. (1981) – Scanning electron microscopic view of parasites worm ova in an ancient corpse. *Acta Academia Sinicae* 3: 64-65.
- LIUA G-H., WUA CH-Y., SONGA H-Q., WEID S-J., XUA M-J., LINC R-Q., ZHAOE G-H., SI-YANG HUANGA S-Y., ZHUA X-Q. (2012) – Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492 (1): 110-116.
- MOORE P. D. (1981) – Life seen from a medieval latrine. *Nature* 294: 614-617.
- MYŠKOVÁ E. (2011) – Paleoparazitologická analýza organických sedimentů archeologického naleziště na Národní třídě, Praha. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce* 49p.
- MYŠKOVÁ E., DITRICH O., SAK B., KVÁČ M., CYMBALAK T. (2014) – Detection of Ancient DNA of *Encephalitozoon intestinalis* (Microsporidia) in Archaeological Material. *The Journal of Parasitology* 100 (3): 356-359.
- OEGGL K. (2009) – The significance of the Tyrolean Iceman for the archaeobotany of Central Europe. *Vegetation History and Archaeobotany* 18: 1-11.
- OKHYUSEN P. C. (2001) – Traveler's Diarrhea Due to Intestinal Protozoa. *Clinical Infectious Diseases* 33: 110-4.
- ORTEGA Y. R., BONAVIA D. (2003) – Cryptosporidium, Giardia and Cyclospora in ancient Peruvians. *The Journal of Parasitology* 89: 635-636.
- PATRUCCO R., TELLO R., BONAVIA D. (1983) – Parasitological studies of coprolites of pre-Hispanic Peruvian populations. *Current Anthropology* 24: 393-394.

- PEDUZZI R., PIFFARETTI J. C. (1983) – *Ancylostoma duodenale* and the Saint Gothard anaemia. *British Medical Journal* 287: 1942-1945.
- PIKE A. W., PLATT C., COLEMAN-SMITH R. (1975) – Parasite eggs. Excavations in Medieval Southampton. *Leicester University Press, Leicester* 347-348.
- REINHARD K. J. (1992) – Parasitology as a tool for the archaeologist. *The American Antiquity* 57 (2): 231-245.
- REINHARD K. J., HEVLY R. H., ANDERSON G. A. (1987) – Helminth remains from prehistoric indian coprolites on the colorado plateau. *The Journal of Parasitology* 73 (3): 630-639.
- REINHARD K. J., CONFALONIERI U. E., HERRMANN B., FERREIRA L. F., ARAÚJO A. (1988) - Recovery of parasite eggs from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo - Journal of Comparative Human Biology* 37: 217-239.
- REINHARD K. J., ARAÚJO A., SIANTO L., COSTELLO J. G., SWOPE K. (2008) – Chinese Liver Flukes in Latrine Sediments From Wong Nim's Property, San Bernardino, California: Archaeoparasitology of the Caltrans District Headquarters. *The Journal of Parasitology* 94 (1): 300-303.
- ROCHA da G. Ch., HARTEK-LAILHEUGUE S., BAILLY Le M., ARAÚJO A., FERREIRA L. F., SERRA-FREIRE da N. M., BOUCHET F. (2006) – Paleoparasitological remains revealed by seven historic contexts from „Place d'Armes“, Namur, Belgium. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 101 (Supl. II): 43-52.
- RUFFER M. A. (1910) – Note on presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the twentieth dynasty (1250 –1000 B. C.), *British Medical Journal* 1: 16.
- SAMUEL L. STANLEY J. (2003) – Amoebiasis. *The Lancet* 361(9362): 1025–1034.
- SANTOS F. L. N., FARO de L. B. (2005) – The first confirmed case of *Diphyllobothrium latum* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 100 (6): 585-586.
- SHIN D. H., OH Ch. S., CHAI J-Y., LEE H-J., SEO M. (2011) – *Enterobius vermicularis* Eggs Discovered in Coprolites from a Medieval Korean Mummy. *Korean Journal of Parasitology*. 49 (3): 323-326.

SIANTO L., REINHARD K. J., CHAME M., CHAVES S., MENDONÇA S., GONÇALVES M. L. C., FERNANDES A., FERREIRA L. F., ARAÚJO A. (2005) – The Finding of Echinostoma (Trematoda: Digenea) and Hookworm Eggs in Coprolites Collected From a Brazilian Mummified Body Dated 600-1,200 Years Before Present. *The Journal of Parasitology* 91 (4): 972-975.

SIANTO L., SOUZA DE M. V., CHAME M., LUZ M. DE F., GUIDON N., PESSIS A-M., ARAÚJO A. (2014) – Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. *Parasitology International* 63: 851-857.

SINNIAH B. (1982) – Daily egg production of *Ascaris lumbricoides*: the distribution of eggs in the faeces and the variability of egg counts. *The Journal of Parasitology* 84: 167-175.

TAYLOR E. L. (1955) – Parasitic helminths in medieval remains. *Veterinary Record* 67: 218-228.

VONDRUŠKA V. (2007) – Intimní historie. *Nakladatelství Moba, Brno* 238p.

WEI O. (1973) – Internal organs of a 2100 – year - old female corpse. *Lancet* 7839: 1198.

WILLERSLEV E., COOPER A. (2005) – Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society of London B* 272: 3-16.

WOLFE A., WRIGHT I. P. (2003) – Human toxocariasis and direct contact with dogs. *The Veterinary Record* 152 (14): 419-422.

YEH H-Y., PLUSKOWSKI A., KALEJS U., MITCHELL P. D. (2014) – Intestinal parasites in a mid-14th century latrine from Riga, Latvia: fish tapeworm and the consumption of uncooked fish in the medieval eastern Baltic region. *Journal of Archaeological Science* 49: 83-89.

URL:

URL 1: Centers for Disease Control and Prevention, USA [online]: Ascariasis [citováno 20. 2. 2015], dostupné z: <http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/>

URL 2: Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno [online]: Mapa Brna [citováno 8. 3. 2015], dostupné z: <http://www.math.muni.cz/~sisma/dthb/obrazky.html>

URL 3: Archaia Brno, obecně prospěšná společnost [online]: Zápisníček [citováno 12. 3. 2015], dostupné z: http://www.archaiabrno.org/home_cs/?acc=zapisnicek&blog_id=554

URL 4: Archaia Brno, obecně prospěšná společnost [online]: Zápisníček [citováno 12. 3. 2015], dostupné z: http://www.archaiabrno.org/home_cs/?acc=zapisnicek&blog_id=479

URL 5: Mapy SEZNAM, Česká Republika [online]: mapa Prahy z 19. století: [citováno 12. 4. 2015], dostupné z: <http://mapy.cz/19stoleti?x=14.4254780&y=50.0831414&z=14>