

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

STŘEVNÍ PARAZITI ZE STŘEDOVĚKÉ LOKALITY V
PRAZE

Diplomová práce

Vypracovala: Bc. Tereza Říhová

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

Školitel specialista: RNDr. Eva Myšková

České Budějovice 2016

Říhová, T., 2016: Střevní paraziti ze středověké lokality v Praze. [Intestinal parasites from the medieval site in Prague. Mgr. Thesis, in Czech.] – 52 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to examine the archeological material from medieval site in Prague and identify human or animal intestinal parasite eggs or cysts. The concentration methods were used for parasite identification and polymerase chain reaction (PCR) was used for detection of parasitic protist DNA. In comparison with the results of most of similar research, the occurrence of parasites was low.

Prohlašuji, že jsem svou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - 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 18. 4. 2016

.....
Bc. Tereza Říhová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za vedení této diplomové práce, za jeho odbornou pomoc a cenné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat mé školitelce specialistce RNDr. Evě Myškové za ochotu mi vždy poradit a pomoci s jakýmkoliv problémem v laboratoři. Poděkování patří i Mgr. Petru Starcovi za poskytnutí archeologického materiálu. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za morální a finanční podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. STŘEVNÍ HELMINTI.....	2
1.1.1 TREMATODA.....	2
1.1.2 CESTODA.....	6
1.1.3 NEMATODA.....	8
1.1.4 STŘEVNÍ PROTISTA.....	15
1.2. PARAZITI VE TKÁNÍCH.....	17
1.2.1. HAEMATOZOEIA.....	17
1.2.2. KINETOPLASTEA.....	18
1.3. VÝVOJ METOD V PALEOPARAZITOLOGII.....	19
2. CÍLE PRÁCE	20
3. POUŽITÝ MATERIÁL A METODY	21
3.1. NALEZIŠTĚ A MATERIÁL.....	21
3.2. METODY.....	24
3.2.1. REHYDRATAČE.....	24
3.2.2. SEDIMENTACE AMS III.....	25
3.2.3. FLOTACE DLE KOZÁKA A MÁGROVÉ (KOMA).....	26
3.2.4. MIKROSKOPIE.....	26
3.2.5. IZOLACE DNA.....	27
3.2.6. NESTED PCR.....	28
3.2.7. ELEKTROFORÉZA.....	32
4. VÝSLEDKY	33
4.1. MIKROSKOPIE.....	33
4.2. FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE.....	34
4.3. DETEKCE PROTOZOÁRNÍ DNA.....	37
5. DISKUSE	39
6. ZÁVĚR	44
7. SEZNAM LITERATURY	45

1. ÚVOD

Paleoparazitologie je poměrně novým vědním oborem, který umožňuje studium parazitů nalezených v archeologickém materiálu. Za průkopníka paleoparazitologie je považován Marc Armand Ruffer, který na začátku 20. století rehydratoval tkáň ledvin Egyptské mumie staré více než 3000 let. Výsledkem byl nález kalcifikovaných vajíček *Schistosoma haematobium*, neboli krevničky močové. Přestože se v první polovině 20. století objevují i další práce, které popisují nález parazitů v archeologickém materiálu, největšího rozmachu tento obor dosáhl až po roce 1960. V posledních desetiletích dochází k výraznému rozvoji paleoparazitologie a to zásluhou zavedením technik molekulární biologie (Ruffer 1910, Araújo et al. 1998).

Cílovým materiálem paleoparazitologie nejsou jen mumifikované části těla, ale také organické sedimenty z jímek nebo studní, koprolity (sušené nebo mineralizované výkaly) a vzorky z hrobů (Fernandes et al. 2005). Organické zbytky lze nalézt v různých prostředích, ovšem nejlépe zachovaná vajíčka se nacházejí v anaerobním vlhkém, nebo naopak suchém prostředí (Araújo et al. 2000). Paleoparazitologické nálezy se tedy skládají převážně z vajíček, zřídka z vývojových stádií (larev) střevních parazitů a z chitinových kutikul ektoparazitů jako jsou vši, roztoči a blechy. Je známo, že některé biogenní struktury, jako jsou např. pylová zrna, mohou zůstat zachovány po velmi dlouhou dobu a to za různých podmínek, zatímco parazitičtí červi, kteří produkují tenkostěnná vajíčka, nejsou mnohdy odolní vůči zátěžovým faktorům prostředí. Nicméně, vajíčka některých druhů hlístic z čeledi Ascaridae, Capillaridae, Trichuridae, Oxyuridae a Taeniidae jsou opatřeny ochrannými obaly, které vajíčko chrání a to zůstává dobře zakonzervováno pro další zkoumání. Jejich záchyt v archeologickém materiálu je velmi častý (Bouchet et al. 2003a).

Nálezy vajíček různých parazitů nám pomáhají poznat onemocnění, kterými trpěli lidé v minulosti a i ty, které se vyskytují v současné době. Parazitologické studie archeologických lokalit lze použít k interpretaci nejenom nemocí, ale poukazují i na kulturní rozvoj lidstva a samozřejmě také na hygienické a stravovací návyky (Reinhard 1992).

1.1. STŘEVNÍ HELMINTI

1.1.1 TREMATODA

Třída Trematoda, neboli motolice patří do kmene Platyhelminthes (ploštěnci). Většina zástupců této třídy mají dorsoventrálně zploštělé tělo, ovšem některé druhy mohou mít tvar těla oválný, nebo hruškovitý. Velikost dospělců se pohybuje od několika milimetrů až po několik centimetrů a největším zástupcem je *Fasciola gigantica*, která měří až 10 cm. Na povrchu těla mají typické přísavky. Rostrální (ústní) je určena k přichycení k povrchu a slouží také jako ústní otvor, zatímco ventrální (břišní) splňuje jen funkci přichycení. Motolice jsou schopné žít delší dobu bez přístupu kyslíku. Zástupci třídy trematoda jsou hermafrodité, kromě čeledi Schistosomatidae. Vývojový cyklus zahrnuje většinou 1-3 hostitele. Z oplozeného vajíčka se líhne ve vnějším prostředí miracidium (obrvená larva). Vhodným mezihostitelem je vodní plž, v kterém dochází k dalšímu vývoji motolice (Volf et al. 2007).

1.1.1.1 ČELEĎ FASCIOLIDAE

Fasciola hepatica (Linné, 1758)

Fasciola hepatica je celosvětově rozšířený parazit napadající játra savců. Tato motolice patří mezi největší lidské parazity – dospělec dosahuje 25-30 mm. Společně s druhem *Fasciola gigantica* způsobují onemocnění fasciolózu. Mezi nejčastější definitivní hostitele patří člověk, skot a králík. Mezihostitelem je vodní plž z čeledi Lymnaeidae (plovatkovitých). K nákaze dochází po pozření metacerkárií, které jsou přichycené na vodních rostlinách. Metacerkárie putuje přes stěnu střeva do jater, kde se živí parenchymálními buňkami, což způsobuje rozsáhlé krvácení. *Fasciola hepatica* roste pomalu a pohlavní dospělosti dosahuje po 2 měsících ve žlučových cestách (Hurtrez-boussès et al. 2001). Z paleoparazitologických nálezů je zřejmé, že *F. hepatica* se u lidí vyskytovala již během mladší doby kamenné (neolit), kdy se hlavním zdrojem obživy stalo zemědělství. Záznamy pocházejí z Francie (Clairvaux, 3600 př. n. l.) a Švýcarska (Arbon) (Dommelier-Espejo 2001). Vajíčka byla také nalezena v sedimentech a koproliitech inkrustovaných solí v Hallstátských solných dolech (Aspöck et al. 1974, Horne et al. 1977). Z období středověku byla prokázána přítomnost této motolice ve Francii (Paříž, 14. – 15. století). Zdrojem nákazy byly pravděpodobně zeleninové saláty

připravované např. ze smetánky lékařské (*Taraxacum officinale*), medvědího česneku (*Allium ursinum*) nebo řerichy (*Nasturtium officinale*) (Bouchet 1995a).



Obr. 1: Vajíčko *Fasciola hepatica* nalezené ve vzorku půdy pod pánevní oblastí 4500 let staré kostry pocházející z archeologického naleziště Saale-Unstrut v Německu (Dittmar et al. 2003).

1.1.1.2 ČELEĎ SCHISTOSOMATIDAE

Na rozdíl od jiných motolic jsou schistosomy odděleného pohlaví. Dospělci mají válcovité tělo, dlouhé 7 – 20 mm. Tělo samečků obsahuje rýhu, neboli canalis gynecophorus, ve kterém je při kopulaci uložena samička. Mezihostitelem je vodní plž produkující furkocerkárie (cerkárie s rozeklaným ocáskem), které se zavrtávají do kůže definitivního hostitele – člověka. Samička klade velké množství vajíček s typickým trnem, díky kterému pronikají přes stěny kapilár až do střeva, nebo močového měchýře (McManus et al. 2008).

Schistosoma haematobium (Bilharz, 1852)

Krevnička močová způsobující tzv. urogenitální schistomatózu se vyskytuje především na území afrického kontinentu. Mezihostitelem je vodní plž rodu *Bulinus* (okružákovití) (McManus et al. 2008).

Vajíčka *S. haematobium* byla jako první, která se našla v archeologickém materiálu (Ruffer 1910). Zdá se, že se schistomatóza rozšířila z Východní Afriky postupně do ostatních částí světa. Nález vajíček ve Francii, v období mezi 15. a 16. stoletím, jež nebyla typickou

oblastí výskytu *S. haematobium*, lze vysvětlit tak, že si Evropané přivezli infekci z cest po Africe. Rozšíření onemocnění ve Francii lze ale pravděpodobněji přisuzovat přítomnosti afrických otroků, kteří často sloužili ve vlivných rodinách (Bouchet et al. 2002).

Schistosoma mansoni Sambon, 1907

Krevnička střevní způsobuje střevní schistomatózu a parazituje v subsaharské Africe, části Středního východu, Brazílii, Venezuele a na některých ostrovech Indie. Mezihostitelem je vodní plž rodu *Biomphalaria* (Berriman et al. 2009).

Nález vajíček *S. mansoni* v latríně ve Francii (15. -16. století) se shoduje s nálezem vajíček *S. haematobium*. Předpokládá se, že obě schistosomy pocházejí původně z Afriky, a proto lze i tento nález přisuzovat importu právě z afrického kontinentu (Bouchet et al. 2002).



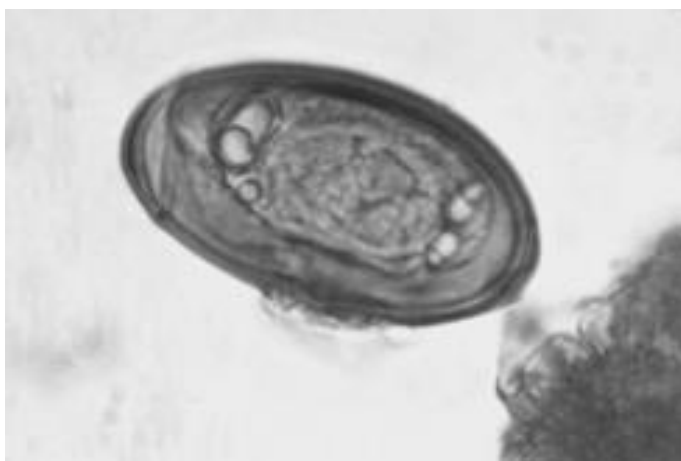
Obr. 2: Vajíčko *Schistosoma mansoni* pocházející ze středověkého naleziště Montbéliard, Francie (Bouchet et al. 2002).

1.1.1.3 ČELEĎ DICROCOELIIDAE

Dicrocoelium dendriticum (Rudolphi, 1819)

Dicrocoelium dendriticum je parazit rozšířený po celém světě způsobující dikroceliózu. Definitivním hostitelem jsou především přežvýkavci. Životní cyklus zahrnuje dva meziphostitele a to suchozemského plže např. rodu *Zebrina*, nebo *Helicella* a mravence rodu *Formica*. U infikovaných mravenců dochází v důsledku napadení nervové tkáně ke změně chování. Konečný hostitel spase nakaženého mravence a metacerkárie se přesouvají do žlučovodu přežvýkavce, kde dospívají. Migrace je rychlá a k infiltraci jater dochází během několika hodin. U člověka se může vyskytovat pseudoparazitismus po požití nedostatečně tepelně upravených jater nakaženého přežvýkavce. V tomto případě se vajíčka *D. dendriticum* požitá s potravou nacházejí ve stolici. Pravá infekce se vyskytuje jen vzácně a to po požití meziphostitele- mravence (Schweiger et al. 2008, Samuel et al. 2001).

Vajíčka *Dicrocoelium dendriticum* z archeologického materiálu jsou dobře rozpoznatelná od ostatních druhů a nálezy jsou datovány do pleistocénu (starší čtvrthory). Je logické, že frekvence výskytu vajíček v období neolitu byla závislá na výskytu ovcí a koz (Le Bailly et al. 2010). Nález vajíček ve středověku potvrdila mnohá archeologická naleziště ve Francii (Paříž, 14. – 15. století) (Bouchet et al. 1995b).



Obr. 3: Vajíčko *Dicrocoelium* sp. pocházející z archeologického naleziště Chalain (3200 – 2900 př. n. l.) (Bouchet et al. 1996).

1.1.2 CESTODA

Třída Cestoda (tasemnice) patří do kmene Platyhelminthes. Tasemnice parazitují u obratlovců. Dospělí jedinci jsou tvořeni scolexem opatřeným háčky (rostelum) a samotným tělem (strobila), sestaveným z jednotlivých článků (proglotidy). Zástupci této třídy jsou až na výjimky hermafrodité. Ploché články slouží k reprodukci – v každém článku je samčí i samičí reprodukční soustava. Tasemnice mohou být složeny buď z jednoho článku (*Notolytocestus*) nebo z více článků (*Taenia*). Tělo může dosahovat délky až několika metrů. K životu nepotřebují kyslík, jsou to anaerobní parazité. Vývojový cyklus zahrnuje většinou dva hostitele. Vajíčka opouštějí definitivního hostitele stolicí (Volf et al. 2007).

1.1.2.1 ČELEĎ TAENIIDAE

Taenia solium Linné, 1758

Scolex tasemnice dlouhočlenné je opatřen čtyřmi přísavkami a dvojitou korunou háčků. Tělo dosahuje délky 2 – 4 m a skládá se z několika set článků. Mezihostitelem je prase domácí nebo prase divoké. Definitivním hostitelem se stává člověk, ale taktéž může být i mezihostitelem, pokud se larvy vyskytují v orgánech. Člověk se nakazí pozřením nedostatečně tepelně upraveného masa. Dospělý jedinec se prostřednictvím háčků váže na sliznici tenkého střeva. V samotném místě přichycení se objevuje jen mírný zánět, bez výrazného poškození sliznice (García et al. 2003).

Taenia saginata Goeze, 1782

Scolex tasemnice bezbranné není oproti *T. solium* opatřen háčky. Dalším znakem pro rozlišení těchto dvou druhů je větší rozvětvení dělohy (12-32 větví). Vajíčka nejsou morfologicky rozlišitelná od *T. solium*. Mezihostitelem je skot a definitivní hostitel člověk se nakazí pozřením nedostatečně tepelně zpracovaného masa obsahující boubel (larvocysta) (García et al. 2003).

Nejstarší nález vajíček čeledi *Taenia* je z období neolitu. Pocházejí z archeologického naleziště Chalain (Francie) a datují se do období 3200-2900 let př. n. l.

(Dommelier et al. 1998). Vajíčka byla nalezena i v solných dolech (Hallstat) a předpokládá se, že pocházejí z konce období neolitu (Aspöck 1973). V tenkém střevě egyptské mumie (1198-1150 př. n. l.) byla objevena pomocí rastrovací elektronové mikroskopie dobře zachovaná vajíčka *Taenia* sp. (Horne et al. 1977). Dalším paleoparazitologicky významným nalezištěm je Francie. V archeologických „pozůstatcích“ pocházejících z bohatých domů, dříve patřících šlechtě, se běžně vyskytují vajíčka tasemnic. V této době bylo běžné, že šlechta konzumovala maso téměř syrové. V lokalitách mimo Francii se vajíčka *Taenia* sp. našla jen zřídka. Lze zmínit jen několik nálezů v Německu z latríny pocházející ze středověku (Bouchet et al. 2003b, Reinhard et al. 1986).



Obr. 4: Vajíčko *Taenia* sp. nalezené v nádobě obsahující odpadní materiál použitý při mumifikačním procesu (715-656 př. n. l., Egypt) (Harter et al. 2003).

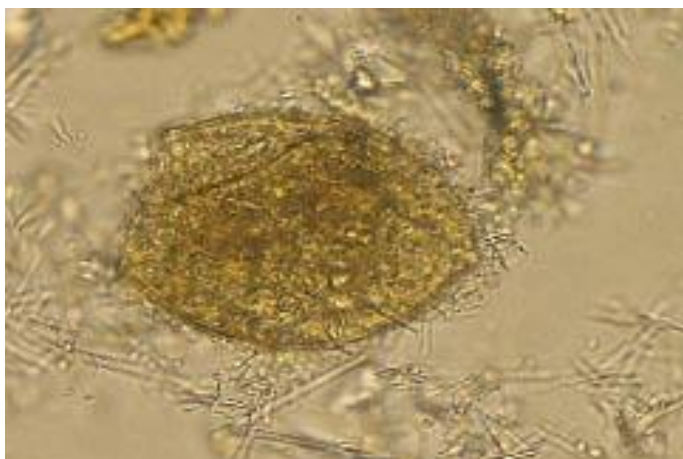
1.1.2.2 ČELEĎ DIPHYLLOBOTHRIIDAE

Diphyllobothrium latum (Linné, 1758)

Škulovec široký patří mezi největší parazity člověka a dorůstá délky 2 – 15 m. Vyskytuje se převážně na severu Evropy, v alpské oblasti a v Severní Americe. Životní cyklus zahrnuje dva meziphostitele a definitivního hostitele. Prvním meziphostitelem je buchanka čeledi Cyclopidae a Diaptomidae. V buchance se rozvíjí stádium procercooid. Druhý meziphostitel ryba pozře buchanku a vzniká plerocerkoid, který se usídí ve svalovině. Člověk se stává definitivním hostitelem po pozření syrového rybího masa. Rychlost růstu tasemnice

ve střevě je vysoká (až 22 cm/ den). *Diphyllobothrium latum* se může dožít i více než 20 let (Scholz et al. 2009).

Nejstarší nález vajíček *Diphyllobothrium* sp. pochází z neolitu a to z oblasti Hornstaad-Hörnle v Německu (Le Bailly et al. 2005). Mezi další významné lokality z období neolitu patří oblast Chalain (Francie) (Bouchet et al. 1995b) a mokřady ve Švýcarsku (Arbon a Concise) (Dommelier 2001). Z období středověku se dochovala vajíčka v archeologických nalezištích v Německu (Hameln, Freiburg, Schleswig, Regensburg) (Herrmann 1985). Paraziti byli nalezeni jen v latrínách vlivných rodin. Archeologické nálezy poukazují na nedostatečnou tepelnou úpravu ryb. Nasolení ryb nezahubí larvu tasemnice usídlenou ve svalovině (Bouchet et al. 2003b; Goncalves et al. 2003).



Obr. 5: Vajíčko *Diphyllobothrium* sp. identifikované v archeologickém materiálu z období středověku a raného novověku v ulici Hradební, Chrudim (Bartošová et al. 2011).

1.1.3 NEMATODA

Hlístice je jednou z nejpočetnějších skupin živočichů. Dospělci parazitují především v obratlovcích, ale výjimkou nejsou ani bezobratlí nebo rostliny. Některé skupiny hlístic mohou žít i volně. Tělo je protáhlé, kryté kutikulou a průřez je kruhovitého tvaru. Typické jsou kutikulární zuby, které napomáhají v narušení tkáně hostitele. U některých druhů se objevuje pohlavní dimorfismus, kdy je samička větší než sameček. Většina hlístic jsou gonochoristé a produkují velké množství odolných vajíček. Ke svému vývoji musí projít čtyřmi larválními stádii (Volf et al. 2007).

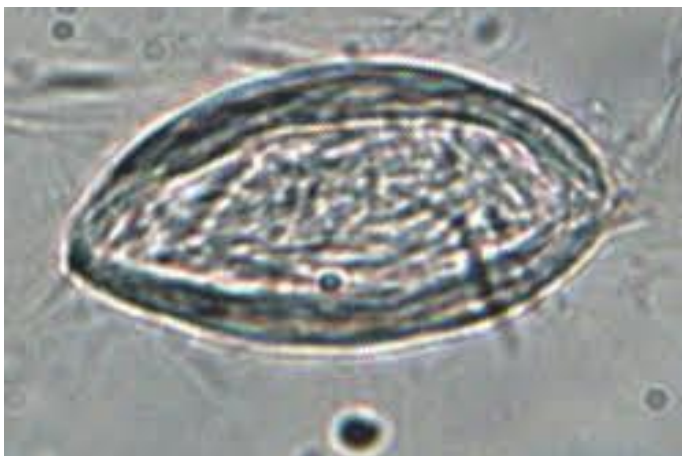
1.1.3.1. ČELEĎ OXYURIDAE

Enterobius vermicularis (Linné, 1758)

Roup dětský způsobuje onemocnění zvané enterobióza. Infekce je nejčastější u dětí ve věku 5-10 let. Životní cyklus probíhá v lumen gastrointestinálního traktu. Dospělá samička, která dosahuje větší velikosti než sameček, vylézá zejména v noci z análního otvoru, aby nakladla velké množství vajíček. Tento děj je doprovázen typickým svěděním. Vajíčka jsou bezbarvá, velmi lehká a snadno přilnou k jakémukoliv materiálu. Při naklazení jsou vajíčka nezralá, k vývoji je zapotřebí vzdušný kyslík a tělesná teplota. Hostitel se nakazí požitím infekčních vajíček. Tento cyklus trvá dva až čtyři týdny (Cook 1994).

Infekce způsobená *E. vermicularis* byla prokázána v paleoparazitologických vzorcích lidských koproliťů starých 10 tisíc let pocházejících z Utahu (USA). Tento nález naznačuje, že roup dětský je jedním z nejstarších parazitů u lidí (Fry et al. 1969). Předpokládá se, že parazitický vztah mezi člověkem a *E. vermicularis* vznikl v době prehomínidů v Africe a postupně se rozšířil na další kontinenty (Ferreira et al. 1997). Nález vajíček byl zaznamenán také ve starověkých koproliťech z Chile (Caserones) (Araujo et al. 1985) a Peru (Huarney) (Patrucco et al. 1983). Nálezy ze Starého světa jsou poměrně vzácné. Lze zmínit přítomnost vajíček v římské latríně (Hermann 1985) a také nález *E. vermicularis* v egyptské mumii (Horne et al. 1977). Velmi zajímavý je pak nález vajíček u mumie z dynastie Čoson v archeologickém nalezišti v Koreji. Jde o první důkaz tohoto parazita ve východoasijských zemích (Iniguez et al. 2008, Shin et al. 2011).

Mikroskopická analýza je užitečná jen v případě, pokud jsou vzorky v dobrém stavu. Vzhledem k tenké skořápce vajíčka tohoto helminta je zapotřebí využívat také molekulárních technik (primery pro 5S oblast rRNA), aby nedošlo k podcenění původního výskytu (Iniguez et al. 2008).



Obr. 6: Vajíčko *Enterobius vermicularis* nalezené v koproliitech mumie pohřbené v 17. století v Koreji (Shin et al. 2011).

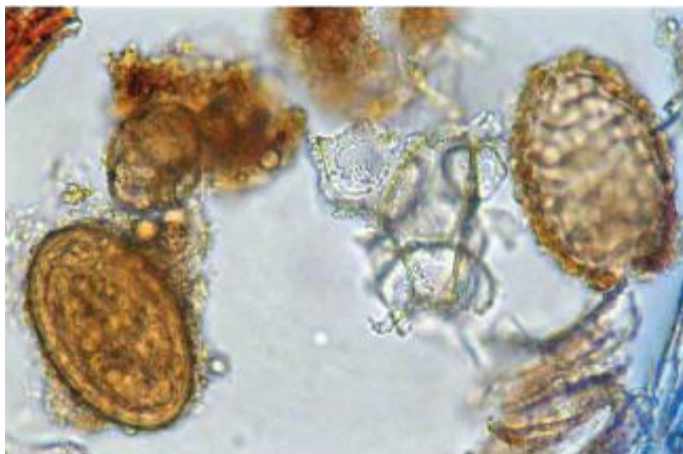
1.1.3.2 ČELEĎ ASCARIDIDAE

Ascaris lumbricoides Linné, 1758

Výskyt tohoto nejrozšířenějšího lidského parazita je především v Africe, Asii a Americe. Škrkavka dětská způsobuje onemocnění tzv. askariózu, která se přenáší požitím vajíček této hlístice. Larvy poté pronikají skrze tenké střevo a migrují do srdce a plic, kde dráždí ke kašli. Společně s hlenem jsou následně spolknuty a červi se vrací zpět do střeva, kde pohlavně dospívají. Dospělci dosahují délky 20 – 30 cm. Během migrační fáze může docházet k zánětlivým procesům v plicích. Mezi další komplikace řadíme obstrukci střev, malabsorpci atd. (Scott 2008).

Z paleoparazitologických studií vyplývá, že *A. lumbricoides* je jedním z nejběžnějších parazitů nalezených v archeologickém materiálu (Bouchet et al. 2003c; Goncalves et al. 2003). Nejstarší záznamy o zachování vajíček pochází z doby železné (800 – 350 př. n. l.) ze solných dolů v Hallstattu (Rakousko) (Aspöck et al. 1974). Vajíčka se dochovala i v pruských mumiích (600 př. n. l.) (Szidat 1944). Taktéž se vajíčka objevila v egyptských mumiích z Ptolemaiovské doby (170 př. n. l.) (Cockburn et al. 1975). Z období pleistocénu se dochovala vajíčka v jeskyni v lokalitě Arcy-sur-Cure (Francie), která byla obývána jak lidmi, tak medvědy (Bouchet et al. 1996). Od roku 2012 je považován *A. lumbricoides* a *A. suum* za tentýž druh, přičemž *A. suum* je synonymem pro

A. lumbricoides (Leles et al. 2012). Toto tvrzení podporuje fakt, že mtDNA se liší o pouhých 1,9 % (Liu et al. 2012).



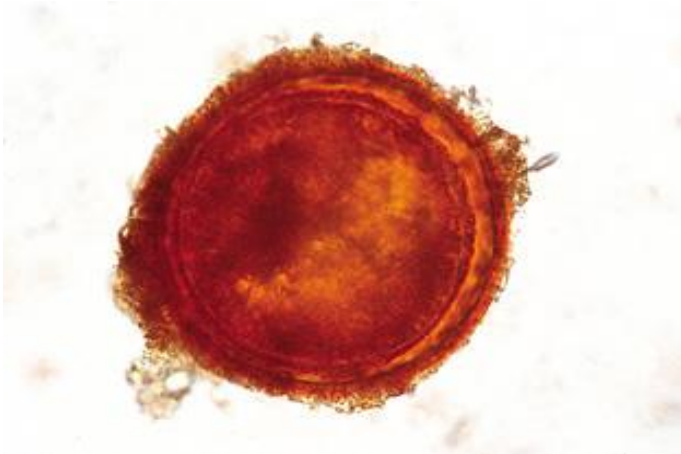
Obr. 7: Vajíčka *Ascaris* sp. nalezené v latríně archeologického místa Walraversijde, Belgie. Nález je datován do 16. století (Leles et al. 2012).

1.1.3.3 ČELEĎ TOXOCARIDAE

Toxocara canis (Werner, 1782), *Toxocara cati* (Schrank 1788)

Škrkavka psí a kočičí je rozšířena po celém světě. Definitivním hostitelem jsou psovitě a kočkovitě šelmy, u nichž škrkavky pohlavně dospívají a následně se množí. Vajíčka se dostávají do vnějšího prostředí trusem a ve vhodných podmínkách se v nich vyvinou infekční larvy. Hostitel se nakazí požitím infekčních vajíček. Klinickým termínem používaným pro infekci v lidském hostiteli je larvální toxokaróza (larva migrans). Larvy v těle člověka migrují do různých tkání, kde vyvolávají zánět a vznik granulomů (Despommier 2003).

Na archeologickém nalezišti ve Francii (Menez-Dregan) starém 300 – 500 tisíc let byla nalezena zachovalá vajíčka helminta, který morfologicky a morfometricky odpovídá vajíčkům *T. canis*. Zdá se, že vlhkost v nejhlubších vrstvách zapříčinila velmi dobré zachování vajíček parazita (Bouchet et al. 2003c). Je zajímavé, že naleziště Menez-Dregan vykazuje odlišné ekologické aspekty od běžných míst nálezů vajíček *T. canis*. Zpravidla jde o suché horské oblasti a jako příklad lze uvést Fontana Acetosa a Costa San Giacomo v Itálii (Ferreira et al. 1993).



Obr. 8: Vajíčko *Toxocara canis* pocházející z archeologického naleziště Menez-Dregan (Bouchet et al. 2003c).

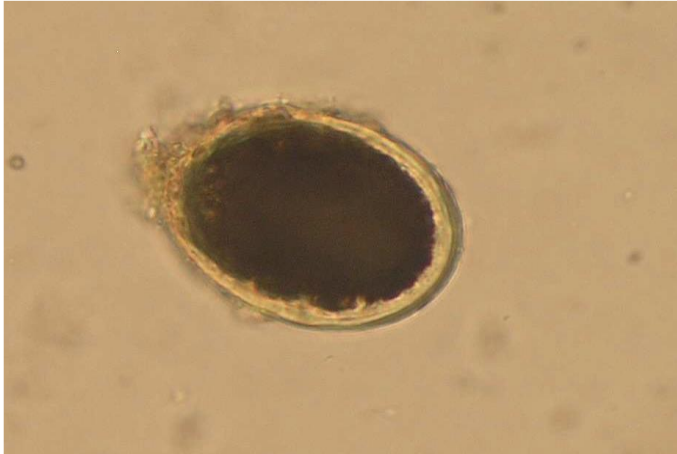
1.1.3.4 ČELEĎ ANCYLOSTOMATIDAE

Ancylostoma duodenale (Dubini, 1843)

Onemocnění, které způsobuje měchovec lidský, se nazývá ankylostomóza. Dospělí jedinci mají velkou ústní kapsulu se dvěma páry chitinových zubů. Pohyblivé larvy pronikají do těla hostitele přes kůži, nebo orálně. Larvy cestují přes plicní kapiláry do plic, kde jsou vykašlávány a následně spolknuty. Posléze se dostávají do tenkého střeva, kde se vyvíjí dospělý červ. Celý cyklus trvá 5 – 9 týdnů. Dospělá samice klade tisíce vajíček denně, a výkaly se dostávají zpět do vnějšího prostředí. Vajíčka jsou morfologicky podobná vajíčkům hlístice *Necator americanus* (Hawdon et al. 1996).

Ancylostoma duodenale byla prokázána např. v koproliitech pocházejících ze státu Durango v Mexiku (1400 př. n. l.) (Jiménez et al. 2012).

Zajímavým, ale tragickým případem se stala roku 1880 epidemie ankylostomózy u horníků, kteří stavěli Gotthardský železniční tunel ve Švýcarsku. Zejména doly a cihelny se klimaticky velmi přibližují přirozenému prostředí výskytu tohoto helminta. Mnoho dělníků zemřelo na následky infekce a během pitvy se potvrdila nákaza *A. duodenale* (Peduzzi et al. 1983).



Obr. 9: Vajíčko *Ancylostoma duodenale* nalezené v odpadní jámě z období středověku a raného novověku. Vzorky pocházely z ulice Hradební, Chrudim (Bartošová et al. 2011).

1.1.3.5. ČELEĎ TRICHURIDAE

Trichuris trichiura (Linné, 1771)

Tenkohlavec lidský je jedním z nejrozšířenějších lidských parazitů. Onemocnění, které způsobuje, se nazývá trichurióza. Dospělci obývají střevní trakt a produkují vajíčka, která jsou vylučována do vnějšího prostředí. Vajíčka mají typický citrónový tvar a na obou pólech jsou opatřena zátkami. V oplozených vajíčkách se postupně vyvíjí larva. Definitivní hostitel se nakazí potravou kontaminovanou vajíčky. V tenkém střevě larvy opouští vajíčko a migrují do slepého nebo tlustého střeva, kde samička klade velké množství vajíček (Bradley et al. 2004).

Mezi nejstarší nálezy *T. trichiura* patří nález vajíček ve známé zamrzlé Ótziho mumii (3200 př. n. l.) (Aspöck et al. 1996). V neolitických mokřadních vesnicích v západní Evropě se také dochovala vajíčka tohoto parazita (Bouchet et al. 1995). Nálezy vajíček ze středověku jsou opravdu bohaté, lze zmínit Německo (Lübeck, Schleswig, Berlín, Hameln) (Hermann 1985) nebo Norsko (Oslo) (Schia 1979). Vajíčka *T. trichiura* se velmi často v archeologických nalezištích vyskytují společně s vajíčky *A. lumbricoides*. Výskyt těchto dvou parazitů lze přisuzovat např. k podobným podmínkám, které potřebují pro svůj vývoj (Bouchet et al. 2003b, Gonçalves et al. 2003).



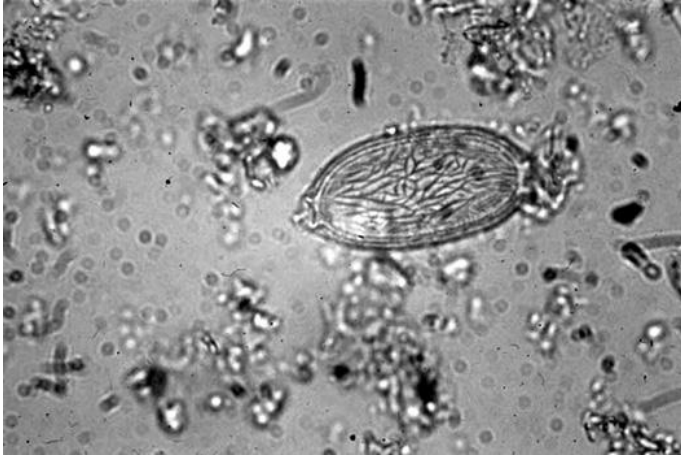
Obr. 10: Vajíčka *Trichuris trichiura* identifikované v odpadní jámě z období středověku a raného novověku v ulici Hradební, Chrudim (Bartošová et al. 2011).

1.1.3.6. ČELEĎ CAPILLARIDAE

Calodium hepaticum (Bancroft, 1893) Moravec, 1982 a další hlístice čeledi Capillariidae

Calodium hepaticum je hlístice rozšířená prakticky po celém světě. Tato hlístice parazituje především u hlodavců, ale i jiných savců včetně člověka. Dospělá samice klade v jaterním parenchymu vajíčka, která vyvolávají tvorbu granulomů. K dokončení cyklu je nezbytné, aby druhý hostitel (masožravec či mrchožrout) pozřel infikovaného hlodavce. Vajíčka projdou trávicím traktem a jsou zpět vyloučena do vnějšího prostředí, kde se stávají infekčními. Pozření infekčních vajíček vyvolá u definitivního hostitele infekci. U člověka bylo popsáno jen několik případů nákazy *C. hepaticum* (Klenzak et al. 2005, Nabi et al. 2007).

Mezi významné nálezy vajíček *Capillaria* sp. lze zařadit nález v lidských koprolitech neolitických obyvatel oblasti Chalain (Francie) (Bouchet 1997). Roku 2014 byl publikován objev lidské jaterní kapilárie v hrobě adolescenta datovaného do 3. – 4. století (Amiens, Francie). Přítomnost *C. hepatica* lze vysvětlit nízkou úrovní hygieny v tomto období (Mowlavi et al. 2014). Při interpretaci výsledků je důležité brát na zřetel možnou morfologickou podobnost s vajíčky *Trichuris* sp. (Bouchet et al. 2003b, Mowlavi et al. 2014).



Obr. 11: Vajíčko *Capillaria* sp. nalezené ve vzorku půdy pod pánevni oblastí 4500 let staré kostry pocházející z archeologického naleziště Saale-Unstrut v Německu (Dittmar et al. 2003).

1.1.4 STŘEVNÍ PROTISTA

Střevní jednobuněční paraziti zpravidla parazitují v lumen tenkého střeva, nebo uvnitř buněk střevního epitelu hostitele. Infekční fázi představují cysty nebo oocysty a do vnějšího prostředí jsou vylučovány výkaly hostitele. I přesto, že jsou parazitictí prvoci celosvětově rozšířeni, paleoparazitologických nálezů protozoálních infekcí není mnoho. Možné vysvětlení je, že cysty se rychle rozkládají a je velmi obtížné je zachytit mikroskopicky (Bouchet et al. 2003b, Gonçalves et al. 2003).

Tradiční způsob pro identifikaci jednobuněčných parazitů je mikroskopie, ale mezi často užívané techniky k detekci protozoí se řadí imunofluorescence a ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), nebo metody izolace parazitární DNA z archeologického materiálu (Frías et al. 2013).

1.1.4.1 MIKROSPORIDIE

Zástupci tohoto kmene způsobují širokou škálu infekcí. Mezi mikrosporidie řadíme např. *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis*. Tito paraziti napadají střevní epitelové buňky. Infekce se ale může šířit i do jiných orgánů jako jsou játra, slinivka, plíce nebo ledviny. Přenos infekce je možný pomocí velmi odolných spor, které jsou obklopeny glykoproteinovou vnější vrstvou a vnitřní chitinovou vrstvou. Infekci hostitelské buňky

usnadňuje tzv. polární trubice. Tato struktura je jedinečná právě pro mikrosporidie (Dowd a Gerba 1998, Didier a Weiss 2006).

Z paleoparazitologických nálezů lze zmínit průkaz tzv. „ancient“ DNA (aDNA) *Encephalitozoon intestinalis* na Novém městě v Praze. Vzorke pocházely z 18. – 19. století (Myšková et al. 2014).

1.1.4.2 KRYPTOSPORIDIE

Původcem kryptosporidiózy je např. *Cryptosporidium parvum* nebo *Cryptosporidium hominis*. Nákaza je způsobená požitím oocyst. Oocysty jsou značně odolné vůči chloraci a zdrojem infekce je často kontaminovaná pitná voda nebo potrava. *Cryptosporidium parvum* napadá střevní trakt. U jedinců s oslabenou imunitou se infekce může šířit do jater, slinivky břišní, a dýchacího ústrojí (Cox 2002).

Z archeologických nálezů *C. parvum* lze jmenovat nález oocyst v peruánských mumiích (24. stol. před n. l.). Pomocí metod IFA a ELISA byla tato kryptosporidie identifikována také v koproliitech pocházejících z před-kolumbovské doby (11. stol.) (Ortega et al. 2003).

1.1.4.3 DIPLOMONADEA

Giardióza je onemocnění způsobené prvokem *Giardia intestinalis*, který parazituje nejen u zvířat ale i u člověka. Infekce se přenáší jídlem nebo vodou kontaminovanou cystami. Vejčité cysty se vyznačují silnou extracelulární matrix. V žaludku se z cyst uvolňují trofozoity, které obývají lumen horního střeva, kde se binárně dělí. Mezi typické znaky patří přísavný disk umístěný na spodní straně těla. Příznaky akutní giardiózy se vyznačují bolestí břicha, páchnoucím vodnatým průjmem a zvracením (Hehl et al. 2004, Reynoso-Robles et al. 2015).

Nejčastěji používanými metodami pro rozpoznání prvoka *G. intestinalis* je imunofluorescence a ELISA test. Faulkner a kolektiv (1989) detekoval cysty v lidských koproliitech datovaných do cca 2100 př. n. l. Infekce *G. intestinalis* byla zaznamenána také u peruánské mumie (24. stol. př. n. l.) (Ortega et al. 2003). Další nález pochází ze středověké

obce Chevenez (Švýcarsko) ze 7. – 9. století n. l. I v tomto případě bylo využito ELISA testu (Le Bailly 2005b). Většina nálezů se datuje do Nového Světa, ale jen málo studií pochází z archeologických nalezišť Starého Světa (Le Bailly et al. 2008).

1.1.4.4 ENTAMOEBIIDAE

Améboza je infekce gastrointestinálního traktu způsobená parazitickým prvokem *Entamoeba histolytica*, který napadá střevní sliznici, ale je schopný šířit se i do jiných orgánů, především jater. Morfologicky podobným prvokem je *Entamoeba dispar*, který také kolonizuje lidské střevo. Pohyblivou formou *E. histolytica* je trofozoit žijící v lumen tlustého střeva, kde se množí a mění se na cysty – infekční stadium. Cysty jsou vylučovány hostitelem do vnějšího prostředí (Espinosa-Cantellano et al. 2000).

Vzhledem k tomu, že pomocí mikroskopie nelze rozlišit *E. histolytica* a *E. dispar*, je vhodnější pro detekci archeologického materiálu využít PCR (polymerázová řetězová reakce) a ELISA test (Gonin et al. 2003).

Paleoparazitologické nálezy cyst zmíněných améb jsou velmi vzácné. Ze Starého světa lze jmenovat pozitivní vzorky z jímek pocházejících z francouzské vily (La Gramiere) (Gonçalves et al. 2003). Další nález byl zjištěn ve středověkých latrínách v Belgii (Gonçalves et al. 2003). Z před-kolumbovské doby pocházejí pozitivní vzorky z Chile a to konkrétně z oblastí Atacamenha, Cabuza, Tihuanaco (Fouant et al. 1982).

1.2. PARAZITI VE TKÁNÍCH

1.2.1. HAEMATOOZOEIA

Zástupci rodu *Plasmodium* patřící mezi výtrusovce (Apicomplexa) způsobují onemocnění známé jako malárie. Jedná se o jedno z nejvýznamnějších infekčních onemocnění současnosti. Přenašečem je komár rodu *Anopheles*, ve kterém probíhá pohlavní fáze vývoje parazita. Infikovaná samička komára sají na teplokrevném hostiteli a tím do jeho krevního oběhu přenáší sporozoity, které dále putují do hepatocytů, kde probíhá nepohlavní rozmnožování, tedy tvorba schizontů, obsahující merozoity. Merozoity v krevním řečišti

napadají erythrocyty, množí se a následně dochází k lýze erythrocytů, a uvolnění dalších merozoitů. Tomuto stavu se říká malarický záchvat, pro který je typický třes a horečka. *Plasmodium vivax* a *Plasmodium ovale* vyvolávají tzv. terciánu (horečka každý třetí den). Nejtěžší průběh nemoci způsobuje *Plasmodium falciparum*, horečka se vrací každých 36-48 hodin. Naopak nejmírnější formu malárie vyvolává *Plasmodium malariae*, původce čtyřdenní malárie (kvartána). *Plasmodium knowlesi* se běžně vyskytuje v Jihovýchodní Asii u opic, ale i u lidí a vykazuje podobné klinické příznaky jako *P. vivax* a *P. falciparum* (Bartoloni et al. 2012).

Paleoparazitologický průkaz *P. falciparum* u čtyř členů rodiny Medicejských pochází z 16. století z Itálie. Jejich rod byl jeden z nevlivnějších ve Florencii. Všichni členové rodiny se pravděpodobně nakazili v endemické oblasti malárie v Toskánsku. Přítomnost *P. falciparum* byla dokázána ze vzorků kostí, které byly testovány pomocí molekulárních metod (Fornaciari et al. 2010). Dále lze zmínit průkaz *P. vivax* v jihoamerických mumiích (Peru, Chile). Ze zkoumaných vzorků bylo 67% pozitivních na *P. vivax*. Zmíněný nález je datován do doby 3000 let př. n. l. - 600 př. n. l. (Allison et al. 2009).

1.2.2. KINETOPLASTEA

Leishmania sp. řadíme mezi bičíkovce a zástupci této skupiny způsobují onemocnění nazývané leishmanióza. V rozvojových zemích je častou příčinou morbidit a mortality. Životní cyklus zahrnuje dva hostitele, prvním z nich je bodavý hmyz rodu *Phlebotomus*, ve kterém probíhá jedna část cyklu, tzv. promastigot a druhým hostitelem je savec, na němž infikovaný hmyz saje. Projevy leishmaniózy jsou rozmanité a tradičně jsou rozděleny do tří hlavních klinických forem: kožní, kdy dochází k poškození kůže, mukokutánní, při níž dochází především k destrukci tkáně v oblasti obličeje a nejtěžší viscerální forma, při které parazité napadají játra a slezinu. Kožní onemocnění nejčastěji vyvolává *L. major*, *L. tropica* a *L. aethiopica*. *Leishmania braziliensis* je zodpovědná za mukokutánní formu v Latinské Americe a většinu případů viscerální leishmaniózy jsou způsobeny *L. chagasi* (Latinská Amerika), *L. infantum* (Středozeří) a *L. donovani* (Afrika, Indie, Asie) (Milon 2009, Reithinger et al. 2016).

Vzorky, které pocházely z více než devadesáti mumií (3500 - 2800 př. n. l.) byly analyzovány na přítomnost leishmanií. Analýza prokázala DNA *L. donovani*, tedy viscerální

formu (Zink et al. 2006). Leishmanie byly prokázány i u mumie šestileté chilské dívky datované do 800 let př. n. let. Tento nález potvrzuje výskyt *Leishmania* sp. v Americe ještě před příchodem Evropanů (Guillen et al. 2005).

1.3. VÝVOJ METOD V PALEOPARAZITOLOGII

Roku 1987 byl zaznamenán první popis metody používané pro výzkum vajíček parazitů z archeologického materiálu (Reinhard et al. 1988). Parazitologové zpočátku analyzovali koprolity flotačními metodami, ty jsou vhodné, pro nález lehčích vajíček parazitů. Další metodou je sedimentace, která je vhodnější pro těžší operkulovaná vajíčka. Důležitým krokem před samotnou flotací nebo sedimentací je rehydratace koprolitů, které jsou sušené a někdy i mineralizované. Pro tyto účely se začal používat roztok fosforečnanu sodného (Na_3PO_4), po jehož použití jsou dobře viditelné jak obaly vajíčka, tak např. jícen a střeva larev. Aplikace této jednoduché techniky tak umožňuje mikroskopickou diagnostiku parazitů (Samuels 1965).

Během let 1980 a 1997 byl hlavním nástrojem pro hledání parazitů světelný mikroskop. Postupně byly zavedeny i jiné techniky, včetně elektronové mikroskopie. Například transmisní elektronová mikroskopie (TEM) umožňuje zobrazení vnitřních struktur vajíček parazita. Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) je vhodná pro odlišení pylu od vajíčka parazita (Araújo et al. 1998).

Fouant et al. (1982) byl prvním, který provedl imunologickou analýzu paleoparazitologických vzorků. ELISA test se ovšem ukázal negativní na *Entamoeba histolytica*.

V průběhu posledních let se začíná využívat technik založených na průkazu DNA parazita ve vzorku. Základní metody, které se často využívá je polymerázová řetězová reakce (PCR) se specifickými primery pro dané parazity. Jde o velmi citlivou metodu, díky níž jsme schopni získat spolehlivé výsledky a to i přes značnou kontaminaci vzorku. Používá se od roku 1985 a to k amplifikaci segmentu DNA, který se nachází mezi dvěma známými oblastmi sekvence. Použití PCR k detekci ancient DNA (aDNA) k detekci parazitů bylo zásadním krokem ve vývoji paleoparazitologických analýz (Araujo et al. 1998).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu.
- 2) Koncentračními metodami vyšetřit vzorky hrobů, zasypaných studní a odpadních jímek s cílem identifikovat vajíčka helmintů parazitujících u člověka a domácích zvířat.
- 3) Pomocí molekulárních metod prokázat ve vybraných vzorcích případné protozoární DNA.
- 4) Výsledky dát do souvislosti s dostupnými informacemi o příslušných archeologických nalezištích.

3. POUŽITÝ MATERIÁL A METODY

3.1. NALEZIŠTĚ A MATERIÁL

V letech 1998 – 2000 probíhal archeologický výzkum budoucího hotelového areálu „Four Seasons Prague“ na Alšově nábřeží. Lokalita staveniště je na západním okraji Starého Města pražského. Na břehu řeky zde mezi 13. a 16. stoletím vzniklo rozlehlé smetiště odpadků. Výstavba nynějšího nábřeží, která započala roku 1868, změnila původní podobu břehu.

Od roku 1999 se výzkum soustředil především na odběr vzorků v hloubce cca 8 m. Toto antropogenní nadloží je v zásadě tvořeno jen původními odpadky ze Starého Města pražského a to v různém stupni rozkladu. Celkově byly odebrány stovky vzorků, které byly podrobeny archeobotanickému a archeozoologickému výzkumu.

Během výzkumu byly odkryty dřevěné stěny opřené o mohutné a pravidelně rozestoupené kůly. Tímto způsobem byla zajištěna úprava břehu řeky. Několik kůlů bylo objeveno i jednotlivě, ty sloužily k uvazování lodí. Dále zde byla nalezena soustava dřevěných žlabů, která se větvila podpovrchově v délce několika desítek metrů v blízkosti řeky Vltavy. Vydlabané kmeny byly uloženy ve výkopech hlubokých cca 1 m a následně byly zasypány. Takovýto nález rozvodu vody v pražských městech byl učiněn poprvé. K výrobě žlabů byly použity kmeny borovice (*Pinus sylvestris* L.). Každý žlab měl dvě části: dolní půlkmen obsahoval výdlab a byl přikryt horním půlkmenem. Obě části byly spojeny pomocí čepů a vzniklé spáry byly utěsněny mechem. Vše ukazuje na to, že v nejspodnější zkoumané vrstvě, která měla původně vodovodní funkci, proudila celkem čistá voda. Tato vrstva se zdá být nejméně znečištěná odpadem.

Archeologická část projektu proběhla pod vedením terénního archeologa Mgr. Petra Starce. Vzorky byly odebrány do plastových uzavíratelných sáčků, které byly následně popsány místem odběru. Vzorky byly primárně určeny k pylové analýze. K paleoparazitologické analýze bylo poskytnuto celkem 22 vzorků (Tab. I). Před samotným zpracováním byly vzorky uloženy v chladicí místnosti.

Tab. I: Seznam vzorků poskytnutých k paleoparazitologické analýze a jejich označení.

číslo vzorku	označení vzorku	číslo vzorku	označení vzorku
1	B3-0895-10	12	B3-2444-27
2	B3-0920-12	13	B3-2448-28
3	B3-0924-06	14	B4-0541-08
4	B3-1971-13	15	B4-0543-05
5	B3-1973-14	16	B4-1439-07
6	B3-1976-15	17	B4-1447-12
7	B3-1979-17	18	B4-1453-13
8	B3-1982-19	19	B4-1460-14
9	B3-1984-21	20	B4-1461-11
10	B3-1986-22	21	B4-2456-19
11	B3-2420-29	22	B4-2458-20



Obr. 12: Mapa části Prahy s vyznačeným místem archeologického výzkumu (Dostupné z mapy.cz: URL 1).



Obr. 13: Segment dřevěného vodovodního žlabu.



Obr. 14: Vodovodní žlab ve stratigrafickém kontextu.



Obr. 15: Alšovo náměstí, Praha. Pohled na stavební jámu.

3.2. METODY

Jednotlivé vzorky v sáčcích byly promíchány a z každého byl plastovou lžičkou odebrán přibližně 1 g do zkumavky. Každý jednotlivý vzorek byl analyzován v tripletech metodou sedimentační a flotační.

3.2.1. REHYDRATACE

V průběhu rehydratace dochází k uvolnění zeminy a tím i vajíček, které jsou pak lépe viditelné při pozorování ve světelném mikroskopu.

Do každé zkumavky s odebraným materiálem bylo přidáno 10 ml 0,5% Na_3PO_4 . Takto připravený vzorek byl promíchán a následně byl přidán 10% formaldehyd, který zabrání

nechtěnému bakteriálnímu a plísňovému růstu. Před umístěním do lednice (5 °C) byly zkumavky ještě překryty alobalem. Vzorky byly rehydratovány po dobu nejméně 72 hodin. Takto připravené rehydratované vzorky byly postupně zpracovány metodou flotační a sedimentační.

3.2.2. SEDIMENTACE AMS III

Roztok pro sedimentaci AMS III (hustota 1,08 g/ml) obsahoval:

- 660 ml destilované H₂O
- 540 ml HCl
- 115,2 g bezvodého Na₂SO₄

Roztok Tritonu obsahoval:

- 33,5 ml destilované H₂O
- 16,5 ml Triton X-100 (isooctylphenoxypolyethoxyphenol)

Pracovní postup:

- 1) Centrifugace po dobu 2 minut (2000 ot./min).
- 2) Slití supernatantu.
- 3) Smíchání sedimentu se 6 ml připraveného roztoku.
- 4) Slití přes gázu do další zkumavky.
- 5) Přidání 3 ml diethyletheru a 3 kapek Tritonu, uzavření zkumavky gumovou zátkou a protřeptání.
- 6) Centrifugace další 2 minuty (2000 ot./min.).
- 7) Opatrné slití supernatantu.
- 8) Přenesení plastovou pipetou 2 kapek sedimentu na podložní sklíčko a přiklopení sklíčkem krycím o rozměrech 24x40x0,13 mm.

3.2.3. FLOTACE DLE KOZÁKA A MÁGROVÉ (KOMA)

Roztok KOMA sestával z dílu roztoku A, dílu roztoku B a glycerolu.

Roztok A obsahoval:

- 1000 ml destilované H₂O
- 560 g ZNSO₄

Roztok B obsahoval:

- 1000 ml destilované H₂O
- 920 g MgSO₄

Pracovní postup:

- 1) Rozmíchání vzorku a následné slítí přes gázu do další zkumavky.
- 2) Centrifugace po dobu 3 minut (2000 ot./min).
- 3) Slítí supernatantu.
- 4) Rozmíchání sedimentu v malém množství roztoku KOMA.
- 5) Dolití zkumavky roztokem KOMA přibližně půl centimetru pod okraj (nezátkovat)
- 6) Centrifugace po dobu 3 minut (2000 ot./min).
- 7) Přenesení povrchové blanky mikrobiologickou kličkou na podložní sklíčko a překrytí sklíčkem krycím o rozměrech 24x40x0,13 mm.

3.2.4. MIKROSKOPIE

K mikroskopické analýze jednotlivých vzorků byl použit mikroskop Olympus BX51. Všechny vzorky byly prohlíženy pod zvětšením 200x a fotografická dokumentace proběhla pod zvětšením 200x a 400x. Vlastní morfologické určení vajíček parazitů a stanovení jejich velikosti bylo provedeno v programu Quick Photo 3.1.

3.2.5. IZOLACE DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí kitu PSP Stool Kit (Invitak). Izolace DNA z každého vzorku byla prováděna v duplikátech.

Pracovní postup:

- 1) Navážení 200 – 400 mg čerstvého popřípadě zmraženého vzorku do zkumavky Ependorf.
- 2) Přidání skleněných a zirkonových kuliček a následné doplnění 0,8 – 1,2 ml Lysis Buffer P, vortexování 1 minutu a rozbíjení vzorku homogenizátorem FastPrep další 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- 3) Inkubace (95 °C) v termobloku po dobu 10 minut, protřepávání během inkubace.
- 4) Centrifugace po dobu 1 minuty (11000 otáček/min.).
- 5) Přenesení supernatantu do InviAdsorb-Tube, vortexování po dobu 15 sekund a inkubace 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugace po dobu 3 minut (14000 otáček/min.).
- 6) Přepipetování supernatantu do čistých zkumavek Ependorf, centrifugace po dobu 3 minut (14000 otáček/min.).
- 7) Přepipetování do čistých Ependorf zkumavek 25 µl Proteinase K a 400 µl supernatantu, krátké vortexování.
- 8) Inkubace po dobu 10 minut (70 °C), protřepávání během inkubace.
- 9) Přidání 200 µl Binding Buffer P, vortexování.
- 10) Přenesení veškerého objemu do Spin Filter + Tube, inkubace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a centrifugace další 1 minutu (11000 otáček/min.).
- 11) Vylití odpadu ze zkumavek Ependorf a následné přidání 500 µl Wash Buffer I, centrifugace po dobu 1 minuty (11000 otáček/min.).
- 12) Vylití odpadu ze zkumavek Ependorf a následné přidání 700 µl Wash Buffer II, centrifugace po dobu 1 minuty (11000 otáček/min.).
- 13) Vylití odpadu a centrifugace po dobu 4 minut (11000 otáček/min.).
- 14) Přidání čisté mikrozkušavky Ependorf na kolonku, napipetování 200 µl Elution Buffer D nebo 200 µl deionizované vody temperované na 70 °C, inkubace po dobu 3 minut při laboratorní teplotě a centrifugace 1 minutu (11000 otáček/min.).
- 15) Uskladnění vzorků v mrazáku pro následné použití v PCR.

3.2.6. NESTED PCR

Cílem polymerázové řetězové reakce (PCR) bylo prokázat přítomnost aDNA parazitů *Trichuris trichiura*, *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi* extrahované ze vzorků a to za pomoci speciálně navržených primerů.

1) Průkaz aDNA *Trichuris trichiura*.

Nasedání primerů probíhalo při 52 °C. Bylo provedeno 34 cyklů. Objem reakční směsi se skládal z 20 µl Master Mix a 5 µl vyizolované DNA ze vzorku.

Tab. II: Směs Master Mix pro PCR.

	1x [µl]	8x [µl]
H₂O	13,87	110,96
MgCl₂ (25 mM)	1,50	12,00
10x buffer	2,50	20,00
dNTP (10 mM)	0,50	4,00
Primer forward (10 µM)	0,50	4,00
Primer reverse (10 µM)	0,50	4,00
Tag polymeráza (1U/1µl)	0,63	5,04

Tab. III: Průběh PCR.

Denaturace	94 °C
Denaturace	94 °C
Annealing	52 °C
Prolongace	72 °C
Finální prolongace	72 °C
Chlazení	12 °C

Primery použité pro reakci (5' → 3'):

Forward - CTCGTAGTTGGATTGCGGATGT

Reverse - TCCATGCACCACGGTTCAAGC

2) Průkaz aDNA *Enterocytozoon bieneusi*

Nasedání primerů probíhalo při 57 °C (primární PCR) a při 55 °C (sekundární PCR). V každé reakci bylo provedeno 34 cyklů. Objem reakční směsi se skládal z 22 µl Master Mix a 3 µl vyzolované DNA ze vzorku.

Tab. IV: Směs Master Mix pro primární PCR.

	1x [µl]	8x [µl]
H₂O	15,87	126,96
MgCl₂ (25 mM)	1,50	12,00
10x buffer	2,50	20,00
dNTP (10 mM)	0,50	4,00
Primer forward (10 µM)	0,50	4,00
Primer reverse (10 µM)	0,50	4,00
Tag polymeráza (1U/1µl)	0,63	5,04

Tab. V: Směs Master Mix pro sekundární PCR.

	1x [µl]	8x [µl]
H₂O	15,87	126,96
MgCl₂ (25 mM)	1,50	12,00
10x buffer	2,50	20,00
dNTP (10 mM)	0,50	4,00
Primer forward (10 µM)	0,50	4,00
Primer reverse (10 µM)	0,50	4,00
Tag polymeráza (1U/1µl)	0,63	5,04

Tab. VI: Průběh PCR.

Denaturace	94 °C
Denaturace	94 °C
Annealing	57/55 °C
Prolongace	72 °C
Finální prolongace	72 °C
Chlazení	12 °C

Primery použité pro primární reakci (5' → 3'):

EBITS3 - GGTCATAGGGATGAAGAG

EBITS4 - TTCGAGTTCTTTCGCGCTC

Primery použité pro sekundární reakci (5' → 3'):

EBITS1 - GCTCTGAATATCTATGGCT

EBITS2,4 - ATCGCCGACGGATCCAAGTG

3) Průkaz aDNA *Encephalitozoon intestinalis*

Nasedání primerů probíhalo pro primární i sekundární PCR při 55 °C. V každé reakci bylo provedeno 34 cyklů. Objem reakční směsi se skládal z 22 µl Master Mix a 3 µl vyizolované DNA ze vzorku.

Tab. VII: Směs Master Mix pro primární PCR.

	1x [μl]	8x [μl]
H₂O	15,87	126,96
MgCl₂ (25 mM)	1,50	12,00
10x buffer	2,50	20,00
dNTP (10 mM)	0,50	4,00
Primer forward (10 μM)	0,50	4,00
Primer reverse (10 μM)	0,50	4,00
Tag polymeráza (1U/1μl)	0,63	5,04

Tab. VIII: Směs Master Mix pro sekundární PCR.

	1x [μl]	8x [μl]
H₂O	15,87	126,96
MgCl₂ (25 mM)	1,50	12,00
10x buffer	2,50	20,00
dNTP (10 mM)	0,50	4,00
Primer forward (10 μM)	0,50	4,00
Primer reverse (10 μM)	0,50	4,00
Tag polymeráza (1U/1μl)	0,63	5,04

Primery použité pro primární reakci (5' → 3'):

INT580F - TTTCACCTCGCCGCTACTCAG

INT580R - TGCAGTTAAAATGTCCGTAGT

Primery použité pro sekundární reakci (5' → 3'):

MSP-3 - GGAATTCACACCGCCCGTCVYTAT

MSP-4A - CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGGGT

3.2.7. ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza je metoda, která separuje molekuly DNA na základě velikosti. DNA fragmenty nesou záporný náboj a putují v elektrickém poli od katody k anodě. Elektroforéza proběhla v 1% agarózovém gelu, který vznikl smícháním 0,4 g agarózy a 40 ml TAE pufru. Takto připravený roztok byl postupně zahříván až do úplného rozpuštění agarózy. Poté bylo přidáno 3 μ l ethidium bromidu, který se váže na DNA a pod UV zářením emituje světlo. Ztuhnutí gelu trvalo přibližně 30 minut a poté byl gel přendán do elektroforetické vany a překryt TAE pufrem. Do jamek bylo postupně napipetováno 4 μ l 100 bp DNA ladderu, 20 μ l každého jednotlivého vzorku a nakonec stejné množství negativní a pozitivní kontroly.

4. VÝSLEDKY

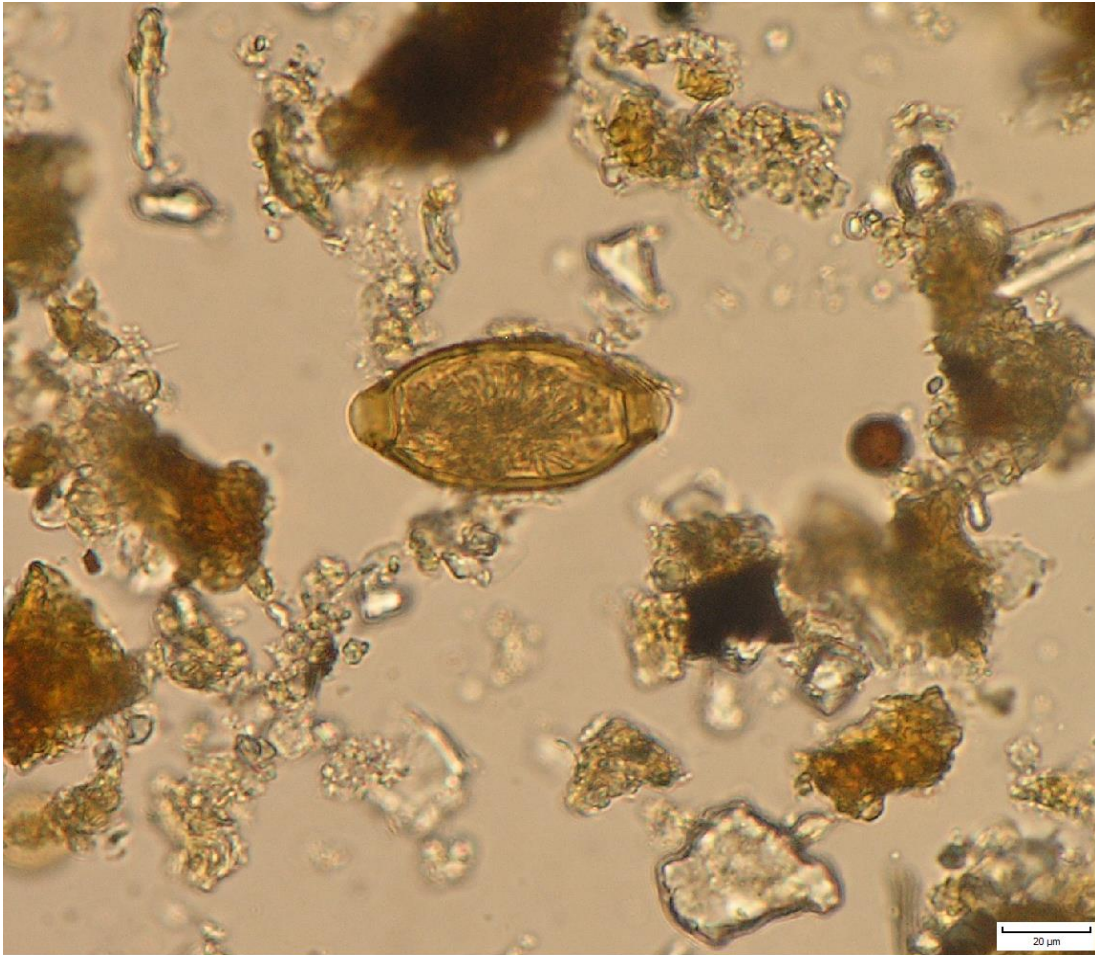
4.1. MIKROSKOPIE

Každý vzorek byl rehydratován a poté podroben sedimentační a flotační metodě. Následně byly vzorky prohlíženy pomocí mikroskopu. Vzorky, které jsem obdržela k paleoparazitologické analýze, pocházející z lokality hotelového komplexu Four Seasons Prague, byly při mikroskopické analýze pozitivní pouze na jeden druh střevního helminta. Konkrétně se jedná o nález vajíček *Trichuris* sp. Bližší určení druhu není z morfologického hlediska možné. Vajíčka tohoto velmi rozšířeného střevního parazita jsou často nalezeny v archeologickém materiálu nejen ze středověku. Úspěšnost záchytu přítomnosti parazitů ze všech vzorků je necelých 14 %, přičemž vzorek, který byl nejvíce bohatý na nález vajíček, je vzorek číslo 15. V závorce je uveden počet vajíček zachycených při mikroskopické analýze.

Tab. IX: Výsledky získané ze sedimentační a flotační metody.

číslo vzorku	sedimentace	flotace	číslo vzorku	sedimentace	flotace
1	-	-	12	-	-
2	-	-	13	-	-
3	-	-	14	-	-
4	-	-	15	<i>Trichuris</i> sp. (4)	-
5	-	-	16	-	-
6	-	-	17	-	-
7	-	-	18	-	-
8	-	-	19	<i>Trichuris</i> sp. (1)	-
9	<i>Trichuris</i> sp. (1)	-	20	-	-
10	-	-	21	-	-
11	-	-	22	-	-

4.2. FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE



Obr. 16: Vajíčko *Trichuris* sp. nalezené ve vzorku číslo 15. Velikost vajíčka je 71x36 μm. Vajíčko má typický citronový tvar a prominující zátky na pólech. Vnitřní obsah vajíčka je znatelně mineralizovaný.



Obr. 17: Fotografie vajíčka *Trichuris* sp. zachycené rovněž ve vzorku číslo 15. Velikost vajíčka je 56x30 μm. Bez znatelného vnitřního obsahu.



Obr. 18: Vajíčko *Trichuris* sp. pocházející ze vzorku číslo 9. Velikost vajíčka je 56x30 μm. Bez vnitřního obsahu.



Obr. 19: Vajíčko *Trichuris* sp. identifikované ve vzorku číslo 19. Velikost vajíčka je 56x27 μm. Vnitřní obsah není znatelný.

4.3. DETEKCE PROTOZOÁRNÍ DNA

Pro detekci protozoární DNA byly vybrány 3 vzorky, které se ukázaly být při mikroskopické analýze pozitivní na přítomnost parazita. Tyto vzorky byly testovány na výskyt parazitární DNA, konkrétně tedy na přítomnost hlístice *Trichuris trichiura* a mikrosporidií *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi*. Výsledky detekce DNA jsou zaznamenány v tabulce (Tab. X).

Tab. X: Výsledky detekce protozoární DNA.

číslo vzorku	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
9	-	-	-
15	-	-	-
19	-	-	-

5. DISKUSE

Paraziti se nacházejí v každém organismu všech existujících druhů na Zemi. Veškeré organismy mají jednotné biochemické složení, které odkazuje na společného předka a je zcela jasné, že bez parazitů by se život na Zemi nevyvinul do dnešní podoby. Právě paleoparazitologie nám pomáhá porozumět evoluci parazitů. Díky evoluční a populační historii parazitů lze získat cenné informace nejenom o samotném parazitu, ale i o jejich hostitelích (Araújo et al. 2003).

Roku 1910 Marc Armand Ruffer, který jako první identifikoval parazita ve starověkých lidských ostatcích, položil základy tohoto poměrně nového vědního oboru - paleoparazitologie. Od té doby se začalo využívat nejrůznějších metod k záchytu parazitů v získaných archeologických vzorcích, především koncentrační metody sedimentační a flotační. Velmi perspektivní v tomto oboru se zdá být aplikace molekulárních metod.

Z dostupných publikací je patrné, že mezi nejčastěji zkoumané materiály, které jsou vhodné pro paleoparazitologickou analýzu, lze především zařadit organické sedimenty ze studní a jímek, koprolity nebo vzorky z hrobů. Nálezy parazitů v archeologických materiálech jsou důležité např. ke sledování šíření lidského druhu v průběhu historie, hygienických a stravovacích návyků, urbanizace, ale i domestikace zvířat.

Vzorky, které jsem obdržela k paleoparazitologické analýze, pocházely z náhodně vybraných míst původního smetiště. Prostředí smetiště lze charakterizovat na základě provedené archeobotanické analýzy prostředí pod vedením Doc. PhDr. Jaromíra Beneše, Ph.D. Velmi bohatý se ukázal soubor rostlinných makrozbytků. Zastoupeny byly především plevely a užitkové a ruderalní rostliny: *Chedopodium album* (merlík bílý), *Hyoscyamus niger* (blín černý) nebo např. *Urtica urens* (kopřiva žahavka). Rovněž byly analyzovány uhlíky ze spálených dřev. Ukázalo se, že většinou šlo o zbytky palivového dřeva. U vybraných vzorků byla provedena i pylová analýza. Pylové spektrum nevybočovalo od typických nálezů pocházejících ze středověku. Toto tvrzení dokazuje nízký nález pylu dřevin, a naopak bohatý nález bylin. Ze dřevin převažovala pylová zrna *Pinus* (borovice). Dalším početně zastoupeným druhem byla pylová zrna *Abies* (jedle). Dále lze jmenovat nález pylových zrn *Alnus* (olše), *Betula* (bříza) nebo *Picea* (smrk). Z pylových zrn bylin byly majoritně zastoupeny Cerealia (obiloviny). Z nálezů obilovin převažuje *Triticum* typ (typ pšenice), dále pak *Secale* (žito). Při mikroskopické analýze byla také hojně zastoupena pylová zrna *Poaceae*

(lipnicovité trávy). Za zmínku stojí i nález pylových zrn *Centaurea cyanus* (chrpa modrák), plevele ve středověku velmi hojného.

Po rehydrataci obdržených vzorků v roztoku fosforečnanu sodného, díky kterému došlo k uvolnění zeminy a případných vajíček, jsem je vyšetřila pomocí metod, které způsobují minimální zkreslení velikosti vajíček, techniky sedimentační a flotační a nakonec jsem provedla mikroskopickou analýzu takto připravených vzorků. Mikroskopický průkaz parazitů byl proveden pomocí sedimentační techniky, která se jeví jako účinnější metoda pro záchyt často inkrustovaných vajíček. I přesto, že je flotační technika často používanou a mnohdy i účinnou metodou k záchytu vajíček parazitů z archeologického materiálu, v mém případě se ukázala jako neúčinná.

V drtivé většině vzorků se při mé mikroskopické analýze objevovalo velké množství pylu, jak také potvrzuje výše zmíněná pylová analýza. Nelze tedy tvrdit, že by byl materiál znehodnocený např. nevhodným zacházením. I přes veškeré odhady, které předpokládaly nález většího množství střevních parazitů, se však lokalita ukázala být na nálezy parazitů mimořádně chudá. Při své analýze jsem identifikovala pouze jeden druh střevního parazita, konkrétně šlo o kosmopolitně rozšířený druh hlístice – *Trichuris* sp. Lze pouze odhadovat o jaký konkrétní druh *Trichuris* by mohlo jít. S velkou pravděpodobností jde o *Trichuris trichiura*.

Jak již bylo řečeno, bližší určení nalezených vajíček na základě morfologie ovšem není jednoznačně možné. Mnoho studií bylo zaměřeno na odlišení druhů *Trichuris trichiura*, vyskytující se u člověka a *Trichuris suis*, parazitující převážně u prasat a černé zvěře. Již roku 1930 Chandler uvádí, že spolehlivým kritériem pro druhovou odlišnost je délka spikule. I novější studie naznačují, že délka spikule *T. trichiura* je podstatně kratší než je průměrná délka spikule *T. suis*, avšak jednotlivé velikosti se překrývají, proto Cutillas et al. (2009) na základě svých studií uvádí, že tyto dva druhy je nedostatečné odlišovat na základě standardních postupů jako je morfologie nebo biometrie. Lze zmínit, že v nedávné době se výzkum zaměřil také na původ *Trichuris*. Na základě provedené studie se předpokládá, že *Trichuris* má původ v Africe. Nejprve tato hlístice parazitovala u primátů, poté se hostitelem stal člověk, díky kterému se parazit rozšířil z Afriky postupně do Asie a Jižní Ameriky. K přizpůsobení *Trichuris* na nového hostitele – prase došlo pravděpodobně v Číně, kde je také zaznamenán počátek domestikace tohoto zvířete (Hawash et al. 2016). Morfologickou podobnost vajíček *Trichuris* lze tedy vysvětlovat existencí společného předka.

V dostupných paleoparazitologických studiích bylo prokázáno, že identifikace vajíček *Trichuris* v archeologickém materiálu je jedním z nejčastějších nálezů. Vajíčka *Trichuris trichiura* byla prokázána ve více než 80 % evropských archeologických nalezištích a téměř u 100 % vzorků pocházejících ze středověku (Gonçalves et al. 2003). Tento jev je možné odůvodnit několika způsoby. Hlístice *Trichuris* denně produkuje oproti jiným druhům parazitů velké množství vajíček. Vajíčka mají silnostěnné obaly a jsou tak velmi odolná vůči vnějším vlivům. Někteří paraziti jako například *Enterobius vermicularis* mají tenkostěnná vajíčka a proto jejich dochování v archeologických materiálech je vzácné (Reinhard 1992). Výskyt parazitů, kteří se šíří fekálně-orálním transportem, jejich příkladem je *Trichuris*, je způsoben nízkou hygienou a sanitací, což je typické právě pro život ve středověku (Bouchet et al. 2003b). Ulice ve středověku byly vzhledem k nedostatku uzavřených stok a soukromých nebo veřejných toalet stále páchnoucí a plné odpadků. Města byla přeplněna lidmi a hygienické návyky obyvatel, jako je mytí a používání mýdla, byly nedostatečné. Veškeré tyto zvyky vedly ke snadnému a rychlému šíření parazitů (Thorndike, 1928).

Nálezy vajíček *Trichuris* jsou opravdu časté v archeologickém materiálu publikovaných v mnohých studiích. Lze jmenovat archeologické naleziště Raversijde (středověká vesnice) na severním pobřeží Belgie, kde se ve všech odebraných vzorcích potvrdila přítomnost vajíček *Trichuris*. Vysoká míra infekce u obyvatel vesnice odráží špatné hygienické podmínky typické pro středověk (Fernandes et al. 2005). V Belgii, konkrétně ve městě Namur (Place d'Armes) bylo nalezeno také velké množství vajíček *Trichuris*. Studie uvádí i více než 50 vajíček na sklíčko. Velký výskyt vajíček byl důsledkem uchování v suchém a anaerobním prostředí (Da Rocha et al. 2006). Na vajíčka *Trichuris* bohaté naleziště se zdá být i archeologické místo Piazza Garibaldi ve městě Parma (Itálie) datované do 10. – 11. století n.l. V tomto období zde bylo tržiště (Florenzano et al. 2012).

Pokud porovnáám svou analýzu materiálu s prací Bartošové (2009) a Myškové (2011), které rovněž prováděly paleoparazitologickou analýzu materiálu pocházejícího z archeologických nalezišť v České republice, jsou mé dosažené výsledky druhově i počtem značně chudší. V těchto pracích byl nejpočetněji zastoupeným parazitem *Trichuris trichiura*. V materiálu se ale například objevila vajíčka *Ascaris lumbricoides*, *Dicrocoelium dendriticum* a *Toxocara canis/cati*. Taktéž lze mou práci porovnat s diplomovou prací Bruzlové (2014), jež zpracovávala vzorky z deponovaných sond a vrtů z Václavského náměstí v Praze datovaných do první poloviny 14. století. I její výsledky nálezu byly druhově bohatší.

Druhovou i početní rozmanitost lze vysvětlit dobrým zakonzervováním vajíček ve studních/jímkách a vrtech, ze kterých byl zkoumaný materiál odebrán.

Velmi zajímavým faktem je, že jsem nenalezla žádné vajíčko *A. lumbricoides*, jehož výskyt je často společný právě s *Trichuris*. Studie poukazují na podobné podmínky, které potřebují pro svůj vývoj, ale i na to, že obě hlístice produkují odolná, silnostěnná vajíčka (Bouchet et al. 2003b, Gonçalves et al. 2003).

Rovněž jsem neidentifikovala vajíčka *Taenia*, která ale nejsou tak častá v archeologickém materiálu. Nález vajíček by poukazoval na konzumaci syrového vepřového nebo hovězího masa. Obyvatelé nižších sociálních tříd ve středověku konzumovali především polévky s dobře uvařeným masem, nebo maso jedli jen výjimečně. Pravděpodobným vysvětlením malého počtu vajíček je také jejich relativní tenkostěnnost (Bouchet et al. 2003b, Reinhard et al. 1986).

Materiál, který se při mikroskopické analýze ukázal pozitivní na přítomnost hlístice *Trichuris*, jsem vyšetřila pomocí molekulárních metod (izolace DNA a PCR). I přestože jsem izolaci DNA kvůli zvýšení efektivity prováděla v duplikátech, průkaz DNA *Trichuris trichiura* se nepotvrdil. Pravděpodobně se mi nepodařilo z důvodu nízké koncentrace vajíček ve vzorcích vyizolovat DNA. Dalším vysvětlením také může být vysoký stupeň degradace DNA ve zkoumaných vzorcích. Materiál jsem testovala také na přítomnost DNA mikrosporidií (*Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi*). DNA *Encephalitozoon intestinalis* bylo nalezeno na nalezišti v Praze (Myšková et al. 2014) až po využití molekulárních metod. I přesto, že jsem použila stejné primery, průkaz DNA se nepotvrdil.

Nízký nález parazitů lze vyložit tím, že se vajíčka jiných střevních druhů parazitů nedochovala kvůli charakteru prostředí. Nejpravděpodobnějším vysvětlením by však mohla být skutečnost, že se na smetiště dostávalo jen velmi omezené množství lidských výkalů a zvířecího trusu. Přestože byl materiál soudě podle palynologických výsledků dobře zachovaný, od samého počátku zřejmě obsahoval jen velmi nízké počty parazitů, zejména ve srovnání se zahloubenými odpadními jámami a zasypanými starými studněmi, kam byl organický materiál, který by mohl obtěžovat zápachem a být zdrojem infekcí, pravděpodobně ukládán přednostně.

Vlastní archeologická analýza naznačuje, že vzhledem k absenci parazitů zvířat smetiště sloužilo spíše městskému obyvatelstvu, obchodníkům nebo řemeslníkům, kteří se

nevěnovali zemědělské výrobě. Nalezené rostlinné makrozbytky byly pravděpodobně dovezeny na smetiště společně s rostlinným odpadem a pylová zrna mohla buď částečně ulpět na přivezeném materiálu, nebo mohla být zanesená větrem z dalekého okolí.

Smetiště bylo umístěno cíleně na říční břeh. Na taková místa se smetiště v některých zemích, kde není dostatečné povědomí o ochraně přírody, čistoty prostředí a hygieně, umisťují dodnes. Obyvatelé počítají s tím, že při zvýšené hladině vody záplava nahromaděné odpadky odnese a problém se jich přestane týkat. Nebezpečný a zapáchající organický odpad, jakým jsou výkaly, je však přednostně zakopáván jako hnojivo, zasypáván do jam nebo házen do vodního toku rovnou. Analogicky lze vyvodit, že se takto chovali i naši předkové ve středověku.

Případy, kdy paleoparazitologický výzkum přinese jen omezené nálezy nebo je dokonce zcela negativní, nejsou vzácné. Příkladem jsou negativní výsledky parazitologického materiálu z pohřebiště z doby stěhování národů (Praha – Zličín) (Ditrich a Myšková, ústní sdělení). Přestože měli archeologové snahu odebrat materiál z pánevní oblasti koster a očekávali, že se v něm naleznou zbytky střevních parazitů, nebyl ani po dlouhém úsilí nalezen ani jediný. Příčinou asi byla skutečnost, že šlo o pohřebiště zámožné populace s původně bohatými artefakty. To pak vedlo k opakovanému vyloupení hrobů, při kterém se se zbytky koster natolik hýbalo a původní materiál, který mohl zbytky parazitů obsahovat, byl nahrazen jiným. (Ditrich a Myšková, ústní sdělení).

Důležitým úkolem paleoparazitologie je porovnání výskytu parazitů mezi jednotlivými archeologickými lokalitami v různých časových obdobích. Provedená paleoparazitologická analýza historické Prahy přispěla k chápání životního stylu a hygienických návyků obyvatel z období středověku.

6. ZÁVĚR

- 1) Po použití koncentračních metod jsem v archeologickém materiálu pocházejícího ze středověké lokality (13. – 16. století) nynějšího hotelového komplexu Four Seasons Prague na Alšově náměstí v Praze identifikovala jeden druh střevního parazita *Trichuris* sp.
- 2) Ze třech vzorků pozitivních na hlístici *Trichuris* sp. jsem izolovala DNA a provedla metodu PCR, která neprokázala přítomnost DNA *Trichuris trichiura*.
- 3) Metodou PCR jsem nezjistila přítomnost mikrosporidií *Encephalitozoon intestinalis* ani *Enterocytozoon bieneusi*.

7. SEZNAM LITERATURY

- ALLISON MJ, GUILLEN S, GERSZTEN E, 2009: *Plasmodium vivax* malaria: a native preColumbian disease. *Modern Pathology* 22: 293A.
- ARAÚJO A, FERREIRA LF, CONFALONIERI U, 1985. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 141-143.
- ARAÚJO A, REINHARD K, BASTOS OM, COSTA LC, 1998. Paleoparasitology: Perspectives with new techniques. *Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 40 (6).
- ARAÚJO A, FERREIRA LF, 2000. Paleoparasitology and the Antiquity of Human Host-parasite Relationships. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, č. SUPPL.: 89–93.
- ARAÚJO A, JANSEN AM, BOUCHET F, 2003. Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 5-11.
- ASPÖCK H, FLAMM H, PICHER O, 1973. Darmparasiten in menschlichen Exkrementen aus prähistorischen Salz-bergwerken der Hallstatt-Kultur (800-350 v. Chr.). *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene* 223: 549-558.
- ASPÖCK H, BARTH FE, FLAMM H, PILCHER O, 1974. Parasites and parasitic diseases in prehistoric human populations in Central Europe. *Helminthologia* 36: 139-145.
- ASPÖCK H, AUER H, PICHER O, 1996. *Trichuris trichiura* eggs in the neolithic glacier mummy from the Alps. *Parasitology Today* 12: 255-256.
- BARTOLONI A, ZAMMARCHI L, 2012. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 4 (1).
- 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, 2011. Paleoparasitological Findings in Medieval and Early Modern Archaeological Deposits from Hradební Street , Chrudim , Czech Republic. *Interdisciplinaria Archaeologica Natural Sciences in Archaeology* 2 (1): 27–38.
- BERRIMAN M, HAAS BJ, LOVERDE PT, WILSON RA, 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460 (7253): 352–8.
- BOUCHET F, 1995a. Recovery of Helminth Eggs from Archeological Excavations of the Grand Louvre (Paris, France). *The Journal of Parasitology* 81 (5): 785–787.

- BOUCHET F, PETREQUIN P, PAICHELER JC, 1995b. First paleoparasitologic approach of the neolithic site in Chalain (Jura, France)]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)* 88 (5): 265–268.
- BOUCHET F, BAFFIER D, GIRARD M 1996. Palaeoparasitology in a Pleistocene context: initial observations in the Grande Grotte at Arcy-sur-Cure (Yonne), France. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III, Sciences de la Vie* 319 (2): 147-151.
- BOUCHET F, 1997. Intestinal capillariasis in neolithic inhabitants of Chalain (Jura, France). *Lancet* 349 (9047): 256
- BOUCHET F, HARTER S, PAICHELER JC, 2002. First recovery of *Schistosoma mansoni* eggs from a latrine in Europe (15-16th centuries). *The Journal of parasitology* 88 (2): 404–405.
- BOUCHET F, GUIDON N, DITTMAR K, 2003a. Parasite remains in archaeological sites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 47–52.
- BOUCHET F, HARTER S, LE BAILLY M, 2003b. The State of the Art of Paleoparasitological Research in the Old World. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (1): 95–101.
- BOUCHET F, ARAÚJO A, HARTER S, CHAVES SM, 2003c. *Toxocara canis* (Werner, 1782) Eggs in the Pleistocene Site of Menez-Dregan, France (300,000-500,000 Years Before Present). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 137–139.
- BRADLEY JE, JACKSON JA, 2004. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. *Parasite Immunology* 26 (11-12): 429–441.
- BRUZLOVÁ P, 2014. Střevní paraziti v archeologickém materiálu ze středověku. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta*, diplomová práce: 57 p.
- COCKBURN A, BARRACO RA, REYMAN TA, 1975. Autopsy of an Egyptian mummy. *Science* 187: 1155-1160.
- COOK, 1994. Tropical infection of the gastrointestinal tract and liver series *Enterobius vermicularis* infection. *Gut* 35: 1159–1162.
- COX FEG , 2002. History of Human Parasitology History of Human Parasitology. *Clinical microbiology reviews* 15 (4): 595–612.
- CUTILLAS CR. CALLEÓN M, DE ROJAS B, 2009. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* 111 (3): 299–307.
- DA ROCHA GC, HARTER S, 2006. Paleoparasitological remains revealed by seven

- historic contexts from „Place d'Armes", Namur, Belgium. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 43–52.
- DESPOMMIER D, 2003. Toxocariasis : Clinical Aspects , Epidemiology , Medical Ecology , and Molecular Aspects. *Society* 16 (2): 265–272.
 - DIDIER ES, WEISS LM, 2006. Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19 (5): 485–492.
 - DITTMAR K, TEEGEN WR, 2003. The Presence of *Fasciola hepatica* (Liver-fluke in Humans and Cattle from a 4,500 Year old Archaeological Site in the Saale Unnstrut Valley, Germany. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 141–143.
 - DOMMELIER S, BENTRAD S, PAICHELER JC, 1998. Parasitoses liées à l' alimentation chez les populations néolithiques du lac de Chalain (Jura, France). *Anthropozoologica* 27: 41-49.
 - DOMMELIER S, 2001. Contribution à L'étude Paléoparasitologique des Sites Néolithiques en Environnement Lacustre dans les Domaines Jurassien et Péri-alpin, *Université de Reims, Reims*, Thesis: 248 p.
 - DOWD SE, GERBA CP, 1998. Confirmation of the Human-Pathogenic Microsporidia and *Vittaforma corneae* in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (9): 3332–3335.
 - ESPINOSA-CANTELLANO M, MARTÍNEZ-PALOMO, 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2): 318–331.
 - FERNANDES A, FERREIRA LF, GONÇALVES MLC 2005. Intestinal parasite analysis in organic sediments collected from a 16th-century Belgian archeological site. *Cadernos de Saúde Pública* 21 (1): 329–332.
 - FERREIRA LF, ARAÚJO A, DUARTE AN 1993. Nematode larvae in fossilized animal coprolites from Lower and Middle Pleistocene sites, Central Italy. *Journal of Parasitology* 79: 440-442.
 - FERREIRA LF, REINHARD K, ARAUJO A, 1997. Paleoparasitology of oxyuriasis. *Anales de la Academia Nacional de Medicina*, 157: 20-24.
 - FLORENZANO A, MERCURI AM, PEDERZOLI A, 2012. The Significance of Intestinal Parasite Remains in Pollen Samples from Medieval Pits in the Piazza Garibaldi of Parma, Emilia Romagna, Northern Italy. *Geoarchaeology* 27 (1): 34–47.
 - FORNACIARI G, GIUFFRA V, FERROGLIO E, 2010. Malaria was „the killer" of Francesco I de' Medici (1531-1587). *The American journal of medicine* 123 (6): 568–569.

- FOUANT MM, ALLISON MJ, GERSZTEN E, 1982. Intestinal parasitic infestations among pre-Columbian Indians. *Laboratory Investigation* 46: 26A.
- FRÍAS L, LELES D, ARAÚJO A, 2013. Studies on protozoa in ancient remains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (1): 1–12.
- FRY GF, HALL HJ 1969. Parasitological examination of prehistoric human coprolites from Utah. *Utah Academy of Science Arts and Letters* 46 (2): 102-105.
- GARCÍA H, GONZALEZ AE, EVANS CAW, 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362 (9383): 547–556.
- GONCALVES MLC, ARAÚJO A, FERREIRA LF, 2003. Human intestinal parasites in the past: New findings and a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 103–118.
- GONIN P, TRUDEL D, 2003. Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Isolates in Clinical Samples by PCR and Enzyme-Linked Immunosor. *Journal of clinical microbiology* 41 (1): 237–241.
- GUILLEN S, ALLISON M, 2005. An early case of South American Leishmaniasis in Peru. *1st Paleopathology Association Meeting in South América*: 61.
- HARTER S, LE BAILLY M, 2003. First paleoparasitological study of an embalming rejects jar found in Saqqara, Egypt. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 119–121.
- HAWASH MBF, BETSON M, 2016. Whipworms in humans and pigs: origins and demography. *Parasites & Vectors* 9 (1): 37.
- HAWDON JM, HOTEZ PJ, 1996. Hookworm: developmental biology of the infectious process. *Current opinion in genetics & development* 6 (5): 618–623.
- HEHL AB, MARTI M, 2004. Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Molecular Microbiology* 53 (1): 19–28.
- HERRMANN B 1985. Parasitologisch-Epidemiologische Auswertungen Mittelalterlicher Kloaken. *Archäol Mittelalters* 13: 131-161.
- HORNE PD, LEWIN PK, 1977. Electron microscopy of mummified tissue. *Canadian Medical Association Journal* 117 (5): 472–473.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, MEUNIER C, DURAND P, RENAUD F, 2001. Dynamics of host – parasite interactions : the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection* 3: 841–849.
- INIGUEZ AM, REINHARD KJ, FERREIRA LF, 2008. *Enterobius vermicularis* ancient DNA In Pre- Columbian Human Populations. *Karl Reinhard Papers/Publications* 46.
- JIMÉNEZ FA, GARDNER SL, ARAÚJO A, FUGASSA M, 2012. Zoonotic and Human

Parasites of Inhabitants of Cueva de Los Muertos Chiquitos, Rio Zape Valley, Durango, Mexico. *Journal of Parasitology* 98 (2): 304–309.

- KLENZAK J, MATTIA A, VALENTI A, GOLDBERG J, 2005. Hepatic capillariasis in Maine presenting as a hepatic mass. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (5): 651–653.
- LE BAILLY M, BOUCHET F, 2010. Ancient dicrocoeliosis: Occurrence, distribution and migration. *Acta Tropica* 115 (3): 175–180.
- LE BAILLY M, GONCALVES MLC, HARTEK-LAILHEUGUE S, 2008. New finding of *Giardia intestinalis* (Eukaryote, Metamonad) in Old World archaeological site using immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (3): 298–300.
- LE BAILLY M, LEUZINGER U, SCHLICHTERLE H, BOUCHET F, 2005. Diphyllbothrium: Neolithic parasite? *The Journal of parasitology* 91 (4): 957–959.
- LE BAILLY M, 2005b. Evolution de la relation hôte/parasite dans les systèmes lacustres nord alpins au Néolithique (3900-2900 BC), et nouvelles données dans la détection des paléoantigènes de Protozoa, *Université de Rims Champagne Ardenne, Reims*, PhD Thesis: 291p.
- LELES D, GARDNER SL, REINHARD K, IÑIGUEZ A, 2012. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasites & vectors* 5 (1): 42.
- LIU GH, WU CI, SONG HQ, WEI SJ, 2012. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492 (1): 110–116.
- MCMANUS DP, LOUKAS A, 2008. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 225–242.
- MILON G, 2009. Perpetuation of leishmania: Some novel insight into elegant developmental programs. *Veterinary Research* 40 (2).
- MOWLAVI G, KACKI S, DUPOUY-CAMET J, 2014. Probable hepatic capillariosis and hydatidosis in an adolescent from the late Roman period buried in Amiens (France). *Parasite (Paris, France)* 21 (9).
- MYŠKOVÁ E, 2011. Paleoparazitologická analýza organických sedimentů archeologického naleziště na Národní třídě, Praha. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta*, bakalářská práce: 49 p.
- 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.

- NABI F, PALAHA HK, SEKHSARIA D, 2007. *Capillaria hepatica* infestation. *Indian pediatrics* 44: 781–782.
- ORTEGA YR, BONAVIA D, 2003. Cryptosporidium , Giardia , and Cyclospora in Ancient Peruvians. *Journal of Parasitology* 89 (3): 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 JC, 1983: Ancylostoma duodenale and the Saint Gothard anaemia, *British Medical Journal* 287: 1942–1945.
- REINHARD KJ, 1992. Parasitology as an Interpretive Tool in Archaeology. *American Antiquity* 57 (2): 231–245.
- REINHARD KJ, CONFALONIERI UE, HERRMANN B, FERREIRA LF, 1986. Recovery of oarasite remains from coprolites and latrines: Aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37: 217–239.
- REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, 2016. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7 (9): 581–596.
- REYNOSO-ROBLES R, PONCE-MACOTELA M, ROSAS-LÓPEZ LE, 2015. The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports* 5: 15168.
- RUFFER MA, 1910. Note on the Presence of „Bilharzia Haematobia" in Egyptian Mummies of the Twentieth Dynasty [1250-1000 B.C.]. *British medical journal* 1 (2557): 16.
- SAMUELS R, 1965. Parasitological study of long-dried fecal samples. *Archaeology* 19: 175-179.
- SAMUEL WM, KOCAN AA, PYBUS MJ, 2001. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Wiley. Parasitic Diseases of Wild Mammals.
- SCOTT ME, 2008. *Ascaris lumbricoides*: A review of its epidemiology and relationship to other infections. *Annales Nestle* 66 (1): 7–22.
- SHIN DH, OH CS, CHAI JY, 2011. *Enterobius vermicularis* eggs discovered in coprolites from a medieval Korean mummy. *Korean Journal of Parasitology* 49 (3): 323–326.
- SCHIA E, 1979. Human parasite remains: prospects for a quantitative approach., *The Concil for British Archaeology* 43: 66-70.
- SCHOLZ T, GARCIA HH, KUCHTA R, WICHT B, 2009. Update on the human broad

tapeworm (genus *diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 146–160.

- SCHWEIGER F, KUHN M, 2008. *Dicrocoelium dendriticum* infection in a patient with Crohn's disease. *Canadian journal of gastroenterology* 22 (6): 571–573.
- SZIDAT L, 1944. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und Frühgeschichtlichen Moorleichen. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 13: 265-274.
- THORNDIKE L, 1928. Sanitation, baths, and street cleaning in the Middle Ages and Renaissance. *Speculum* 3 (2): 192–203.
- VOLF P, HORÁK P, 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: TRITON: 318 p.
- ZINK AR, SPIGELMAN M., SCHRAUT B, GREENBLATT CL, 2006. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1616–1617.

URL:

URL 1: Mapy seznam.cz, Česká republika [online]: mapa části Prahy: [citováno 12.4. 2016],
dostupné z:

<https://mapy.cz/zakladni?x=14.4144461&y=50.0887944&z=17&source=stre&id=119213>