

**Paleoparazitologická analýza
organických sedimentů
archeologického naleziště v Chrudimi**



Bc. Lenka Bartošová

2009

Bartošová L., 2009 – Paleoparazitologická analýza organických sedimentů archeologického naleziště v Chrudimi. [Paleoparasitological analysis in organic sediments on archeological locality in Chrudim, Mgr. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

The goal of this work was to examine the samples from archeological site in an attempt to identify human and/or animal intestinal parasite eggs. Another task was to detect parasitic protist antigens by ELISA test. Then the results were compared with other facts obtained from the research of this locality

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci 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.

2.1. 2009

Lenka Bartošová.

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za odborné vedení a rady po celou dobu řešení mé diplomové práce. Velký dík patří i celému osazenstvu Laboratoře oportunních parazitů, jmenovitě RNDr. Daně Květoňové, RNDr. Bohumilu Sakovi, PhD., Ing. Martinu Kváčovi, PhD., ale i studentkám Denise, Alence a Zuzce, za příjemnou atmosféru a ochotu poradit i pomoci. V neposlední řadě musím poděkovat i svému školiteli-specialistovi RNDr. Jaromíru Benešovi a jeho diplomantům, archeologům PhDr. Janu Frolíkovi, CSc. a Mgr. Janu Musilovi za informace z jejich oboru. Nicméně největší dík patří mé rodině, která mi studium na vysoké škole umožnila a po celou dobu mě podporovala.

1.	Úvod	1
2.	Literární přehled	3
2.1.	Paleoparazitologie od 80. let 20. století do dneška	3
2.2.	Přehled metod užívaných v paleoparazitologii	4
2.3.	Paleoparazitologické nálezy na evropském kontinentě.....	6
2.3.1.	Třída Trematoda	6
2.3.2.	Třída Cestoda	7
2.3.3.	Třída Nematoda.....	9
2.4.	Odlišnost jednobuněčných parazitů z hlediska paleoparazitologie	12
3.	Cíle práce.....	15
4.	Materiál a metody.....	16
4.1.	Naleziště	16
4.2.	Materiál	17
4.3.	Metody	18
4.3.1.	Sedimentace AMS III.....	18
4.3.2.	Flotace dle Kozáka a Mágrové (KOMA).....	18
4.3.3.	Rehydratace	19
4.3.4.	Mikroskopie	19
4.3.5.	Detekce antigenů parazitických protist	20
4.3.6.	Izolace DNA.....	22
4.3.7.	Nested PCR	23
4.3.8.	Elektroforéza	24
5.	Výsledky.....	25
5.1.	Mikroskopie	25
5.1.1.	Fotografická dokumentace	30
5.2.	Detekce antigenů parazitických protist	39
5.2.1.	Detekce antigenu <i>Giardia intestinalis</i>	39
5.2.2.	Detekce antigenu <i>Entamoeba histolytica</i>	41
5.3.	Polymerázová řetězová reakce	42
6.	Diskuze.....	43
7.	Závěr.....	47
8.	Literatura	48
9.	Příloha	53

1. Úvod

Paraziti jsou organismy, kteří nalézají svou ekologickou niku životem v jiných organismech určitých druhů, zvaných hostitelé. Paleoparazitologie studuje parazity nacházené v archeologickém materiálu. Paleoparazitologické nálezy mohou poskytnout cenné informace o vztahu člověk-parazit, jeho starobylosti, popř. vzniku, o rozšíření parazitů a migraci obyvatelstva v minulosti (Reinhard 1992, Gonçalves et al. 2003).

Roku 1910 našel Ruffer vajíčka *Schistosoma haematobium* charakteristická apikálním trnovitým výběžkem na histologických řezech z ledvin dvou egyptských mumií datovaných do XX. dynastie (1250 – 1000 př. n. l.). Tento nález je všeobecně pokládán za počátek nového oboru paleoparazitologie (Stewart 1951, Araújo et al. 1998, Cox 2002, Bouchet et al. 2003b). Ačkoli se sporadicky objevují podobné práce i v první polovině 20. století, o skutečném rozkvětu tohoto oboru můžeme hovořit až od přelomu 60. a 70. let 20. století (Araújo et al. 1998). Z náhodné, příležitostné spolupráce archeologů a parazitologů se od 60. let stává cílená tvorba mnohaoborových týmů spolupracujících na stejném projektu (Bouchet et al. 2003b).

Od té doby jsou vedle mumifikovaných těl nebo jejich částí zkoumány hlavně organické sedimenty a koprolity – vysušené a někdy mineralizované výkaly – jako potenciální ložisko parazitů (Reinhard 1992, Aspöck et al. 1999). Sedimenty jsou tvořeny nahromaděním materiálu antropogenního i jiného původu, včetně materiálu fekálního. Koprolity mohou být nalezeny v sedimentech různého druhu, v závislosti na stupni zachování rozpadlé nebo nedotčené, a tak vyjmuty pro studium (da Rocha et al. 2006).

Zpočátku byly zkoušeny nejrůznější flotační techniky. Našly své uplatnění u nekonsolidovaných materiálů, ale ukázaly se neúčinné pokud došlo na zkoumání koprolitů (Araújo et al. 1998). Zde se vyzkoušela rehydratace nejrůznějšími kapalinami, od destilované vody, přes hydroxid sodný, po EDTA, ale ukázalo se, že tyto chemikálie způsobují deformaci popř. i rozpad vajíček. Roku 1960 však Callen a Cameron zavedli techniku rehydratace fosforečnanem trisodným (0,5% roztok Na_3PO_4). Jedná se o modifikovanou metodu původně užívanou v muzeích k úpravě zoologických resp. botanických vzorků (Gonçalves et al. 2003). Použitím fosforečnanu trisodného se zviditelní obaly vajíček a anatomické struktury larev jako je esofagus. Světelný mikroskop je pak klíčovým nástrojem paleoparazitologů.

S vynálezem elektronového mikroskopu našel tento přístroj své uplatnění i v paleoparazitologii. Transmisní elektronový mikroskop je výhodný pro identifikaci vnitřních

struktur vajíček parazitů. Podobně prospěšný je scanovací elektronový mikroskop, a to pro detailní analýzu povrchových struktur, což je zvláště praktické, pokud vzorek obsahuje i spory hub a pyl, protože v některých případech můžeme tyto objekty zaměnit s vajíčky parazitů.

Parazitologická analýza daného archeologického materiálu má vedle analýzy botaniků, malakologů, palynologů, entomologů i jiných specialistů své nezastupitelné místo a dokresluje obraz dané lokality (Bouchet et al. 2003b).

2. Literární přehled

2.1. *Paleoparazitologie od 80. let 20. století do dneška*

Výzkum v 80. letech zahrnoval paleontologické i archeologické vzorky. Proto existují dva hlavní proudy studia parazitismu v dávných dobách. Araújo zavedl a definoval pojem paleoparazitologie, jako rozšíření paleopatologie; paleoparazitologové se zajímají o starobylost parazitárního onemocnění, o výskyt parazitů v jednotlivých lokalitách od prehistorických dob, migraci a vývoj vztahu parazit-hostitel v měnících se podmínkách a hlavně zkoumají jak paleontologický, tak archeologický materiál. Oproti tomu archeoparazitologie se zabývá parazity nalézány pouze v archeologickém materiálu, jedno zda nedávné nebo vzdálené datace. Snaží se charakterizovat chování lidského druhu, které snižuje/zvyšuje riziko napadení parazity sebe sama i domácích zvířat. Parazitologická data tak odhalují kulturní evoluci člověka během staletí (Reinhard 1992, Bouchet et al. 2003b).

I v Evropě má parazitologický průzkum archeologického materiálu svou historii – zkoumají se hlavně organické sedimenty (Bouchet et al. 2003b). Britská paleoparazitologie se vyvinula přímo na základě archeologie a zaměřuje se na určení podstaty archeologického depositu. Vidí pozůstatky parazitů jako klíč k rozlišení archeologických objektů. Studuje též koprolity i mumie (Reinhard 1992). První práce pochází už z roku 1955 – průzkum středověké odpadní jámy ve Winchesteru (Taylor 1955, Cockburn 1971). Německá paleoparazitologie zkoumá též deposity v latrínách, ale více z epidemiologického hlediska. Německé paleoparazitology zajímají okolnosti, které nakonec tvoří soubor parazitů na daném místě – produkce vajíček jednotlivých druhů, počet lidí užívajících stejnou latrínu, vliv chemie půdy na rozdílné uchování zbytků helmintů a v neposlední řadě, jak lidské chování ovlivňuje vystavení sebe sama infekčním stádiím jednotlivých druhů. Německý výzkum má jasný základ v paleopatologii, ale hodnotí data v kulturním rámci.

Dnes existují ve světě čtyři významné laboratoře soustředující se na paleoparazitologický výzkum, které začaly svou práci na přelomu 70. a 80. let 20. století. Jde o laboratoře založené Ferreirou, Araújem a Confalonierem z Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; Jonesem z Environmental Archeology Unit, University of York; Herrmannem, Krüggerem a Schultzem z Institut für Anthropologie, Universität Göttingen; a Amblere, Andersonem, Hevlym a Reinhardem z Northern Arizona University a nyní z University of Nebraska-Lincoln (Reinhard 1992).

2.2. *Přehled metod užívaných v paleoparazitologii*

Světelná mikroskopie zůstává klíčovou metodou studia paleoparazitologického materiálu. Tomu odpovídá i úprava vzorků pro mikroskopování. Existuje několik postupů, z nichž některé uvádím. Starší práce uvádějí ukládání vzorků do SAF media, které obsahuje octan sodný, kyselinu octovou a formalín. Po centrifugaci se prohlíží sediment (Aspöck et al. 1999). Další možností je rehydratovat vzorky v 0,5% Na₃PO₄ po dobu 72 hodin. Poté je k vzorku přidán formalín v poměru 10:1. Takto upravený vzorek se nechá sedimentovat dle Lutze; prohlíží se sediment (Gonçalves et al. 2003). Složitější postup zavedl Bouchet; pro francouzské paleoparazitology se stal de facto standardem. Vzorek se nechá rehydratovat v 0,5% Na₃PO₄ po dobu 5 týdnů. Přidá se 5% glycerin a zhomogenizuje se v třecí misce. Vzorek se vystaví ultrazvuku při 60 °C po dobu 1 minuty při 3000ot/min. Následně se filtruje přes síta s kalibrovanou velikostí ok, a to 315 μm, 160 μm, 50 μm a 25 μm. Filtráty ze dvou posledních sít se analyzují metodou sedimentace (1500ot/min po dobu 5 minut) a flotace (roztok o hustotě 1,04-1,4) (Bouchet et al. 2003b, LeBailly et al. 2005). V Latinské Americe se zase většinou používá postup následující. Gram materiálu je smíchán s 15 ml 0,5% Na₃PO₄ a ponechán ve 4 °C po dobu 3 dnů. Rehydratovaný vzorek je rozmíchán a filtrován přes gázu. Ponechá se sedimentovat dle Lutze. Vzorek pro mikroskopování se připraví z 15 μl sedimentu a kapky glycerinu (Fugassa et Guichón 2005). Prvním krokem v případě mineralizovaného koprolitu je ovšem jeho rozpuštění v 10% HCl (Ferreira et al. 1993). Poté je možné aplikovat rehydratační metodu a dále sedimentační popř. flotační techniku – tak to nacházíme u většiny autorů. Takto se zpracovávají sedimenty nejrůznějšího původu i koprolity.

Je nezbytné na tomto místě uvést, že koprolity jako takové jsou především objektem archeologickým. Jsou důkazem lidské a/nebo zvířecí přítomnosti na daném místě, a proto, stejně jako všechny archeologické objekty, je prvním krokem jejich studia jejich popis. Byl navržen standardizovaný protokol skládající se z pěti částí: první zahrnuje informace o místě nálezů, druhá a třetí část se zabývá popisem vnějšku (barva, váha, rozměry, zaškracení apod.) resp. vnitřku (textura, tvrdost a opět barva) koprolitu, čtvrtá část obsahuje výsledky veškerých provedených analýz (rostlinné a zvířecí makrozbytky, pylová analýza, vajíčka/larvy parazitů) a konečně pátá část by měla určit, pokud je to možné, producenta koprolitu. Do budoucna by tak měl být ustanoven morfotyp koprolitu pro každý jednotlivý živočišný druh (člověka nevyjímaje), což by posloužilo vědeckým i vzdělávacím účelům (Jouy-Avantin et al. 2003).

Stejně jako v dalších oborech, i v paleoparazitologii se uplatňují původně imunologické metody, a to především snažíme-li se prokázat cysty parazitických protist. Ty totiž podléhají rychlému rozkladu a je velmi obtížné najít je přímou mikroskopií (Gonçalves

et al. 2004), i když i to je zdokumentováno – např. *Entamoeba coli* v žaludečním obsahu peruánské mumie (1954) nebo cysty kokcidie rodu *Eimeria* v jeleních koproliotech (1992). Imunofluorescenční barvení bylo úspěšně užito v roce 1990 k průkazu cyst *Giardia intestinalis* v koproliotech z Kentucky. Doktorka Fouantová zkoušela již v roce 1982 detekovat cysty *Entamoeba histolytica* metodou ELISA. Ačkoli nebyla úspěšná, nastínila cestu, po které bylo třeba jít v pokusech o průkaz parazitických protist (Araújo et al. 1998). Prvním úspěchem byl v roce 1989 průkaz antigenů *Giardia intestinalis* nepřímou imunofluorescencí ve vzorku starém 2200 let (Faulkner et al. 1989). O deset let později Allison dostal pozitivní výsledek u vzorků datovaných 500 až 3000 let zpátky – použil značení fluorescenční monoklonální protilátkou a posléze klasický ELISA test (Allison et al. 1999, Goncalves et al. 2002). Antigeny améby *Entamoeba histolytica* byly poprvé detekovány komerčním kitem v roce 2004. Jednalo se o rozmanitý materiál (z jímek, organický sediment i jednotlivé koprolity) z různých států v Evropě i Americe datovaný od 8900 let př. n. l. do 19. století n. l. (Goncalves et al. 2004).

Molekulární metody našly v archeologii své místo. Nejdříve byla použita metoda hybridizace, a to na naklonování DNA z kůže vyhynulé zebry. Na tuto metodu je potřeba velkého množství DNA, proto se po roce 1985 začala s výhodou používat polymerázová řetězová reakce – PCR, která vyžaduje jen malá množství výchozí nukleové kyseliny; nejdříve na amplifikaci lidské DNA z kostí a mumifikovaných tkání, posléze i na poli paleoparazitologie (Araújo et al. 1998). Tak bylo analýzou sedmi chilských mumií prokázáno, že v andské oblasti se vyskytuje Chagasova choroba už nejméně 4000 let (Guhl et al. 1997).

Získaná aDNA (ancient DNA) je často poškozena hydrolytickými nebo oxidativními agens (autolýza, bakteriální degradace nebo samovolná depurinace), a proto roztržena na malé kousky. To snižuje možnost DNA amplifikovat nebo alespoň získat dlouhé PCR produkty (Golenberg et al. 1996). Nicméně v poslední době se na toto téma objevují práce některých paleoparazitologů. Loreille úspěšně extrahovala, amplifikovala a sekvenovala DNA ze 104 vajíček škrkavky sesbíraných na středověké lokalitě Namur, Belgie. Pro tuto analýzu byly vybrány tři geny na 18S rRNA a gen pro cytochrom b (Loreille et al. 2001). Byla extrahována DNA z koprolitů z Chile (datace 4110 př. n. l. – 800 n. l.) a z USA (900 n. l.). Amplifikací lidské mtDNA byl potvrzen lidský původ vzorků. Poté byla navržena nested-PCR detekující konzervovanou oblast na 5S rRNA spaceru *Enterobius vermicularis*. Z 27 testovaných vzorků dostali 9 pozitivních výsledků (Iñiguez et al. 2006).

2.3. *Paleoparazitologické nálezy na evropském kontinentě*

Paleoparazitologické nálezy se sestávají především z vajíček, zřídka larev střevních parazitů nebo chitinových schránek ektoparazitů, jako vší, roztočů a blech. Narozdíl od jiných biologických objektů jako například pylových zrn, která se zachovávají velmi dlouhou dobu v nejrůznějších podmínkách, parazitičtí helminti málokdy tvoří vejčíka se stejnou rezistencí vůči vnějším stresorům. Některé skupiny parazitů však tvoří struktury bránící rychlému rozkladu, jedná se hlavně o Ascaridae, Capillaridae, Trichuridae, Oxyuridae a cestoda. Tenkostěnná vejčíka (*Enterobius* spp., *Strongylus* spp.), stejně jako cysty parazitických protist se uchovávají velmi špatně (Bouchet et al. 2003b).

2.3.1. Třída Trematoda

Čeleď Dicrocoeliidae a Fasciolidae

Fasciola hepatica (motolice jaterní) a *Dicrocoelium dendriticum* (motolice kopinatá) jsou nacházeny už v materiálech datovaných do neolitu (mladší doby kamenné)^a, např. naleziště Arbon (Švýcarsko), Chalain (Francie) nebo solné doly v Hallstatu (Rakousko). Z Hallstatu máme nálezy i z doby bronzové (Bouchet et al. 2003c). *Fasciola* byla nalezena rovněž v Německu u Karsdorfu, kde je doloženo osídlení od neolitu do roku zhruba 200 n. l. (Dittmar et Teegen 2003). Na středověkých nalezištích byla vejčíka dokumentována hlavně ve Francii (Paříž, Montbéliard, Remeš, Bordeaux), v menší míře v Polsku a Anglii. Bylo zvykem konzumovat saláty připravované z rostlin jako je pampeliška lékařská (*Taraxacum officinale*), kozlíček polní (*Valerianella olitoria*), čekanka obecná (*Cichorium intybus*), česnek medvědí (*Allium ursinum*), potočnice lékařská (*Nasturtium officinale*) nebo celer plazivý (*Apium repens*) (Bouchet et al. 2003c). Právě na těchto divoce rostoucích rostlinách mohly být adoleskariové cysty fascioly nebo mravenec obsahující metacerkarie dicrocoelia a člověk tato infekční stadia pozřel (Jíra 1998). V případě dicrocoelia, které je jako lidský parazit vzácné, ale mnohem více postihuje kopytníky, nevyjímaje domácí zvířata, půjde pravděpodobně o pseuparazitismus, než o skutečnou infekci (Aspöck et al. 1999).

Fasciola hepatica je kosmopolitním parazitem četných druhů přežvýkavců i monogastričních savců (Volf et al. 2007). Počet případů lidské fasciolózy od roku 1980 významně roste a několik zemí bylo popsáno jako endemické s prevalencí a intenzitou infekce od mírné po velmi vysokou. Odhaduje se více jak 2,4 mil lidí trpících fasciolózou (způsobenou *F. hepatica* i *F. gigantica*); v Evropě je nejpostiženější západ – Portugalsko,

^a Pro lepší orientaci viz. Příloha časová osa

Francie (Mas-Coma et al. 1999, Rim et al. 1999). Migrace parazita tělem je doprovázena silnou zánětlivou reakcí se zvýšenou tvorbou eosinofilů. Běžnější je chronická forma onemocnění, která při dlouhodobém trvání silně ovlivňuje zdraví člověka (Dittmar et Teegen 2003). *Dicrocoelium dendriticum* je parazitem savců, včetně člověka, s výskytem především u přežvýkavců (Bouchet et al. 2003c, Volf et al. 2007). Areál rozšíření je rozsáhlý, zahrnuje Eurasii, Ameriku, Afriku, druh byl zavlečen i do Austrálie. Léze i projevy u lidí jsou mírnějšího rázu (Volf et al. 2007).

Čeleď Schistosomatidae

Vajíčka *Schistosoma haematobium* (krevnička močová) byla první nalezená v archeologickém materiálu, jak již jsem uvedla dříve.^b Vajíčka *S. haematobium* byla nalezena v odpadní jámě u domu z 15./16. století v Montbéliard ve Francii. Na stejném místě byla objevena i *S. mansoni* (krevnička střevní) a fragment těla dospělce *Schistosoma* sp. se zřetelnými přísavkami. Oba druhy pocházejí z Afriky a na evropském kontinentě se nikdy nevyskytovaly, kromě malého ohniska *S. haematobium* v jižním Portugalsku. Ačkoli rodina obývajících zmíněný dům byla hodně movitá, nenašly se žádné exotické suvenýry ani artefakty, proto Bouchet vysvětluje tento nález přítomností infikovaného Afričana. Zhruba od roku 1441 se afričtí otroci objevují v Portugalsku a pár let nato různě po Evropě. Infikovaný jedinec mohl být přivezen do Francie jako služebnictvo, což byla v 16. století vcelku běžná praxe (Bouchet et al. 2002).

Dnes je na světě odhadem 200 miliónů osob trpících schistosomózou. Hlavním patogenním agens jsou vajíčka – značná část jich zůstává v těle, kde jsou roznášena krevním řečištěm. Vzhledem k dlouhověkosti lidských schistosom (až 30 let) a produkci vajíček (desítky až stovky denně) se jedná o vážný problém (Volf et al. 2007). Zdá se, že východní Afrika je centrem, odkud se schistosomóza rozšířila do dalších částí světa (Bouchet et al. 2003c). Nyní je *S. haematobium* rozšířena v severní Africe, na Blízkém a Středním východě až po Indii. *S. mansoni* má svůj areál v Africe a na atlantském pobřeží Latinské Ameriky (Volf et al. 2007).

2.3.2. Třída Cestoda

Čeleď Taeniidae

Vajíčka tasemnic se nacházejí už v materiálu datovaném do neolitu. Byla nalezena i ve výše zmiňovaném Chalain i v Hallstatu (Bouchet et al. 2003c). Z pozdější doby (100-500 let n.

^b 1910 – Ruffer našel vajíčka schistosomy v ledvině egyptských mumií

1.) jsou nálezy z Brementhaven v Německu, ze středověku z Amsterdamu v Holandsku, z Göttingenu v Německu (Gonçalves et al. 2003) nebo z Namuru v Belgii – zde byla nalezena vajíčka tasemnice v materiálu z 11. do poloviny 19. století (da Rocha et al. 2006). Je známo, že toto obyvatelstvo chovalo skot a pravděpodobně i nedostatečně tepelně upravovalo maso (Aspöck et al. 1999). To bylo nakonec typické i pro francouzskou středověkou šlechtu, proto jsou ve vzorcích z domů zámožných lidí vajíčka tasemnic běžně nalézána. Oproti tomu se nevyskytují ve vzorcích z venkova, protože tam naopak byla běžným pokrmem polévka s malými kousky dobře uvařeného masa (Bouchet et al. 2003c). Nevyřešenou otázkou zůstává, zda vajíčka tasemnic představují *Taenia saginata* (tasemnice bezbranná) nebo *Taenia solium* (tasemnice dlouhočlenná) (protože morfologicky je od sebe nelze odlišit) a také zda lidé vedle celkem neškodné střevní infekce trpěli též cysticerkózou (Aspöck et al. 1999).

Taenia solium se vyskytuje kosmopolitně. Odhaduje se, že na světě je taeniózou nakaženo 15 miliónů osob (Volf et al. 2007). Stejně jako *T. saginata* (a *T. asiatica*) je jako infekční agens jedinečná v tom smyslu, že člověk je jediným konečným hostitelem (Dorny et Praet 2007). Vedle nákazy cysticerky z nedostatečně tepelně upraveného nakaženého masa, existuje i možnost nákazy člověka vajíčky, což je z medicínského hlediska mnohem závažnější. Z vajíček se totiž uvolní onkosféry, které migrují do různých orgánů a tvoří zde cysticerky. Toto u nás nebylo zjištěno několik desítek let, stávající ojedinělé případy představují importy ze zahraničních cest. Lidská cysticerkóza se vyskytuje velmi často v Latinské Americe, subsaharské Africe, Indii a Číně. *Taenia saginata* je rovněž kosmopolitní, ale není schopna způsobit lidskou cysticerkózu (Volf et al. 2007).

Čeleď Diphyllbothriidae

Vajíčka *Diphyllbothrium latum* (škulovec široký) byla nalezena různě v Evropě. Nejstarší doklad je datován 3900 let př. n. l. a pochází z neolitické osady Hornstaad-Hörnle I na jihozápadě Německa. Další nálezy jsou z Clairvaux a Chalain ve Francii, z mokřin u Arbonu a Concise (Aspöck et al. 1999, Bouchet et al. 2003c, Le Bailly et al. 2005) nebo z nejzápadnějšího aljašského ostrova Baldir, který sezónně obývali rybáři (Bouchet et al. 1999). Ve středověkých vzorcích jsou vajíčka nacházena v domech bohatých/šlechty ve Francii (Montbéliard), v Německu (Lübeck, Schleswig, Freiburg a další), v Norsku (Oslo) i v Belgii (Namur), protože byl rozšířen zvyk konzumovat nasolené syrové sladkovodní ryby (Bouchet et al. 2003c, Gonçalves et al. 2003).

Vývoj *Diphyllbothrium latum* probíhá přes dva mezihostitele; člověk se nakazí tepelně neupravených rybím masem obsahujícím infekční plerocerkoidy (Craig et Ito 2007). Tato poměrně velká tasemnice může být patogenní, neboť kromě jiného vychytává ve střevě

vitamín B₁₂ – dochází pak k perniciozní anémii (Volf et al. 2007). Nyní se tato infekce objevuje zejména v pobaltských státech a ve Skandinávii. Nedávné znovuzobjevení je doloženo z Itálie, Švýcarska a Francie (Torres et al. 2004). Celosvětově se udává 9 mil nakažených lidí (Craig et Ito 2007). Globalizace v potravním průmyslu s sebou přináší i nové potravní návyky (pojídání sushi a dalších jídel ze syrových ryb), a tak může usnadnit celosvětové rozšíření škulovce z endemických oblastí jako je například Chile. Nutno dodat, že nakažlivost plerocerkoidů se zničí zmrazením na -35°C po dobu 15 hod. (Cabello 2007).

2.3.3. Třída Nematoda

Čeleď Ascaridae

Předpokládá se, že *Ascaris lumbricoides* (škrkavka dětská) byla hojným parazitem už prehistorického člověka, ačkoli nejstarší doklad není datován dále než 3000 př. n. l. (Somerset, Anglie, 2600 let př. n. l.). Na středověkých nalezištích jsou nacházena hojně, např. ve Francii (Paříž nebo Montbéliard), v Německu (Lübeck, Berlín nebo Marburg), v Česku (Hulín), v Anglii (Southampton, Worcester nebo York), v Belgii (Namur), v Norsku (Oslo) (Aspöck et al. 1999, Bouchet et al. 2003c, Gonçalves et al. 2003, da Rocha et al. 2006). Tato hojnost nálezů se připisuje jednak tomu, že vajíčka jsou tlustostěnná, a za druhé tomu, že dospělá samice vyprodukuje denně v průměru 200 tisíc vajíček (Loreille et Bouchet 2003). Vajíčka škrkavek jsou indikátorem fekálního znečištění a jejich počet ukazuje na míru znečištění, proto se používá k odlišení archeologických útvarů jako jsou latríny, žumpy, odpadní jámy, studny, schránky na led nebo zemědělská zařízení jako sila (Bouchet et al. 2003c). *Ascaris lumbricoides* (lidská) a *A. suum* (prasečí) není možné odlišit na základě morfologie, takže zda je nalezená škrkavka lidská se určuje v kontextu dalších nálezů dané archeologické lokality (Loreille et Bouchet 2003, Fernandes et al. 2005). Už mnoho let se diskutuje otázka, zda *A. lumbricoides* a *A. suum* nemohl být původně jeden druh a rozrůznit se evolucí (Lorreille et al. 2003).

Ascaris lumbricoides je kosmopolitním parazitem tenkého střeva člověka a lidoopů. Odhady Světové zdravotnické organizace (WHO) hovoří asi o miliardě nakažených lidí. V některých zemích dosahuje prevalence i více než 50%; u nás bývá hlášeno několik desítek až stovek případů ročně. Jedná se o geohelminty s tkáňovou fází vývoje. U prasat cizopasící *A. suum* není u člověka schopen dokončit vývoj (Volf et al. 2007).

Toxocara canis (škrkavka psí) byla identifikována na nalezišti v Bretani, ve Francii. Jednalo se o vzorky ze zřícené jeskyně, která jevila známky lidské přítomnosti (ohnišť,

kamenné nástroje). Tato vrstva byla datována do doby 300 až 500 tisíc let př. n. l. Vajíčka byla velmi dobře zachována včetně typického granulovaného obalu (Bouchet et al. 2003a).

Toxocara canis je druh parazitující u psovitých šelem na celém světě. U člověka tento druh způsobuje tzv. larvální toxokarózu, kdy infekční larvy vylíhnuté z pozřených vajíček migrují tělem a poškozují různé orgány. V České republice se uvádí až 18 % seropozitivních lidí (Volf et al. 2007).

Čeleď Trichuridae

Vajíčka *Trichuris trichiura* (tenkohlavec lidský) byla nalezena například v koprolitech z Chalain nebo Clairvaux ve Francii, v koprolitech ze solných dolů v Hallstatu v Německu a v půdě sebrané z pánevní oblasti koster v Hulíně (střední Morava) datovaných do doby bronzové (Šebela et al. 1990, Aspöck et al. 1999, Bouchet et al. 2003c, Gonçalves et al. 2003). Je to také jediný parazit, kterého hostil Ötzi, přičemž stáří této mumie je mezi 5200 a 5300 lety (Aspöck et al. 1996, Hidalgo-Argüello et al. 2003). Ze středověkých sídlišť byl nalezen např. ve Winchesteru, Southamptonu nebo Yorku v Anglii, v Utrechtu a Amsterdamu v Holandsku, v Oslu v Norsku, v Paříži nebo Montbéliard ve Francii, v Breisachu, Berlíně nebo Hamelnu v Německu (Gonçalves et al. 2006). Člověk se nakazí vajíčky na kontaminované zelenině (hnojení lidskými výkaly), ve vodě (defekace volně okolo obydlí) nebo na špinavých rukou po manipulaci se znečištěnou půdou. Nález vajíček *T. trichiura* (a/nebo *Ascaris lumbricoides*) vypovídá o velmi špatných hygienických podmínkách.

Tenkohlavec (stejně jako škrkavka) je kosmopolitně rozšířený helmint a často jsou oba druhy přítomny v jediném hostiteli – *A. lumbricoides* v tenkém střevě, *T. trichiura* v kolonu. Obojí vajíčka odcházející se stolicí potřebují příznivé podmínky v půdě na dokončení svého vývoje (Fernandes et al. 2005). *A. lumbricoides* zůstává infekční 5 – 12 let, *T. trichiura* až 6 let (Jíra 1998). Nákaza vajíčky s infekční larvou vyvolává záněty a krvácení sliznice. Projevuje se úpornými průjmy, při nichž může dojít až k vyhřeznutí konečníku (Volf et al. 2007). Při plně rozvinuté trichurióze může člověk hostit 200 až 1000 dospělců, kteří vyprodukují asi 30 tisíc vajíček na ml stolice (Cooper et Bundy 1988). Odhaduje se, že je na světě 600-900 miliónů osob nakažených trichuriózou. U psů cizopasí *T. vulpis*, u prasat *T. suis* – oba mohou vzácně nakazit i člověka (Volf et al. 2007).

Čeleď Capillariidae

Vajíčka kapilárie byla nalezena v hojném počtu v Chalain ve Francii nebo v Arbonu ve Švýcarsku (Bouchet 1997, Bouchet et al. 2003c). V Belgii byla identifikována na nalezišti v Raversijde, datovaném do 16. století (Fernandes et al. 2005). Povrch vajíček je charakteristický rozmanitou ornamentací, nejčastěji připomíná strukturou „vodní

meloun“ (Bouchet et al. 2003c). Člověk se nakazí po jídání infikovaných syrových jater hlodavců nebo prasete, pozřením vajíčka na syrové zelenině nebo geofagií (Jíra 1998). Rozhodnout, zda nález vajíček svědčí o infekci člověka nebo kontaminaci trusem hlodavců, se musí opět v kontextu dané lokality (Dittmar et Teegen 2003).

Capillaria hepatica (kapilárie jaterní) je kosmopolitním parazitem hlodavců přenosným na člověka a mnoho dalších druhů savců (veverka, zajíc, pes, kočka nebo prase) (Jíra 1998, Volf et al. 2007). Vajíčka se uvolní do prostředí až po úhynu a rozkladu nositele (Šlajs 1973) a zůstávají infekční až 25 měsíců. Doposud bylo publikováno pouze 37 případů pravé infekce člověka kapilárií (Nabi et al. 2007). Jakkoli vzácná, tato infekce vede u člověka k závažné nemoci a smrti, což dokládá i fakt, že polovina případů byla diagnostikována post mortem. 15 případů pochází z Evropy – Itálie, Švýcarska, (bývalé) Jugoslávie, Německa, Řecka, Turecka a dokonce 9 z nich bylo popsáno v tehdejší Československu (Juncker-Voss et al. 2000). Forma infekce popsaná u nás je unikátní v tom, že pravděpodobně došlo k pozření jen jednoho vajíčka. Vylíhnutá larva domigrovala do jater, ale masivní imunitní reakce ji zabila, než mohla dokončit vývoj. Byl tak nalezen granulom s kalcifikovanou larvou. V případech silné nákazy (způsobené geofagií nebo po jídání syrových jater infikovaných hlodavců) obsahují granulomy v játrech velké množství vajíček různého stupně vývoje (Šlajs 1973).

Čeď Oxyuridae

Nálezy vajíček *Enterobius vermicularis* (roup dětský) v archeologickém materiálu jsou vzácné (Gonçalves et al. 2003). Jeho vajíčka byla nalezena v koproliitech i v zemině ze systému jeskyní v Utahu, který byl obydlen lidmi 10 tisíc let př. n. l. do 14. století. Nejstarší koprolit obsahující vajíčka roupa byl radiouhlíkovou metodou datován do roku 7837 př. n. l. (Fry et Moore 1969). Nicméně vajíčka roupa byla nalezena i v Evropě – v Německu, ve vzorku datovaném do středověku nebo dánskými paleoparazitology ve vzorku z Grónska datovaném zhruba do poloviny 15. století (Gonçalves et al. 2003).

Enterobius vermicularis je celosvětově rozšířený výhradně lidský parazit tlustého a slepého střeva (Fry et Moore 1969, Gonçalves et al. 2003). Při slabších nákazách probíhá infekce asymptomaticky, při silných naopak dochází k poruchám trávení, nechutenství, bolestivosti břicha i k zánětu slepého střeva (Volf et al. 2007).

Oxyuris equi je kosmopolitním parazitem tlustého a slepého střeva koní. Samice (podobně jako samice roupa dětského) klade vajíčka do perianální oblasti. Kvůli svědění se koně otírají o různé předměty a povrchy, a tak roznáší vajíčka po okolí. Plně vyvinutá vajíčka jsou poměrně odolná a dlouho infekční (Anderson 2000).

Čeď Ancylostomatidae

Ancylostoma duodenale bývá nazývána „měchovec Starého světa“. Původně se zřejmě vyskytovala na Středním východě a vlivem lidské migrace se odtud rozšířila do Středomoří a opačným směrem do jihovýchodní Asie, jižního Pacifiku a do Indonésie. Po objevení Ameriky se dostala a rozšířila i tam (Anderson 2000). Dnes se vyskytuje v subtropické oblasti mezi 45 °SŠ a 30 °JŠ (Jíra 1998). Mimo subtropy se může vyskytovat na místech, kde jsou klimatické podmínky subtropů imitovány – doly, cihelny; známý je případ stavby Gothardského tunelu, kdy se *Ancylostoma* objevila v 1155 m n. m. v Alpách (Peduzzi et Piffaretti 1983). V české uhelné pánvi byla popsána ještě v roce 1904 (Jíra 1998). Nejstarší doklady v Evropě pochází z Francie z Chalain a Clairvaux 3600-2440 př. n. l. Na Moravě u Hulína byla nalezena vajíčka měchovce v zemině z pánevní oblasti koster pohřbených ve společné jámě datovaných do doby bronzové (Aspöck et al. 1999, Gonçalves et al. 2003).

Invazní (filariformní) larvy pronikají kůží a po migraci srdcem a plícemi (a po dvojitým svlékání) se přes epiglotis dostávají do trávicího traktu. Ve střevě pohlavně diferencují a dospívají. Parazit se živí klky, které vsává do úst; místo sání zůstává jako otevřená ulcerace. Následkem vleklých ztrát krve vzniká hypochromní mikrocytární anémie a hypoalbuminémie. Samice klade až 30 000 vajíček denně; ve stolici se nacházejí vajíčka ve stadiu čtyř blastomer. Ve vnějším prostředí – ve vlhku, stínu, mezi teplotami 21-27 °C – postupuje embryogeneze až k vylíhnutí larvy. Pro člověka je nebezpečná půda kontaminovaná výkaly (Jíra 1998).

2.4. Odlišnost jednobuněčných parazitů z hlediska paleoparazitologie

Paleoparazitologické nálezy jednobuněčných parazitů jsou vzácné (Bouchet et al. 2003c). Cysty *Entamoeba coli* byly zjištěny v žaludečním obsahu peruánské mumie, blíže neurčené cysty byly detekovány v lidských koprolitech datovaných 1800 př. n. l., Ferreira našel cysty *Eimerie* sp. v jeleních koprolitech z Brazílie datovaných 9000 př. n. l. (Araújo et al. 1998). V Evropě byly nalezeny cysty *Giardia intestinalis* (lamblie střevní) ve vzorku z latríny z 18. století. Proběhl dokonce pokus, kdy do experimentálního koprolitu byly ve velkém počtu přidány cysty, materiál byl poté vysušen a dále zpracován rehydratační technikou dle Callena a Camerona. V připravených vzorcích byly identifikovatelné cysty velmi vzácné (Gonçalves et al. 2002). Zdá se však, že antigeny parazitických protist mohou zůstat detekovatelné po dlouhou dobu (Gonçalves et al. 2004).

Po experimentech s nepřímou imunofluorescencí a ELISOU se ukázalo, že i komerční ELISA kity by mohly být nástrojem s vysokou citlivostí a specifičností pro detekci

koproantigenů (Gonçalves et al. 2002, Gonçalves et al. 2004). Tím je v případě *Giardia intestinalis* GSA65 (Giardia-specific antigen 65). Antigen byl již dříve analyzován. Rossof zjistil, že je to glykoprotein, vysoce glykosilovaný, zhruba 1 hexosa na 9 až 10 aminokyselin. Experimenty s lektiny napověděly, že by to mohl být mukoprotein (protože selektivně váže křenovou peroxidázu). Při elektroforéze vyšlo najevo, že GSA65 je silně elektronegativní, což mukoproteiny bývají díky obsahu močových kyselin a sulfátových skupin. Přítomnost GSA65 ve stolici symptomatických pacientů a žádná zkřížená reaktivita s jinými střevními protisty naznačila upotřebení tohoto antigenu pro přípravu koproimunodiagnostické soupravy pro detekci giardiózy (Rosoff et Stibbs 1986). Použitím v paleoparazitologii se ukázalo, že GSA65 zůstává přítomen v lidských koproliitech nejméně 800 let. V Evropě byl GSA65 detekován v depositech z latrín v Belgii (dat. 18. století) a v Německu (dat. 15. a 16. století) (Gonçalves et al. 2002).

Podobně byl užít ELISA kit pro detekci adhesinu, hlavního povrchového antigenu améby *Entamoeba histolytica*. V Evropě byly pozitivní např. vzorky z Francie z žumpy u vily osídlené od římské doby po vrcholný středověk, z Belgie ze středověké latríny z Place d'Armes nebo ze Švýcarska z organického sedimentu neolitického osídlení (Gonçalves et al. 2004).

Entamoeba histolytica (měňavka úplavičná) způsobuje u lidí měňavkovou dysenterii a mimostřevní nákazy nejčastěji v podobě jaterního amébového abscesu. K nákaze dochází požitím čtyřjaderných cyst – ty přežívají určitou dobu za nehty, déle ve vodě a ve výkalech, v závislosti na teplotě. Trofozoiti žijí v lumen tlustého střeva jako komenzálové (forma minuta). Za určitých okolností se améba mění na invazní formu magna, která invaduje střevní sliznici a po průniku do submukózy tvoří tzv. lahvový vřed. Akutní fáze onemocnění je charakterizována krvavým průjmem s pomalým nástupem, bez horeček. U mnoha nakažených lidí k onemocnění nedojde a améby u nich zhruba po roce vymizí.

Celosvětově se odhaduje na 500 miliónů nakažených osob (Volf et al. 2007), z toho jen 34-50 mil představuje symptomatické případy (amébová kolitida, jaterní absces i amébová dysenterie) (Huston et al. 1999). V historii bylo zaznamenáno několik velkých epidemií, většinou při hromadném přesunu obyvatel současně s nízkým hygienickým standardem (války, uprchlíci apod.). V ČR je améboza vzácná, většinou jde o importy.

Oproti tomu giardióza je v ČR nejčastější střevní onemocnění způsobené parazitickými protisty, pravidelně bývá zachyceno několik set případů ročně. Celosvětově trpí touto infekcí 200 miliónů lidí. Giardia se mezi hostiteli přenáší odolnými čtyřjadernými cystami znečištěnou vodou nebo potravinami. Možný je i přímý fekálně-orálně přenos.

Hlavním příznakem je nekrvavý průjem s hlenem různého trvání a intenzity. Nákazu doprovází poruchy štěpení a vstřebávání sacharidů a tuků v duodenu (Volf et al. 2007).

Molekulární studie ukázaly, že *G. intestinalis* se rozpadá nejméně na 7 genotypů (asambláží) od sebe tak vzdálených, že se nejspíše jedná o samostatné, morfologicky nerozeznatelné druhy (Monis et al. 2003). Zatím bylo vědecky prokázáno, že pouze giardie asambláží A a B jsou schopny nakazit člověka. I když otázka zoonotického přenosu nebyla dosud uspokojivě zodpovězena (Conboy 1997), dá se předpokládat, že přenos z domácích i divokých zvířat na člověka může být epidemiologicky důležitý (Volf et al. 2007).

3. Cíle práce

Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu

Koncentračními metodami vyšetřit vzorky ze zasypaných studní, odpadních jímek, hrobů atd. s cílem identifikovat vajíčka helmintů parazitujících u člověka a domácích zvířat

Pokusit se o detekci antigenů jednobuněčných parazitů pomocí citlivých serologických metod

Výsledky dát do souvislosti s dostupnými informacemi o příslušných archeologických nalezištích

4. Materiál a metody

4.1. Naleziště

Archeologické naleziště se nacházelo na nároží Hradební ulice a Resslerova náměstí v Chrudimi. Po demolicích zde po roce 1994 vznikla proluka, zahrnující parcely zaniklých domů čp. 14/I a 15/I a zadní část parcely domu čp. 10/I. Archeologický výzkum byl vyvolán záměrem výstavby obchodně bytového centra s podzemními garážemi, celoplošně likvidujícími archeologické situace. Proto zde v období dubna až října 2006 proběhl záchraný archeologický výzkum.



Obrázek 1 a 2 – Umístění archeologického naleziště do plánu města Chrudimi

Nejstarší nálezy spadají do období 900 – 400 let př. n. l. Výzkum zjistil nálezově bohaté souvrství a jámy s velkým množstvím keramiky. Další osídlení můžeme spojit až s 9. stoletím n. l. Na zkoumané ploše byly zjištěny stopy dřevěných staveb a plotů a zásobnice na obilí. Byl nalezen hrob novorozence zhruba z 11. století. V celém popsaném období byla zkoumaná plocha hustě osídlena, rekonstruovat podobu zástavby a další detaily však nelze. Pozdější zástavba a další zásahy zachovaly jen navzájem nesouvislé útržky.

Zásadní proměnu přináší založení vrcholně středověkého města před rokem 1276. Podél nově vyměřené Hradební ulice byly rozčleněny jednotlivé městské parcely. V závěru 13. století byla zástavba dřevěná, nejspíše ve formě srubů s podlahami z jílu. Nahradila je na

počátku 14. století dřevěná stavba na kamenné podezdívce, nejméně dvouprostorová. Součástí stavby byl také zahloubený suterén se stěnami obloženými dřevem. V první třetině 14. století byla Chrudim postižena rozsáhlým požárem, doloženým pouze v archeologických pramenech. Požár postihl také dřevěný dům na podezdívce. Nahradila ho zděná stavba, z níž se dochoval přibližně čtvercový sklep. Ve století 15. byl v jeho těsném sousedství vyhlouben obdélný sklep. Později na něj navázal dalším podzemním podlažím sklep křížového půdorysu. Během třicetileté války byl celý blok domů sevřený Resslerovým náměstím, Hradební a Rybičkovou ulicí pobořen. Komplex sklepů byl zavezen smetím a stavebním odpadem, místo bylo využíváno jako zahrada a přičleněno k domu čp. 10/I.

Výraznou součástí nalezené situace jsou odpadní jímky a jámy. Celkem jich bylo prozkoumáno 14 a časově pokrývají období od konce 13. století až do století 18., ale většinu je možno datovat do 15. až 16. století. Historicky náleží ke dvorkům domů čp. 10/I, 14/I a 15/I. Také jejich podoba byla rozmanitá. Od prostých nijak neupravovaných jam, přes čtvercové jámy, se stěnami zpevněnými výdřevou ke kruhovým jímkám se stěnami pečlivě obloženými kamenem, spojovaným jílem (Frolík et Sigl, 1998, Frolík et Musil, 2007)



Obrázek 3 a 4 – Odpadní jímka 951 a 932 (foto PhDr. Frolík)

4.2. Materiál

Vzhledem k časové tísně, v jaké byl výzkum prováděn, bylo nutné vyzvednout pouze celé objekty nebo jejich velké části. Ostatní archeologický materiál obsahující malé střepy, úlomky kostí apod. byl rozdělen do samostatných pytlů, očíslován a označen podle čtvercové sítě a čísla vrstvy, odkud pochází. Vzorky pro paleoparazitologickou analýzu byly z těchto pytlů odebrány v gumových rukavicích do uzavíratelných igelitových sáčků a rovněž ihned

popsány číslem sáčku i vrstvy. Před zpracováním byly uchovávány v papírové krabici při laboratorní teplotě.

4.3. Metody

Celý obsah sáčku byl vždy vysypán na velkou Petriho misku a promíchán. Plastovou lžičkou byl poté odebrán vzorek velikosti hrášku (u jílovitých půd) nebo vzorek odpovídající jedné ploché lžičce (u sypkých půd). Z každého sáčku tj. z každé archeologické vrstvy byla provedena analýza sedimentační a flotační technikou.

4.3.1. Sedimentace AMS III

Roztok pro sedimentační metodu AMS III sestává z 115,2 g (bezvodého) Na_2SO_4 , 540 ml HCl a 660 ml H_2O , přičemž hustota roztoku má být 1,08. Roztok Tritonu se získá smícháním 16,5 ml Tritonu X-100 (isooctylphenoxypolyethoxyphenol) s 33,5 ml H_2O .

Postup:

1. ve zkumavce smíchat vzorek velikosti hrášku se 6 ml roztoku
2. slít přes gázu a nálevku do další zkumavky
3. přidat 3 kapky Tritonu a 3 ml etheru
4. uzavřít gumovou zátkou a roztřepat
5. centrifugovat 2 minuty při 440 g
6. poté opatrně slít supernatant
7. plastovou pipetou přenést 2 kapky sedimentu na podložní sklíčko, přiklopit krycím sklíčkem 18x18 mm

4.3.2. Flotace dle Kozáka a Mágrové (KOMA)

Roztok KOMA sestává z dílu roztoku A, dílu roztoku B a dílu glycerolu. Roztok A je připraven z 560 g ZnSO_4 v 1000 ml destilované vody. Roztok B je připraven z 920 g MgSO_4 v 1000 ml destilované vody.

Postup:

1. ve zkumavce smíchat vzorek velikosti hrášku s malým množstvím destilované vody
2. slít přes gázu a nálevku do další zkumavky
3. dolít zkumavku zhruba do poloviny destilovanou vodou

4. centrifugovat 3 minuty při 440 g
5. opatrně slít supernatant
6. sediment rozmíchat v malém množství roztoku KOMA
7. dolít zkumavku roztokem KOMA asi půl centimetru pod okraj
8. nezátkovat!
9. centrifugovat 3 minuty při 440 g
10. tenkou skleněnou pasteurkou doplnit vrchovatě zkumavku roztokem KOMA
11. překrýt ústí zkumavky krycím sklíčkem 18x18 mm
12. sklíčko s nalepenou povrchovou blankou přenést na podložní sklíčko

4.3.3. Rehydratace

V průběhu práce jsem se rozhodla testované vzorky nejprve rehydratovat, jak se uvádí v literatuře. Postupně jsem takto vyšetřila zhruba čtvrtinu materiálu. Do skleněných zkumavek jsem navázila gram materiálu, přidala 10 ml 0,5% Na_3PO_4 a řádně rozmíchala. Zkumavky ve stojánku překryté alobalem jsem umístila na týden do lednice (5 °C). Poté jsem je začala postupně zpracovávat, vždy metodou sedimentační a flotační. V případě sedimentace AMS III jsem zkumavky nejprve stočila (2 minuty při 440 g), slila supernatant a dále postupovala dle návodu. Na flotaci KOMA jsem vzorek nejprve rozmíchala a slila přes gázu do další zkumavky. Poté jsem pokračovala v postupu od bodu 4.

4.3.4. Mikroskopie

Vzorky jsem prohlížela mikroskopem Olympus IX70 nebo Olympus BX51 objektivem se zvětšením 10x. Podrobnosti je nutné prohlížet objektivem 20x nebo 40x. s tímto zvětšením jsem rovněž fotografovala jednotlivé objekty. Vajíčka jsem poté určovala podle charakteristických znaků a morfometrie (viz. příloha č. 2)

4.3.5. Detekce antigenů parazitických protist

Entamoeba histolytica

Pro pokus o detekci antigenu *E. histolytica* byl použit kit firmy Diagnostic Automation, Inc. (Calabasas, USA), který detekuje antigen *E. histolytica/dispar* na základě sandwich ELISA.

Postupovala jsem dle pokynů výrobce. V každém pokusu byla kromě kontrol v kitu použita negativní kontrola – parazitů prostá zemina. Pacientský vzorek pozitivní na entamoebu nebyl k dispozici. Vzorky byly vyšetřovány vždy v tripletu.

Postup:

1. obsah láhve wash buffer (25 ml) smíchat s 475 ml destilované nebo deionizované vody
2. gram vzorku smíchat s 3 ml zředěného wash buffer, řádně rozmíchat
3. napipetovat 100 μ l negativní a pozitivní kontroly a stejné množství supernatantu vzorku do příslušných jamek
4. inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě, poté promýt
5. přidat do všech jamek 100 μ l Reagent 1 (monoklonální anti-*E. histolytica* protilátka s modrým barvivem)
6. inkubovat 5 minut, poté promýt
7. přidat do všech jamek 100 μ l Reagent 2 (myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou a červeným barvivem)
8. inkubovat 5 minut, poté promýt
9. přidat do všech jamek 100 μ l Chromogen solution (tetramethylbenzidin s peroxidem)
10. inkubovat 5 minut, **nepromývat**
11. přidat do všech jamek 100 μ l Stop solution (1 M kyselina fosforečná)
12. do 30 minut změřit na ELISA readeru při 450/620-650 nm

Výsledek testu byl validní jen v případě, pokud pozitivní kontroly kitu dosáhly hodnoty absorbance (A) alespoň 0,5 a zároveň negativní kontroly měly hodnotu A pod 0,15. Jako reaktivní se poté považuje vzorek, kde hodnota A přesáhne 0,15. Test jsem považovala za platný, když hodnota A negativního vzorku (parazitů prostá zemina) nepřesáhla hodnotu A negativní kontroly kitu. Měřila jsem na ELISA readeru při 450 nm (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy, Helsinky, Finland). Konečný výsledek je aritmetickým průměrem hodnot

naměřených absorbancí tripletu vzorku. Odlehlé hodnoty (které se liší více jak 1,5krát) nejsou započítány.

Giardia intestinalis

Pro pokus o detekci antigenu *G. intestinalis* byla použita jednoduchá ELISA od firmy NovaTec Immundiagnostica GmbH (Dietzenbach, Germany).

Postupovala jsem dle pokynů výrobce. V každém pokusu byla kromě kontrol v kitu použita negativní kontrola – parazitů prostá zemina – a pozitivní kontrola – stolice pacienta s giardiózou. Vzorky byly vyšetřovány vždy v tripletu.

Postup:

1. obsah láhve Washing Solution (100 ml) smíchat s 900 ml destilované nebo deionizované vody
2. 100 mg vzorku smíchat s 1 ml Sample diluent (Tris buffer), řádně rozmíchat
3. napipetovat 75 μ l negativní a pozitivní kontroly do příslušných jamek a 100 μ l supernatantu vzorku do příslušných jamek, ponechat jednu jamku jako blank
4. inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě, poté promýt
5. do všech jamek kromě blanku přidat 75 μ l Anti-*Giardia lamblia* Conjugate (protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou se zeleným barvivem)
6. inkubovat 30 minut, poté promýt
7. do všech jamek přidat 75 μ l TMB Substrate Solution (tetramethylbenzidin s peroxidem)
8. inkubovat 10 minut ve tmě
9. do všech jamek přidat 75 μ l Stop Solution (0,25 M kyselina sírová)
10. do 30 minut změřit na ELISA readeru při 450/620 nm

Výsledek testu byl validní jen v případě, pokud pozitivní kontroly kitu dosáhly hodnoty absorbance (A) alespoň 0,8 a zároveň negativní kontroly měly A rovno nebo pod 0,2. Cut-off je poté vypočítán přičtením hodnoty 0,2 k aritmetickému průměru hodnot absorbancí negativních kontrol. Jako reaktivní se poté považuje vzorek, kde A přesáhne stanovený cut-off. Test jsem považovala za platný, když hodnota A negativního vzorku (parazitů prostá zemina) nepřesáhla cut-off. Měřila jsem na ELISA readeru při 450 nm (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy, Helsinky, Finland). Konečný výsledek je aritmetickým průměrem hodnot naměřených absorbancí tripletu vzorku. Odlehlé hodnoty (které se liší více jak 1,5krát) nejsou započítány.

4.3.6. Izolace DNA

DNA jsem izolovala kitem QIAamp DNA Stool (Cat. No. 51 504)

Postup:

1. do ependorfky navážit 180-200 mg vzorku (stolice, trus)
2. přisypat skleněné kuličky
3. připipetovat 1 ml Buffer ASL, vortexovat 1 minutu, dokonale zhomogenizovat
4. rozbít v mini beadbeateru 2 minuty při max. rychlosti (120 s/5 000 kmitů)
5. inkubovat 5 minut při 70 °C v inkubačním bloku
6. vortexovat 15 s, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti
7. maximum supernatantu přenést do čisté ependorfky
8. přidat ½ inhibiční EX tablety, vortexovat 1 minutu (dokonale rozpustit), inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě
9. centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti
10. přepipetovat veškerý supernatant do nové ependorfky, znovu centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti
11. napipetovat 15 µl proteinase K do čisté ependorfky a přidat 200 µl supernatantu
12. přidat 200 µl Buffer AL, vortexovat 15 s
13. inkubovat 10 minut při 70 °C v inkubačním bloku
14. přidat 200 µl 96 % etanolu, vortexovat
15. přepipetovat lyzát na QIAamp kolonu opatřenou sběrnou zkumavkou, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti
16. přidat 500 µl Buffer AW1, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti, vyměnit nebo vyprázdnit sběrnou zkumavku
17. přidat 500 µl Buffer AW2, centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti
18. přenést kolony na čistou ependorfky, napipetovat 200 µl Buffer AE přímo na membránu, inkubovat 1 minutu při lab. teplotě, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti
19. získanou DNA uchovávat při – 20°C

4.3.7. Nested PCR

U získané DNA jsem pomocí nested PCR stanovovala část genu pro TPI. Master mix pro primární PCR měl následující složení:

- pufr 2,5 µl
- dNTPs 0,5 µl
- F1 0,5 µl
- R1 0,5 µl
- Taq 0,3 µl
- BSA 1 µl
- DNA 5 µl
- H₂O 14,7 µl

Program:

Denaturace	94 °C	3 min
Denaturace	94 °C	0,45 min
Annealing	50 °C	0,45 min
Prolongace	72 °C	1 min
Finální prolongace	72 °C	7 min
Chlazení	4 °C	

35 cyklů, finální produkt 605 bp

Primery pro primární PCR:

F1	AAA TIA TGC CTG CTC GTC G
R1	CAA ACC TTI TCC GCA AAC C

Master mix pro sekundární PCR:

- pufr 2,5 µl
- dNTPs 0,5 µl
- F1 0,5 µl
- R1 0,5 µl
- Taq 0,3 µl
- DNA 2 µl

- H₂O 18,7 µl

Program:

Denaturace	94 °C	3 min
Denaturace	94 °C	0,45 min
Annealing	50 °C	0,45 min
Prolongace	72 °C	1 min
Finální prolongace	72 °C	7 min
Chlazení	4 °C	

35 cyklů, finální produkt 532 bp

Primery pro sekundární PCR:

F2 CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT

R2 GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC

4.3.8. Elektroforéza

Délku DNA fragmentů jsem ověřovala gelovou elektroforézou. Použila jsem 1% gel připravený z 0,4 g agarózy a 40 ml TAE pufru. Ten sestává z 242 g Tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5 M EDTA. Do gelu jsem přidala ethidium bromid; po ztuhnutí gelu a vložení do elektroforetické vany jsem nanesla vzorky a kontroly v objemu 20 µl, 100 bp DNA ladder (Fermentas) v objemu 0,4 µl. Elektroforéza při 70 V (EC300XL, Thermo Scientific) běží přibližně po dobu 45 minut. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Electronic UV transilluminator, Ultra-Lum, Inc.) při vlnové délce 302 nm.

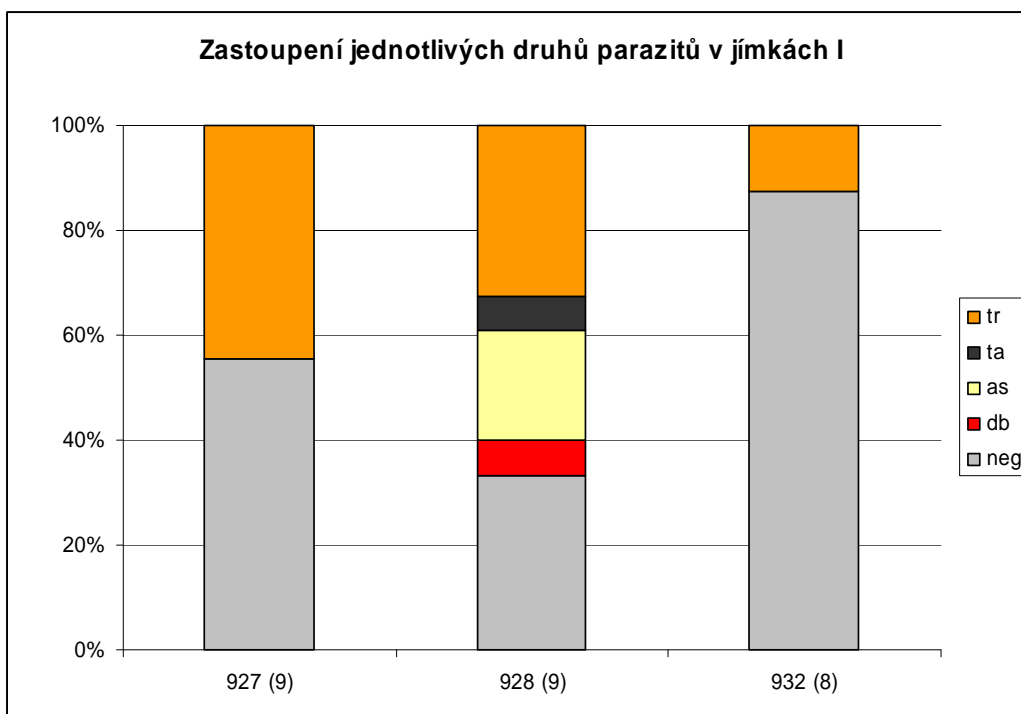
5. Výsledky

5.1. Mikroskopie

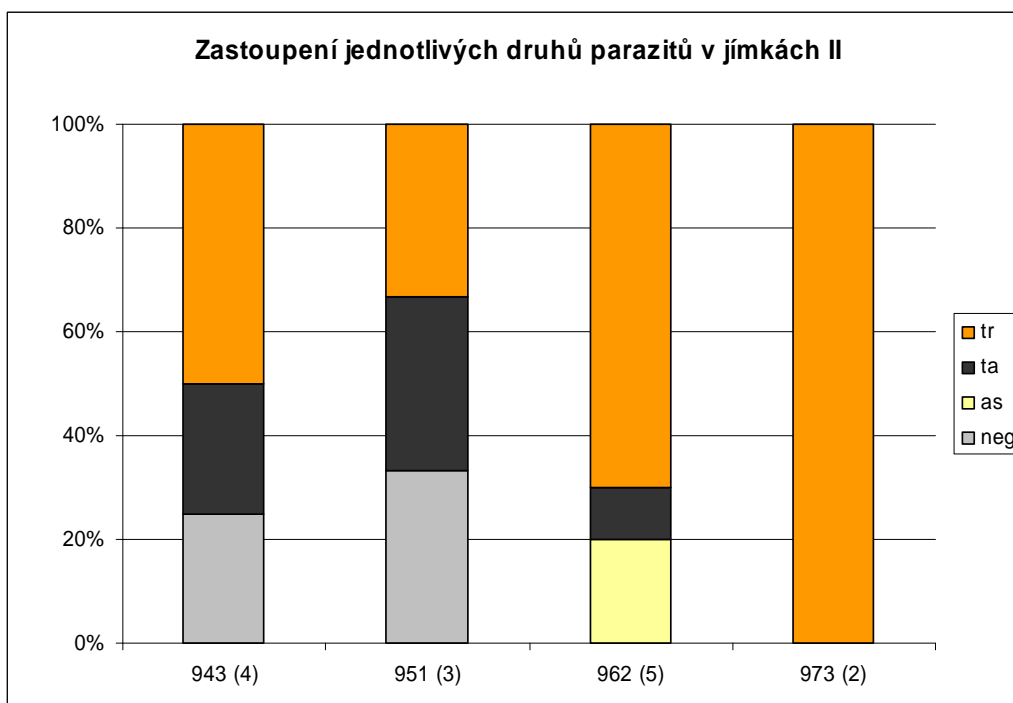
Předně, než předložím konkrétní dílčí výsledky, bych ráda zhodnotila lokalitu jako celek. Organické sedimenty z jímek na nalezišti v Chrudimi byly parazitologicky mimořádně bohaté, nejen početně, ale i druhově. Tento rozdíl je patrný obzvláště, pokud nálezy srovnám s nálezy ve vzorcích z Prahy z Celetné ulice, na kterých započala předchozí diplomantka doc. Ditricha svou práci, kterou však nedokončila. Zde jsem identifikovala pouze vajíčka *Trichuris trichiura* a ojediněle vajíčka *Ascaris lumbricoides*. Nejvyšší počet vajíček na preparátu byl pouze 21. Ve většině vzorků (67%) vajíčka střevních helmintů nebyla. Oproti tomu ve vzorcích z Chrudimi z Hradební ulice jsem našla osm druhů střevních helmintů (počítám-li i ojedinělé nálezy) a nejvyšší počet vajíček na preparátu byl 125 (*T. trichiura*, vzorek č. 145). Negativních vzorků bylo 39%. Vzorky obecně pocházejí z různých objektů archeologického naleziště, kde odpadní jímky jednoznačně tvoří nejzajímavější část.

objekt	počet vzorků	počet pozitivních vzorků	procento pozitivních vzorků (%)
jímka 927	9	4	44,5
jímka 928	9	6	67
jímka 932	8	1	12,5
jímka 938	33	29	88
jímka 943	4	3	75
jímka 951	3	2	66
jímka 962	4	4	100
jímka 973	2	2	100
hrob hradištní	2	0	0
jáma pod zdí	1	0	0
obilnice hradištní	1	0	0
sídlíštní vrstva B5	1	0	0
sídlíštní vrstva C7	1	0	0
sídlíštní vrstva N6	1	0	0
sídlíštní vrstva H6	1	0	0
smetištní jáma 17. stol	2	2	100
smetištní jáma 18. stol	4	0	0
sklep 14. stol.	1	0	0
sklep 17. stol.	1	1	100
celkem	88	54	61

Tabulka 1 – Soupis jednotlivých objektů na archeologické vykopávce společně s počtem pozitivních vzorků daného objektu vyjádřeným číselně a procentuálně.



Graf 1 – Srovnání jednotlivých jímek z hlediska zastoupení druhů parazitů. Graf hodnotí nálezy vajíček parazitů v jednotlivých vrstvách jímek, které lze srovnávat z hlediska podobného počtu dostupných vzorků (číslo v závorce). Legenda: tr = *Trichuris trichiura*, ta = *Toxocara canis/cati*, as = *Ascaris lumbricoides*, db = *Diphyllobothrium latum*, neg = negativní; ojedinělé nálezy nejsou zahrnuty



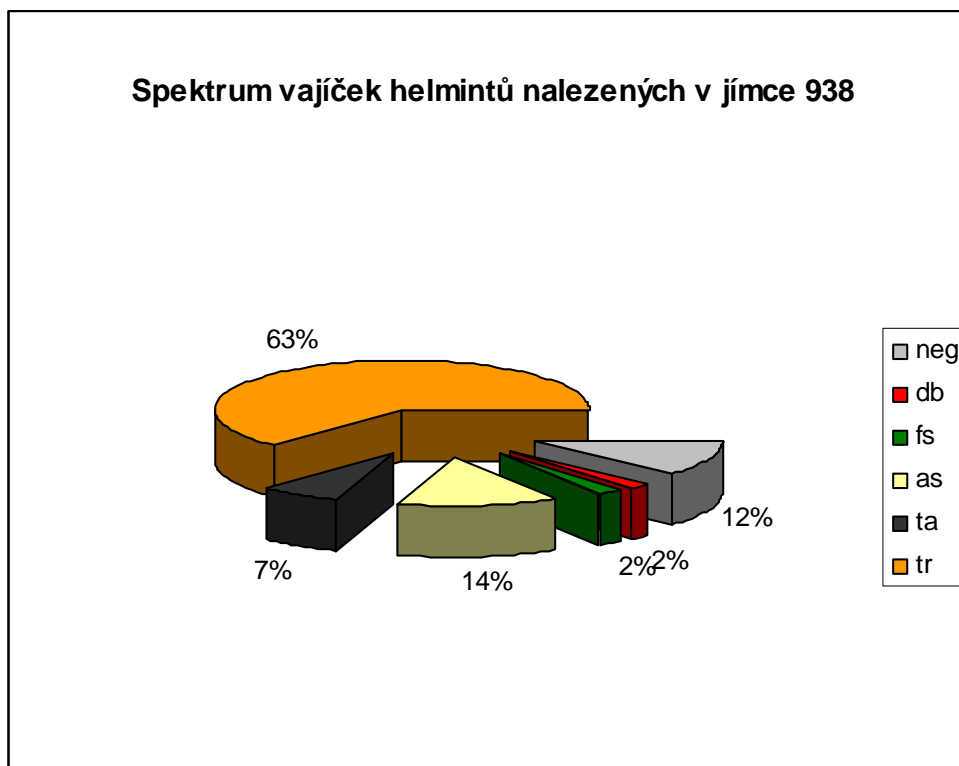
Graf 2 – Srovnání jednotlivých jímek z hlediska zastoupení druhů parazitů. Graf hodnotí nálezy vajíček parazitů v jednotlivých vrstvách jímek, které lze srovnávat z hlediska podobného počtu dostupných vzorků (číslo v závorce). Legenda: tr = *Trichuris trichiura*, ta =

Toxocara canis/cati, as = *Ascaris lumbricoides*, neg = negativní; ojedinělé nálezy nejsou zahrnuty

číslo vzorku	nález		rehydratace	nález	
	sedimentace	flotace		sedimentace	flotace
7	0	tr ● ta ● as ●	X	0	as ●
13	as ●	tr ●	X	0	0
45	tr ●	tr ● ta ●	X	tr ●●	tr ●
48	db ●	tr ● fs ●	X	tr ●	tr ●
49	0	0			
51	0	0	X	0	0
60	0	tr ●			
61	0	0			
62	0	tr ●			
72	tr ●●	tr ●●			
84	tr ●	tr ●●			
89	tr ●	tr ●			
90	tr ●	tr ●●	X	tr ● ta ●	tr ● ta ●
95	tr ●● as ●	tr ●● as ●	X	0	tr ●●●●
101	tr ●	tr ●●●●● as ●	X	tr ●● as ●	tr ●●●
117	tr ●●	tr ●●●●●			
123	tr ● as ●	tr ▲ (68) as ● db ● fs ●	X	tr ●● as ●	tr ▲ (58)
137	tr ●●	tr ▲ (57)			
145	tr ●●	tr ▲ (125)	X	tr ●●●	tr ▲ (83)
150	tr ●●●	tr ●●●			
151	tr ●● as ●	tr ●●●			
152	tr ●●	tr ▲ (51) ta ●	X	tr ●	tr ●
162	tr ●●	tr ▲ (81)			
174	tr ●	0	X	tr ●●● as ●	tr
182	tr ●	tr ●●●●			

číslo vzorku	nález		rehydratace	nález	
	sedimentace	flotace		sedimentace	flotace
193	0	0			
195	tr ●	tr ●●●●● ta ●	X	tr ●	tr ●●
198	tr ●	tr ●●	X	tr ●●	tr ●● as ●
206	tr ●	tr ▲ (57)	X	tr ●	tr ●
207	tr ● as ●	tr ●●	X	tr ●	0
211	tr ● as ●	tr ●●			
216	tr ●	0	X	tr ●	0

Tabulka 2 – Nálezy v jednotlivých vrstvách jímky 938. Zkratky a symboly: tr = *Trichuris trichiura*, ta = *Toxocara canis/cati*, as = *Ascaris lumbricoides*, fs = *Fasciola hepatica*, db = *Diphyllobothrium latum*; 0 negativní, ● 1-10, ●● 11-20, ●●● 21-30, ●●●● 31-40, ●●●●● 41-50, ▲ nad 50 ks vajíček (v závorce konkrétní hodnota), ojedinělé nálezy nejsou zahrnuty



Graf 3 – Paleoparazitologické nálezy v jímce 938 vyjádřené v koláčovém grafu. Zkratky: tr = *Trichuris trichiura*, ta = *Toxocara canis/cati*, as = *Ascaris lumbricoides*, fs = *Fasciola hepatica*, db = *Diphyllobothrium latum*, neg = negativní

číslo vzorku	nález	
	sedimentace	flotace
5	0	0
6	0	tr ●●
11	tr ●	0
12	0	0
14	0	0
21	0	0
27	tr ●●	0
30	tr ●	tr ●
35	0	0

Tabulka 3 - Nálezy v jednotlivých vrstvách jámky 927. Zkratky a symboly: tr = *Trichuris trichiura*, 0 negativní, ● 1-10, ●● 11-20 ks vajíček

číslo vzorku	nález		rehydratace	nález	
	sedimentace	flotace		sedimentace	flotace
220	0	0			
232	0	0			
233	0	0			
234	tr ●●	tr ●●●●● as ● ta ●	X	tr ●●	tr ●● as ● db ●
244	tr ● as ●	as ●	X	tr ● db ●	tr ● as ●
246	tr ●● as ●	tr ▲ (87) as ●	X	0	0
251	tr ●	tr ●	X	tr ● as ●	tr ● as ●
252	tr ●	tr ●●● ta ●	X	tr ● as ●	tr ●
254	tr ●	tr ●●●●●			

Tabulka 4 – Nálezy v jednotlivých vrstvách jámky 928. Zkratky a symboly: tr = *Trichuris trichiura*, ta = *Toxocara canis/cati*, as = *Ascaris lumbricoides*, db = *Diphyllobothrium latum*; 0 negativní, ● 1-10, ●● 11-20, ●●● 21-30, ●●●● 31-40, ●●●●● 41-50, ▲ nad 50 ks vajíček (v závorce konkrétní hodnota)

číslo vzorku	nález		rehydratace	nález	
	sedimentace	flotace		sedimentace	flotace
250	tr ●	tr ●			
253	0	0			
255	0	0			
261	0	0			
262	0	0	X	0	0
269	0	0			
290	0	0			
291	0	0			

Tabulka 5 – Nálezy v jednotlivých vrstvách jímky 932. Zkratky a symboly: tr = *Trichuris trichiura*, 0 negativní, ● 1-10 ks vajíček

5.1.1. Fotografická dokumentace

TREMATODA



Obrázek 5 – *Fasciola hepatica*, ze vzorku č. 48, flotace
Na levém pólu operculum, uvnitř zbytky původního obsahu a vzduchová bublina

CESTODA



Obrázek 6 – *Diphylobothrium latum*, ze vzorku č. 48, sedimentace
Na levé straně operculum, na opačné typický „knob“



Obrázek 7 – Pravděpodobně *Hymenolepis nana*, ze vzorku č. 198, flotace
Velmi poničené vajíčko, uvnitř lze rozeznat dva háčky

NEMATODA



Obrázek 8 – *Ascaris lumbricoides*, oplozené vajíčko, ze vzorku č. 194, flotace
Široký, oválný tvar, bradavičnatý povrch, mineralizovaný obsah



Obrázek 9 – Protržený obal vajíčka *A. lumbricoides*, ze vzorku č. 195, sedimentace



Obrázek 10 – *A. lumbricoides*, oplozené vajíčko, ze vzorku č. 246, sedimentace
Téměř kulaté vajíčko, s bradavičnatým povrchem, bez mineralizace



Obrázek 11 – *A. lumbricoides*, neoplozené vajíčko, ze vzorku č. 259, flotace
Téměř úplně dekortikované vajíčko, mineralizovaný obsah



Obrázek 12 – *Toxocara canis/cati*, ze vzorku č. 194, flotace
Typicky dolíčkovatý povrch, mineralizovaný obsah



Obrázek 13 – *T. canis/cati*, ze vzorku č. 199, flotace
Zaostřeno na typický dolíčkovatý povrch; mineralizovaný obsah



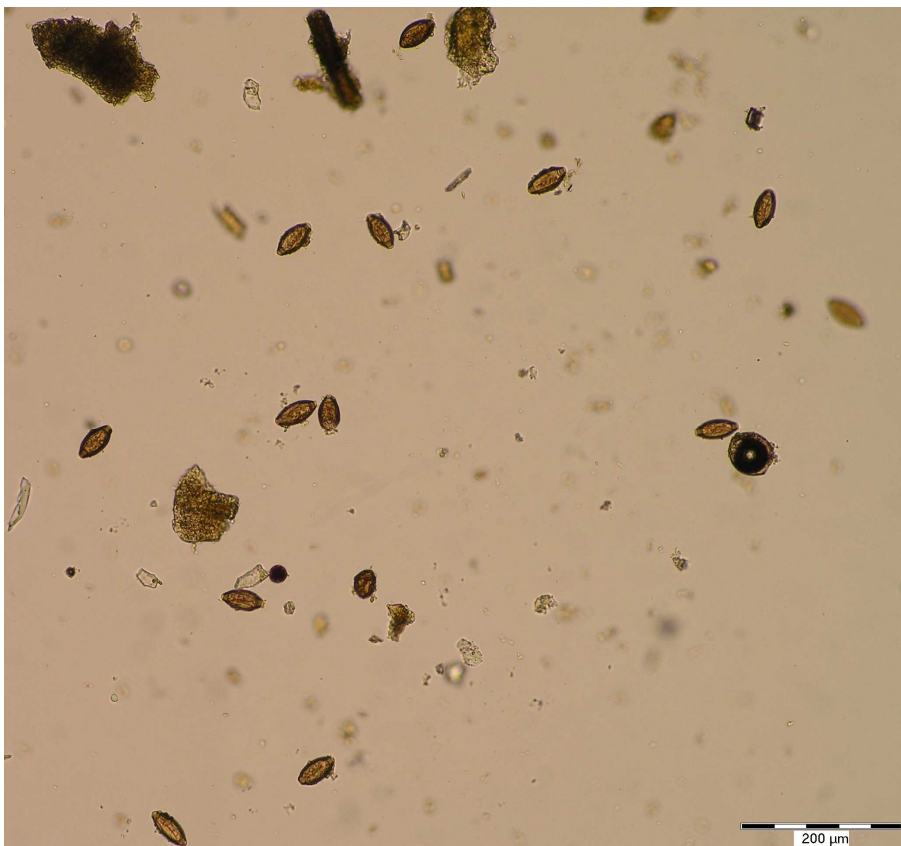
Obrázek 14 – *Trichuris trichiura*, ze vzorku č. 95, flotace
Typický citronkovitý tvar, pólové zátky, bez zřetelného vnitřního obsahu



Obrázek 15 – *T. trichiura*, ze vzorku č. 137, flotace
Typický citronkovitý tvar, pólové zátky, s granulací vnitřního obsahu



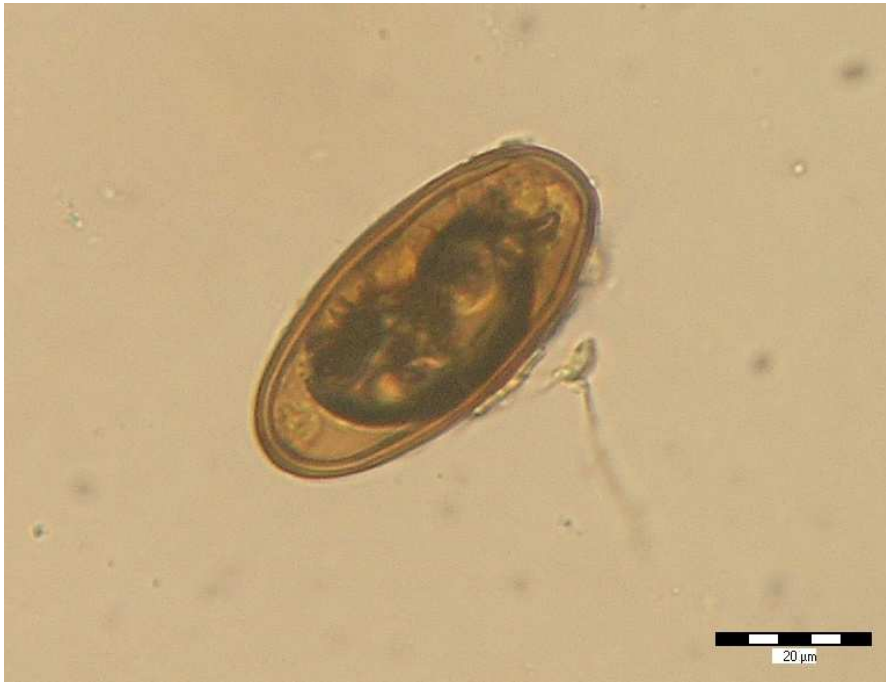
Obrázek 16 – *T. trichiura*, ze vzorku č. 182, flotace
Typický citronkovitý tvar, pólové zátky, s granulací vnitřního obsahu



Obrázek 17 – Masivní nález *T. trichiura*, ze vzorku č. 123, flotace



Obrázek 18 – *E. vermicularis*, ze vzorku č. 251, flotace
Mírně zdeformované vajíčko, stále patrný dvojitý hladký obal a lehká asymetrie ve tvaru vajíčka, mineralizovaný obsah



Obrázek 19 – *Enterobius vermicularis*, ze vzorku č. 152, flotace
Dvojitý hladký obal, mírně asymetrický tvar, mineralizovaný obsah



Obrázek 20 – *Ancylostoma duodenale*, ze vzorku č. 90, flotace
Že by se mohlo jednat o vajíčko měchovce, naznačuje rýhování na spodní straně
vnitřního obsahu

5.2. Detekce antigenů parazitických protist

5.2.1. Detekce antigenu *Giardia intestinalis*

Metodou ELISA jsem testovala vzorky výlučně z jímky 938. Výsledky pocházejí z několika pokusů, kde cut-off se liší podle aktuálních hodnot absorbancí negativních kontrol kitu.

pokus	č. vzorku	vrstva	ELISA cut-off	A	ELISA výsledek	mikroskopie nálezy
1	7	108	0,386	0,253	negativní	tr ● ta ● as ●
	72	141		0,411	pozitivní	tr ●●
	145	149		0,103	negativní	tr ▲
	152	150		0,308	negativní	tr ▲ ta ●
	174	154		0,401	pozitivní	tr ●●● as ●
	216	161		0,124	negativní	tr ●
2	7	108	0,374	0,173	negativní	tr ● ta ● as ●
	61	132		0,277	negativní	0
	84	141		0,379	pozitivní	tr ●●
	174	154		0,221	negativní	tr ●●● as ●
	211	159		0,208	negativní	tr ●● as ●
3	45	118	0,369	0,213	negativní	tr ●● ta ●
	84	141		0,428	pozitivní	tr ●●
	137	149		0,603	pozitivní	tr ▲
	174	154		0,229	negativní	tr ●●● as ●
	206	159		0,256	negativní	tr ▲

pokus	č. vzorku	vrstva	ELISA cut-off	A	ELISA výsledek	mikroskopie nálezy
4	13	114	0,380	0,257	negativní	tr ● as ●
	72	141		0,448	pozitivní	tr ●●
	117	146		0,264	negativní	tr ●●●●●
	137	149		0,254	negativní	tr ▲
	151	150		0,253	negativní	tr ●●● as ●
	198	158		0,247	negativní	tr ●● as ●
	216	161		0,231	negativní	tr ●
5	72	141	0,394	0,371	negativní	tr ●●
	90	2/146		0,190	negativní	tr ●● ta ●
	137	149		0,303	negativní	tr ▲
	145	149		0,291	negativní	tr ▲
	162	152		0,247	negativní	tr ▲
	207	159		0,446	pozitivní	tr ●● as ●

Tabulka 6 – Výsledky detekce antigenu *G. intestinalis* metodou ELISA. Zkratky a symboly: A = absorbance, tr = *Trichuris trichiura*, ta = *Toxocara canis/cati*, as = *Ascaris lumbricoides*; 0 negativní, ● 1-10, ●● 11-20, ●●● 21-30, ●●●● 31-40, ●●●●● 41-50, ▲ nad 50 ks vajíček

5.2.2. Detekce antigenu *Entamoeba histolytica*

Metodou ELISA jsem testovala vzorky výlučně z jímky 938. Výsledky pocházejí z několika pokusů; cut-off je pevně stanoven výrobcem kitu na 0,15.

pokus	č. vzorku	vrstva	A	ELISA výsledek	mikroskopie nálezy
1	48	118	0,040	negativní	tr ● db ● fs ●
	72	141	0,139	negativní	tr ●●
	123	147	0,062	negativní	tr ▲ as ● db ● fs ●
	174	154	0,092	negativní	tr ●●● as ●
2	7	108	0,047	negativní	tr ● ta ● as ●
	72	141	0,086	negativní	tr ●●
	145	149	0,041	negativní	tr ▲
	152	150	0,043	negativní	tr ▲ as ●
	174	154	0,142	negativní	tr ●●● as ●
	216	161	0,046	negativní	tr ●
3	45	118	0,065	negativní	tr ●● ta ●
	150	150	0,074	negativní	tr ●●●
	162	152	0,155	pozitivní	tr ▲
	211	159	0,086	negativní	tr ●● as ●

Tabulka 7 – Výsledky detekce antigenu *E. histolytica* metodou ELISA. Zkratky a symboly: A = absorbance, tr = *Trichuris trichiura*, ta = *Toxocara canis/cati*, as = *Ascaris lumbricoides*, fs = *Fasciola hepatica*, db = *Diphyllobothrium latum*; ● 1-10, ●● 11-20, ●●● 21-30, ●●●● 31-40, ●●●●● 41-50, ▲ nad 50 ks vajíček

5.3. Polymerázová řetězová reakce

DNA jsem izolovala a provedla nested-PCR. Po elektroforetickém dělení výsledných produktů se však bandy jeví jako nespecifity. Navíc se objevila kontaminace negativní kontroly. Získanou DNA jsem proto vysušila a opakovala PCR se zakoncentrovanými vzorky. Jasný pozitivní výsledek vykazala pouze DNA izolovaná ze stolice pacienta s giardiózou, ostatní vzorky byly negativní.

6. Diskuze

O parazitech se předpokládalo, že nemohou zanechat v archeologickém materiálu žádné stopy (Araújo et al. 2003). Nicméně průkopník paleoparazitologie Ruffer prokázal svým nálezem schistosom na histologickém řezu ledvinou egyptské mumie opak a ukázal tak cestu k novému oboru (Araújo et al. 1998). Postupně bylo prokázáno, že koprolity nebo i sedimenty mohou obsahovat vajíčka parazitů, což dokládá množství prací. Většina z nich vyšetřuje vzorky sedimentačními nebo flotačními metodami po předchozí rehydrataci roztokem fosforečnanu trisodného. Ve své práci jsem měla k dispozici vzorky sedimentu ze středověkých odpadních jímek. Na každý vzorek jsem použila dvě metody a ocenila jsem i výhodu rehydratace. Máčením v roztoku fosforečnanu trisodného se od sebe zemina dokonale oddělí. Na preparátu pak je minimum shluků, které se zhusta vyskytují pokud se zpracovává materiál přímo metodou AMS III. Ty potom značně ztěžují identifikaci vajíček. Navíc literatura uvádí, že rehydratovaná vajíčka helmintů jsou velikostně téměř nezměněná (Confalonieri et al. 1985, Gonçalves et al. 2003).

Co se týká spektra patogenů jsou moje nálezy v dobré shodě s literaturou zabývající se podobnými nalezišti. *Trichuris* sp., *Ascaris* sp. popř. *Ancylostoma* sp. nacházíme všude tam, kde byly zoufalé hygienické podmínky. To pro středověk platí vrchovatě, neboť odpad se ukládal, kde se dalo – do vyhloubených odpadních jam, ale i kdekoli na dvoře nebo před dům na ulici (Musil, osobní komunikace). Navíc v (polo)zemnici i v pozdějších roubených nebo zděných domech žilo natěsnáno mnoho lidí, často i tři generace. Lidé měli málo oblečení, chudí lidé většinou jen jedno a spodní oděv se nosil přes den a na spaní. Lidé se zřídkakdy myli, jednak z důvodu relativního nedostatku vody (vlastní studnu měli jen bohatší lidé, většina musela nosit vodu ze společné kašny na náměstí), jednak proto, že existovala všeobecná představa, že voda škodí a lidský organismus oslabuje (Vondruška, 2007). Všechny tyto skutečnosti způsobily, že lidé byli geohelmintry doslova zamořeni.

Kvantitativní analýza podsouvá, že *Trichuris trichiura* je dominantním parazitem. Ve vyvození takového závěru bych byla opatrná, neboť se musí vzít v úvahu fakt, že rozdílné druhy mají rozdílnou produkci vajíček, a rovněž také to, že vajíčka různých druhů jsou více či méně náchylná k rozkladu. Z tohoto důvodu jsou vzácně nacházena vajíčka tenkostěnná, např. *Enterobius* sp., ale rozdílně jsou zachovávána i vajíčka tlustostěnná. Ačkoli někteří autoři uvádějí, že se vajíčka *T. trichiura* v latrínách rozkládají plísněmi (Reinhard 1992), v odpadních jímkách na nalezišti v Chrudimi je naopak druhem, který se zachoval nejlépe.

Ascaris lumbricoides je na lokalitě druhým nejnalézanějším parazitem. Poměrně často byla nalezena i vajíčka *Toxocara canis/cati*, což ukazuje na přítomnost psů a koček na lokalitě. Dokládají to nálezy několika kompletních koster (pravděpodobně uhynulé kusy) (Musil, osobní komunikace).

Udivuje mě ovšem, že jsem nenašla vajíčka kapilárie, která se jinak nalézají celkem hojně (Bouchet 1997, Dittmar et Teegen 2003, Fernandes et al. 2005), protože je produkují ve středověku všudypřítomní hlodavci. Nepřipadá mi pravděpodobné, že by se chrudimští potkanů a krys kompletně zbavili. Možná že vajíčka byla v jímkách jen sporadicky. Hlodavci mnohem častěji roznášeli trus s vajíčky na volném povrchu kolem domu a povětrnostní podmínky je zničily.

Ojedinělý nález vajíčka měchovce by bylo třeba potvrdit podrobnějším výzkumem a pravděpodobně i molekulárními metodami. Nemohu vyloučit, že středověká kuchyň v (polo)zemnici, která nemá okna a podlaha je tvořena jen udusanou hlínou, mohla vytvořit vhodné podmínky pro vývoj vajíček měchovce. Ačkoli Šebela uvádí nález vajíčka měchovce z doby bronzové u Hulína (Šebela et al. 1990, Aspöck et al. 1999), jsou někteří autoři ohledně možného výskytu tohoto druhu na Moravě před 3500 lety skeptičtí. Rozhodně je třeba výzkumem na dalších lokalitách objasnit otázku, zda se mohla *Ancylostoma duodenale* alespoň ohniskovitě na našem území nacházet, když v současné době je areál rozšíření měchovce v tropech a subtropích.

Nález vajíček *Diphyllobothrium latum* naznačuje, že chrudimští měli přístup k rybám. Potvrzují to opět kosterní nálezy. I když vajíček bylo nalezeno poměrně málo (celkem 14 ve čtyřech vrstvách), může jít i tak o doklad pravé infekce člověka. Vajíčka *D. latum* jsou tenkostěnná a více se jich zřejmě nedochovalo. Infikované zbytky mohly být také podány domácím zvířatům, a ty mohou být rovněž zdrojem vajíček. Přesto se k této verzi nepřikláním, protože kvalitního jídla bylo po celý středověk málo a lidé se naučili využít z něj maximum. Zbytky po zpracování ryb spíše posloužily na vývar do polévky (Musil, osobní komunikace).

Z třídy Cestoda je ojedinělý nález vajíčka připomínající *Hymenolepis nana*. Je třeba opět vzít v úvahu, že zdrojem kromě člověka mohou být i hlodavci.

Překvapením pro mě bylo, že jsem nenašla ani jedno vajíčko *Taenia* sp. Přitom důvodem nemohla být nedostupnost masa, protože na lokalitě bydleli poměrně bohatí měšťané (nález kupeckého závaží, luxusního skla a porcelánu) (Musil, osobní komunikace). Spíše se domnívám, že v českých poměrech se nerozšířil zvyk konzumace polosyrového masa, jako u francouzských měšťanů a šlechticů (Bouchet et al. 2003c, da Rocha et al. 2006). Pokud

by tedy chrudimští dávali přednost masu pečenému nebo důkladně uvařenému, zničili by tím infekční stádia a nemohli být proto tasemnicí infikováni.

Několik vajíček motolice rodu *Fasciola*, která jsem našla, považuji vzhledem k počtu za transitní vajíčka, která pouze beze změny prošla trávicí trubicí člověka po požití infikovaných jater. Stejně tak je možné, že vajíčka pochází přímo od domácích zvířat, nicméně přítomnost chlívků nebyla na lokalitě jednoznačně potvrzena (Musil, osobní komunikace).

Doslova pár nalezených vajíček roupa je vzácností. *Enterobius vermicularis* se jako tenkostěnné vajíčko uchovává velmi špatně a dosud je dokumentovaných nálezů v Evropě pouze několik (Gonçalves et al. 2003). Nalezen byl ve vrstvě jílovitého charakteru, která s největší pravděpodobností jeho uchování umožnila. Literatura uvádí, že vedle mrazivých a extrémně suchých lokalit, je vlhké anaerobní prostředí ideální pro uchování struktur vajíček parazitů (Araújo et al. 2000, Bouchet et al. 2003c, da Rocha et al. 2006).

Výsledky ELISA testu již nelze tak jednoznačně zhodnotit jako přímou mikroskopii. Vzhledem k tomu, že na preparátech jsem nenašla cysty parazitických protist, nebyla ELISA metodou konfirmační, ale pokoušela jsem se určit, zda materiál vůbec mohl obsahovat antigeny parazitických protist. Stejně jako u patientských vzorků nejsou cysty (a ani antigeny) uvolňovány kontinuálně a jsou ve stolici rozmístěny spíše shlukovitě a nerovnoměrně (García et al. 2000, Gonçalves et al. 2002), musíme tento fakt vzít v úvahu i v případě vyšetřování vzorků archeologických. Tím si mimo jiné vysvětluji skutečnost, že jsem ve vzorku v jednom pokusu detekovala antigen a v dalším pokusu již stejný vzorek vykazoval negativní výsledek. Pracovala jsem pečlivě a snažila se tak minimalizovat tzv. lidský faktor, který by mohl způsobit nepřesné výsledky. Přesto bych výsledky hodnotila s určitou mírou kritičnosti, neboť téma možnosti detekce antigenů parazitických protist v archeologickém materiálu je ještě poměrně mladé, než aby v něm bylo mnoho zkušeností. Za pravděpodobně pozitivní vzorky bych považovala ty, které jako pozitivní vyšly alespoň ve dvou pokusech a v jednom pokusu pozitivní vzorky bych pokládala za potenciálně pozitivní. Jistotu, že pozitivní výsledek bude znamenat detekci příslušného antigenu a ne pouze nespecifickou reakci, jsem zvýšila zařazením vlastní negativní kontroly. Inkubace jamky vzorkem zahradní hlíny vždy vykazovala hodnoty absorbance nižší než stanovený cut-off.

Odolnost antigenní struktury GSA 65, což je hlavní povrchový antigen *Giardia intestinalis*, testoval Rosoff již v roce 1986. Zjistil, že GSA65 je stále nezměněně imunoreaktivní po varu (10 min), proteolytickém štěpení (trypsinem, chymotrypsinem, proteázou), fixaci formalínem i po dlouhodobém uchovávání (6 měsíců při 4 i -20°C) (Rosoff

et Stibbs 1986). Identifikace a charakterizace GSA65 nakonec ukázala jeho použitelnost pro výrobu koprodungostické ELISA soupravy. V případě *Entamoeba histolytica* je takovým antigenem Gal/GalNAc lektin. Při použití monoklonální protilátky je možné odlišit *E. histolytica* od nepatogenní *E. dispar*. Tyto testy společně s nedávnými studiemi týmu paleoparazitologů kolem Gonçalvesa napovídají, že antigení struktury se skutečně mohou v archeologickém materiálu uchovat (Gonçalves et al. 2002, 2004). Přesto si myslím, že metodou číslo jedna do budoucnosti je izolace a detekce DNA. V případě pozitivního výsledku lze totiž finální produkt sekvenovat a tak jednoznačně potvrdit/vyvrátit přítomnost konkrétní DNA parazitických protist ve vzorku. V mém případě jasný pozitivní výsledek na přítomnost DNA *Giardia intestinalis* vykázal pouze izolát ze stolice pacienta s giardiózou, ostatní testované vzorky byly negativní. Další testy provedeny nebyly – jednak kvůli nedostatku času, jednak proto, že PCR analýza ani původně nebyla předmětem mé diplomové práce. Pokusila jsem se tak verifikovat pozitivní výsledky ELISA testů, nicméně z jednoho PCR pokusu se nedají uvážené závěry vyvozovat. DNA stejně jako cysty nebude v materiálu rozmístěna rovnoměrně. Musíme si rovněž položit otázku, do jaké míry je DNA z archeologické vykopávky poškozena. Literatura uvádí, že je výhodné nejdříve vystavit aDNA rekonstruktivní polymeraci za nepřítomnosti specifických primerů – malé fragmenty se přikládají k sobě homologními částmi a jejich 3' konce slouží jako primery pro polymeraci. Fragmenty se zvětšují a je pak možné nějaké sekvence získat (Golenberg et al. 1996). Na druhou stranu je možné užít RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR), protože cílová sekvence je většinou neznámá a tento druh PCR narozdíl od ostatních používá jen jeden velmi krátký libovolný oligonukleotid, obvykle s deseti bázemi. Studie na rostlinných a lidských nematodech ukázaly její velkou účinnost odlišit profily amplikonů a schopnost rozlišit polymorfismus mezi organismy (Martinez et al. 2003).

7. Závěr

Z literárních údajů i z mých výsledků vyplývá, že parazitologickým vyšetřením archeologického materiálu lze získat cenné informace o životě lidí v minulosti. Spektrum parazitů pak vypovídá o potravních zvyklostech a úrovni hygieny a jejich změnách v průběhu času. Kromě nálezů vajíček helmintů lze v určitých případech pátrat i po zbytcích antigenů jednobuněčných parazitů serologickými metodami a po zbytcích DNA molekulárními metodami.

V materiálu z parcel tří domů v Hradební ulici v Chrudimi jsem našla vajíčka následujících helmintů: *Fasciola hepatica*, *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis/cati*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* a *Ancylostoma duodenale*; přičemž *Ascaris lumbricoides* a *Trichuris trichiura* představují nejhojněji nalezené druhy. Parazitofauna lokality svědčí o častém fekálně-orálním transportu parazitů v důsledku nízké hygieny, a to nejen ve středověku, ale podle nálezů až do počátku 18. století.

Lze vyvodit, že potrava obyvatelstva té doby obsahovala sladkovodní ryby (nález *Diphyllobothrium latum*), naopak se nepodařilo prokázat, že by chrudimští konzumovali (polo)surové vepřové nebo hovězí maso, neboť jsem nenalezla ani jediné vajíčko *Taenia solium/saginata*.

Absence většího množství parazitů zvířat svědčí o tom, že na lokalitě žilo městské obyvatelstvo, nezabývající se chovem hospodářských zvířat. Nálezy *Toxocara* sp. napovídají, že se zde psi a kočky volně pohybovali nebo je lidé přímo cíleně chovali.

Co se metodiky týká rozhodně mohu doporučit vzorky před vlastním zpracováním rehydratovat 0,5% roztokem fosforečnanu trisodného minimálně 48 hodin. V případě testování ELISA metodou je vhodné zařadit vlastní pozitivní (patientský vzorek) a negativní (parazitů prostou zeminu) kontrolu z důvodu snížení možnosti falešně pozitivního výsledku. Jako slibnější metodu do budoucna bych viděla izolaci a detekci DNA. Zde je velká výhoda v možnosti sekvenace finálních produktů, a tak jednoznačné identifikace druhu.

8. Literatura

- ALLISON M. J., BERGMAN T., GERSZTEN E. (1999) – **Further studies on fecal parasites in antiquity.** *American Journal of Clinical Pathology* 112: 605-609
- ANDERSON R. C. (2000) – **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission.** CABI Publishing, Oxon, 2nd edition
- ARAÚJO A., REINHARD K., BASTOS O. M., COSTA L. C., PIRMEZ C., IÑIGUEZ A., VICENTE A. C., MOREL C. M., FERREIRA L. F. (1998) – **Invited review paleoparasitology: Perspectives with new techniques.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40 (6): 371-376
- 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
- ASH L. R., ORIHEL T. C. (2007) – **Atlas of human parasitology.** American Society for Clinical Pathology Press, 5th edition
- ASPÖCK H., AUER H., PICHER O. (1996) – ***Trichuris trichiura* eggs in the Neolithic glacier mummy from the Alps.** *Parasitology Today* 12 (7): 255-256
- ASPÖCK H., AUER H., PICHER O. (1999) – **Parasites and parasitic diseases in prehistoric human populations in central Europe.** *Helminthologia* 36 (3): 139-145
- LeBAILLY M., LUEZINGER U., SCHLICHOTHERLE H., BOUCHET F. (2005) – ***Diphyllobothrium*: Neolithic parasite?** *Journal of Parasitology* 91 (4): 957-959
- BOUCHET F. (1997) – **Intestinal capillariasis in neolithic inhabitants of Chalain (Jura, France).** *Lancet* 349: 256
- BOUCHET F., LEFÉVRE C., WEST D., CORBETT D. (1999) – **First paleoparasitological analysis of a midden in the Aleutian islands (Alaska): results and limits.** *Journal of Parasitology* 85 (2): 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).** *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 (300000-500000 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
- CABELLO F. C. (2007) – **Acuicultura y salud pública. La expansión de la difilobotriasis en Chile y el mundo.** Revista Médica de Chile 135: 1064-1071
- COCKBURN T. A. (1971) – **Infectious diseases in ancient populations.** Current Anthropology 12 (1): 45-62
- CONBOY G. (1997) – **Giardia.** Canadian Veterinary Journal 38: 245-247
- 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
- COOPER E. S., BUNDY D. A. P. (1988) – **Trichuris is not trivial.** Parasitology Today 4 (11): 301-306
- COX, F. E. G. (2002) – **History of human parasitology.** Clinical Microbiology Reviews, Oct., 595-612
- CRAIG P., ITO A. (2007) – **Intestinal cestodes.** Current Opinion in Infectious Diseases 20: 524-532
- 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
- DORNY P., PRAET N. (2007) – **Taenia saginata in Europe.** Veterinary Parasitology 149: 22-24
- FAULKNER C. T., SHARON P., JOHNSON S. S. (1989) – **Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone cave, Van Burden, Tennessee.** Journal of Parasitology 75: 461-463
- FERREIRA L. F., ARAÚJO A., DUARTE A. N. (1993) – **Nematode larvae in fossilized animal coprolites from Lower and Middle Pleistocene sites, Central Italy.** Journal of Parasitology 79(3): 440-442
- FERNANDO 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
- FROLÍK J., SIGL J. (1998) – **Chrudim v pravěku a středověku. Obrazy každodenního života.** Okresní muzeum Chrudim
- FROLÍK J., MUSIL J. (2007) – **Záchranné archeologické výzkumy v Chrudimi v roce 2006. Archeologické výzkumy v Čechách 2006.** Zprávy České společnosti archeologické, Suppl. 68: 46 – 48.
- FRY G. F., MOORE J. G. (1969) – **Enterobius vermicularis: 10000-year-old human infection.** Science 166: 1620
- FUGASSA M., GUICHÓN R. (2005) – **Análisis paleoparasitológico de coprolitos hallados en sitios arqueológicos de Patagonia Austral: definiciones y perspectivas.** Magallania (Chile) 33(2): 13-19
- GARCÍA L. S., SHIMIZU R. Y., BERNARD C. N. (2000) – **Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the Triage parasite panel enzyme immunoassay.** Journal of Clinical Microbiology 39 (9): 3337-3340
- GOLENBERG E. M., BICKEL A., WEIHS P. (1996) – **Effect of highly fragmented DNA to PCR.** Nucleic Acids Research 24 (24): 5026-5033
- GONCALVES 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
- GONCALVES 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
- GONCALVES M. L. C., da SILVA V. L., de ANDRADE C. M., REINHARD K., da ROCHA G. Ch., Le BAILLY M., BOUCHET F., FERREIRA L. F., ARAÚJO A. (2004) – **Amoebiasis distribution in the past: first steps using an immunoassay technique.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 98: 88-91
- GUHL F., JARAMILLO C., YOCKTENG R., VALLEJO G. A., ARROYO F. C. (1997) – ***Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies.** Lancet 349: 1370
- HIDALGO-ARGÜELLO M. R., BAÑOS N. D., GRANDES J. F., MARCOS E. P. (2003) – **Parasitological analysis of Leonese royalty from Collegiate-basilica of St. Isidoro,**

- León (Spain): Helminths, Protozoa, and Mites.** Journal of Parasitology 89 (4): 738-743
- HUSTON Ch. D., HAQUE R., PETRI W. A., Jr. (1999) – **Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection.** Expert reviews in molecular medicine 22: 1-11. Cambridge University Press
- IÑIGUEZ A. M., REINHARD K., GONCALVES M. L. C., FERREIRA L. F., ARAÚJO A., VICENTE A. C. P. (2006) – **SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites.** International Journal for Parasitology 36: 1419-1425
- JÍRA J. (1998) – **Lékařská helmintologie.** Galén Praha
- JOUY-AVANTIN F., DEBENATH A., MOIGNE A-M., MONÉ H. (2003) – **A standardized method for the description and the study of coprolites.** Journal of Archaeological Science 30: 367-372
- JUNCKER-VOSS M., PROSL H., LUSSY H., ENZENBERG U., AUER H., NOWOTNY N. (2000) – **Serological detection of *Capillaria hepatica* by indirect immunofluorescence assay.** Journal of Clinical Microbiology 38 (1): 431-433
- LOREILLE O., ROUMAT E., VERNEAU O., BOUCHET F., HÄNNI C. (2001) – **Ancient DNA from *Ascaris*: extraction, amplification and sequences from eggs collected in coprolites.** International Journal for Parasitology 31: 1101-1106
- LOREILLE O., BOUCHET F. (2003) – **Evolution of *Ascaris* in humans and pigs: a multi-disciplinary approach.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 98 (Suppl. I): 39-46
- MARTINES E. M., CORREIA J. A. S., VILLELA E. V. (2003) – **Random amplified polymorphic DNA analysis of DNA extracted from *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) eggs and its prospective application to paleoparasitological studies.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 98 (Suppl. I): 59-62
- MAS-COMA M. S., ESTEBAN J. G., BARGUES M. D. (1999) – **Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification.** Bulletin of the World Health Organization 77: 340-346
- MONIS P. T., ANDREWS R. H., MAYRHOFER G., EY P. L. (2003) – **Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin.** Infection, Genetics and Evolution 3: 29-38
- MUSIL, J., Mgr., archeolog, vedoucí oddělení sbírek, Regionální muzeum v Chrudimi

- NABI F., PALAHA H. K., SEKHSARIA D., CHIATALE A. (2007) – ***Capillaria hepatica* infestation.** Indian Pediatrics 44: 781-782
- PEDUZZI R., PIFFARETTI J. C. (1983) – **Ancylostoma duodenale and the Saint Gothard anaemia.** British Medical Journal 287: 1942-1945
- REINHARD K. J. (1992) – **Parasitology as an interpretative tool in archeology.** American Antiquity 57 (2): 231-245
- RIM H-J., FARAG H. F., SORNMANI S., CROSS J. H. (1999) – **Food-borne trematodes: ignored or emerging?** Parasitology Today 10 (6): 207-209
- da ROCHA G. Ch., HARTEK-LAILHEUGUE S., Le BAILLY M., ARAÚJO A., FERREIRA L. F., da SERRA-FREIRE 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 (Suppl. II): 43-52
- ROSOFF J. D., STIBBS H. H. (1986) – **Physical and chemical characterisation of *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of giardiasis.** Journal of Clinical Microbiology 24 (6): 1079-1083
- STEWART I. E. (1951) – **Helminths in history.** The Scientific Monthly 72 (6): 345-352
- ŠEBELA L., VOJTKOVÁ L., VOJTEK J. (1990) – **Intestinal parasites in man of old bronze age.** Anthropologie 28 (1): 105-107
- ŠLAJS J. (1973) – **The finding and identification of solitary *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) in man from Europe.** Folia Parasitologica 20: 149–161
- TAYLOR E. L. (1955) – **Parasitic helminths in medieval remains.** Veterinary Record 67: 216-218
- TORRES P., VILLALOBOS L., WOELFL S., PUGA S. (2004) – **Identification of the Copepod intermediate host of the introduced Broad fish tapeworm, *Diphyllobothrium latum*, in Southern Chile.** Journal of Parasitology 90 (5): 1190-1193
- VOLF P., HORÁK P. a kol. (2007) – **Paraziti a jejich biologie.** Nakladatelství TRITON, Praha, 1. vydání
- VONDRUŠKA V. (2007) – **Intimní historie.** Nakladatelství Moba, Brno

9. Příloha

1) Časová osa

pravěk

- doba kamenná
 - starší

paleolit 3 mil př. n. l. – 11 tis. př. n. l.

mezolit do 8 tis př. n. l.
 - mladší

neolit do 5200 př. n. l.

eneolit do 3500 př. n. l.
- doba bronzová
 - starší do 1550 př. n. l.
 - střední do 1330 př. n. l.
 - mladší do 750 př. n. l.
- doba železná
 - starší (halštatská) do 400 př. n. l.
 - mladší (laténská) do 0
- doba římská 0 – 400 n. l.
- doba stěhování národů po 400 n. l.

středověk

- raný 476 (pád západořímské říše) – 11. stol n. l.
- vrcholný 11. – 14. stol n. l.
- pozdní 14. stol n. l. – 1492 (objevení Ameriky)

novověk

- raný do 1789 (začátek francouzské revoluce)
- vrcholný do 1914

moderní dějiny

2) Charakteristika vajíček vybraných druhů helmintů (podle Ash a Orihel, 2007)

název	tvar	obal	operculum	char. znaky	rozměry
<i>Ancylostoma duodenale</i>	oválný	tenký	ne	ve výkalech segmentované vajíčko – obvykle 4 nebo 8 blastomer	55-65 x 36-40 μm
<i>Ascaris lumbricoides</i> oplozený	oválný	tlustý	ne	bradavičnatý povrch možné dekortikované vajíčko – chybí typický obal	55-75 x 35-50 μm
<i>Ascaris lumbricoides</i> neoplozený	protáhlý oválný	tenký	ne	bradavičnatý povrch normálně, lehce nebo vůbec uvnitř vysoce lomivá granulární masa	85-95 x 43-47 μm
<i>Capillaria hepatica</i>	soudečkovitý	tlustý	ne	v podélném řezu radiálně proužkovaný obal, při zaostření na povrch struktura připomínající vodní meloun	51-67 x 30-35 μm
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	oválný	tlustý	ano	na pólech rovné zátky vajíčko ve výkalech obsahuje miracidium	38-45 x 22-30 μm
<i>Diphyllobothrium latum</i>	ovoidní	tenký	ano	většinou „knob“ na aboperculárním konci	58-75 x 40-50 μm
<i>Enterobius vermicularis</i>	protáhlý oválný	tenký	ne	na jedné straně zploštělé (krajíc chleba)	50-60 x 20-30 μm
<i>Fasciola hepatica</i>	oválný	tenký	ano	operculum malé nenápadné	130-150 x 63-90 μm
<i>Hymenolepis nana</i>	sférický	tenký	ne	uvnitř onkosféra s 6 háčky	ø 30-47 μm
<i>Hymenolepis diminuta</i>	(téměř) sférický	tenký	ne	uvnitř onkosféra s 6 háčky velký prostor mezi vajíčkem a obalem	70-85 x 60-80
<i>Schistosoma mansoni</i>	protáhlý oválný	tenký	ne	laterální trn	114-175 x 45-70 μm
<i>Schistosoma haematobium</i>	protáhlý oválný	tenký	ne	trn na jednom pólu	112-170 x 40-70 μm
<i>Taenia saginata/solium</i>	sférický	tlustý	ne	radiálně pruhovaný obal uvnitř onkosféra s 6 háčky	ø 31-43 μm
<i>Toxocara canis</i>	téměř sférický	tlustý	ne	d'olíčkovatý povrch (golfový míček)	80-85 x 75 μm
<i>Toxocara cati</i>	téměř sférický	tlustý	ne	jemnější d'olíčkovatý povrch (golfový míček)	65-75 μm

<i>Toxascaris leonina</i>	téměř sférický	tlustý	ne	hladký obal, vnitřní vitelinní membrána zmačkaná, vajíčko rozděleno na světlou a tmavou granulovanou hemisféru	75-85 x 60-75
<i>Trichuris trichiura</i>	citrónkovitý	tenký	ne	na pólech vypouklé zátky	50-55 x 22-24 μm
<i>Trichuris vulpis</i>	široký citrónkovitý	tenký	ne	na pólech vypouklé zátky	72-90 x 32-40 μm