

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Protozoários intestinais em material arqueológico”

por

Liesbeth Martina Frías Villarroel

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Epidemiologia em Saúde Pública.

*Orientador principal: Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo
Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Leles de Souza*

Rio de Janeiro, março de 2013.

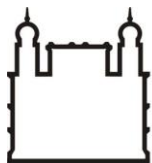
Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

V722 Villarroel, Liesbeth Martina Frías
Protozoários intestinais em material arqueológico. /
Liesbeth Martina Frías Villarroel. -- 2013.
103 f. : il. ; tab. ; mapas

Orientador: Araújo, Adauto José Gonçalves de
Souza, Daniela Leles de
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2013

1. Paleopatologia. 2. Parasitologia. 3. Fezes -
parasitologia. 4. Giardia lamblia. 5. Ensaio de
Imunoadsorção Enzimática. 6. DNA - análise. 7. Fósseis.
I. Título.

CDD - 22.ed. – 616.9



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

“Protozoários intestinais em material arqueológico”

apresentada por

Liesbeth Martina Frías Villarroel

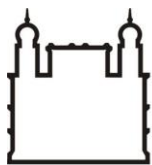
foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

Prof. Dr. Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves

Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo – Orientador principal

Dissertação defendida e aprovada em 22 de março de 2013.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 22 de março de 2013.

Liesbeth Martina Frías Villarroel

CG/Fa

Serviço de Gestão Acadêmica - Rua Leopoldo Bulhões, 1.480, Térreo – Manguinhos-RJ – 21041-210
Tel.: (0-XX-21) 2598-2702 ou 0800-230085

E-mail: secaepidemiologia@ensp.fiocruz.br Homepage: <http://www.ensp.fiocruz.br>

AGRADECIMENTOS

Toda minha gratidão vai primeiramente aos meus pais, por aceitar e apoiar minhas escolhas e ausências em momentos importantes. Por não dizer nada das minhas tentativas de mumificar diversos animais no quintal nem das minhas descrições de doenças infecciosas na hora do jantar. Ao meu irmão que se orgulha de mim e até leu o artigo produto deste projeto no dia que ele saiu. Vocês são tudo para mim!

Ao meu querido orientador principal, Dr. Adauto Araújo. Nunca imaginei que você ia me mandar à Alemanha o livro que eu precisava para prestar a prova de mestrado nem imaginei a grande influência que você teria (e tem) na minha vida. Obrigada por tudo.

À minha querida orientadora mineira, Dra. Daniela Leles. Acho que você tinha que ser minha orientadora mesmo! Adorei cada momento da pesquisa, mesmo aqueles de desespero quando nada dava certo. Espero que este seja só o começo de muitas colaborações, risadas e choppes.

Ao Dr Valmir Laurentino Silva por ceder o laboratório para realização dos ensaios imunoenzimáticos e pelas ótimas conversas durante as esperas. A ele e à Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, pelas sugestões à época da qualificação do projeto de Mestrado.

À Dra. Beatriz Brener do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF pela ajuda na leitura das lâminas e pelos inúmeros cafezinhos durante as análises.

À nova Dra. Adriana Pitella Sudré, pelo apoio e sugestões técnicas durante o desenvolvimento das padronizações. Por ser a única em entender quanto é difícil trabalhar com *Giardia*!

À todos os professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF que permitiram o acesso às instalações dos seus laboratórios para o desenvolvimento de parte dos procedimentos.

À plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ e da UFF, em especial a André Barbosa, pela realização do sequenciamento das amostras na UFF.

Aos colegas do laboratório de Paleoparasitologia, pela ajuda no começo desta aventura e pela amizade, especialmente a Mônica Vieira, por me ensinar os métodos usados na pesquisa de coprólitos, e a Ricardo França, pela companhia no laboratório, tentativas de conversar em espanhol e interpretações de músicas dos anos 70'. À Shênia Novo, a pessoa mais alegre que eu já conheci, pelo incentivo e motivação nos momentos em que ela achava que eu mais precisava.

À ENSP e aos meus professores do curso de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública da ENSP/FIOCRUZ por contribuir na minha formação acadêmica.

À FAPERJ pelo financiamento desta pesquisa e ao Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da CAPES/CNPq – Brasil por me conceder a bolsa de estudos durante o segundo ano.

À querida Marta Gonçalves de Araújo, pelo carinho e amizade e por me acolher na sua casa e família na minha chegada ao Rio.

À Alvaro Paz Penna, parceiro de vida, por não se incomodar com os estranhos potinhos de conteúdo misterioso que eu várias vezes deixei na geladeira. Por me forçar a enviar a documentação necessária para a inscrição no mestrado da ENSP mesmo com atraso... tudo isso aqui é culpa sua!

E a todos, que de uma forma ou de outra possibilitaram a conclusão do meu mestrado, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
 1. INTRODUÇÃO	
1.1. Parasitismo e relações parasitárias.....	16
1.2. Biologia dos protozoários.....	16
1.3. Protozoários intestinais de importância médica.....	17
1.3.1. <i>Giardia duodenalis</i>	17
1.3.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	19
1.3.3. <i>Entamoeba</i> spp.	20
1.4. Abordagens metodológicas para detecção de protozoários em material moderno.....	22
1.5. Parasitos antigos e evolução.....	23
1.6. Abordagens metodológicas para detecção de protozoários em material antigo.....	24
1.6.1. Análise macroscópica e microscópica.....	24
1.6.2. Imunodiagnóstico de proteínas antigas.....	24
1.6.3. DNA antigo.....	25
 2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
 3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Breve resumo da metodologia.....	28
3.2. Revisão sistemática de literatura.....	29
3.3. Amostras.....	30
3.4. Processamento das amostras.....	34

3.5.	Pesquisa parasitológica.....	34
3.5.1.	Diagnóstico imunoenzimático (ELISA)	34
3.5.2.	Diagnóstico microscópico.....	35
3.5.3.	Diagnóstico molecular.....	36
3.5.3.1.	Padronização das condições de diagnóstico em material fecal moderno.....	36
3.5.3.2.	Coprólito experimental.....	40
3.5.3.3.	DNA antigo.....	41
4.	RESULTADOS	
4.1.	Revisão sistemática de literatura.....	44
4.2.	Detecção imunoenzimática de protozoários em coprólitos e material antigo.....	48
4.3.	Avaliação do diagnóstico microscópico para a detecção de <i>Giardia</i> em material antigo.....	51
4.4.	Diagnóstico molecular.....	51
4.4.1.	Padronização das condições de amplificação para alvos específicos em material moderno.....	51
4.4.2.	Amplificação para alvos específicos no coprólito experimental.....	55
4.4.3.	Amplificação para alvos específicos em material antigo.....	56
4.4.4.	Sequenciamento.....	61
5.	DISCUSSÃO	
5.1.	Detecção microscópica de <i>G. duodenalis</i> em coprólitos.....	66
5.2.	Diagnóstico imunoenzimático de protozoários em material antigo.....	67
5.3.	Diagnóstico molecular de <i>G. duodenalis</i> em material arqueológico.....	68
5.4.	Sobre o uso de coprólitos experimentais.....	71
6.	CONCLUSÕES.....	72
7.	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO.....	92

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Fluxograma do processamento das amostras.....	28
Fig. 2. Fluxograma do diagnóstico imunoenzimático e microscopia óptica.....	29
Fig. 3. Fluxograma do diagnóstico molecular.....	29
Fig. 4. Mapa mostrando a localização aproximada dos sítios arqueológicos usados neste estudo.....	31
Fig. 5. Estruturas compatíveis com <i>Giardia</i> sp. observadas em material arqueológico e experimental. A: estrutura recuperada de coprólito humano (Gruta do Gentio II); B: estrutura recuperada de coprólito de canídeo (Toca dos Coqueiros); C: cisto de <i>G. duodenalis</i> identificado no coprólito experimental através da técnica de sedimentação espontânea.....	51
Fig. 6. Padronização da PCR para o gene B-giardina, usando 3 temperaturas de anelamento (59°C, 61°C e 63°C) e duas condições de manganês (2 mM MgCl ₂ , figura superior e 3 mM MgCl ₂ , figura inferior). M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. 1-3: DNA extraído de material fecal positivo para <i>G. duodenalis</i> (3 µL); 4-6: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 7: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 324 pb.....	52
Fig. 7. Padronização da nested PCR para o gene B-giardina, usando 3 temperaturas de anelamento (59°C, 61°C e 63°C) e duas condições de manganês (2 mM MgCl ₂ , figura superior e 3 mM MgCl ₂ , figura inferior). M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. 1-3: DNA extraído de material fecal positivo para <i>G. duodenalis</i> (2 µL); 4-6: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 7: controle negativo da PCR primária; 8: controle negativo da nested PCR. Tamanho esperado do produto: 147 pb.....	53
Fig. 8. Amplificação do gene B-giardina segundo as condições escolhidas para a PCR primária (1-3) e nested PCR (4-7). M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. 1 e 4: DNA extraído de material fecal positivo para <i>G. duodenalis</i> (3 µL); 2 e 5: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 3 e 6: controles negativos da PCR primária; 7: controle negativo da nested PCR. Tamanho esperado do produto para PCR primária e nested PCR (indicado por uma seta): 324 pb e 147 pb, respectivamente.....	53

- Fig. 9.** Padronização da PCR para o gene *gdh* em humanos (1 μ L DNA trofozoíta de *G. duodenalis*), usando seis temperaturas de anelamento (58°C a 63°C) e duas condições de magnésio (1-6: 2 mM $MgCl_2$; 7-12: 3 mM $MgCl_2$; 13: controle negativo). M-M': marcadores de peso molecular 50 pb. Tamanho esperado do produto: 214 pb..... 54
- Fig. 10.** Amplificação do gene *gdh* segundo as condições escolhidas para o gene em humanos (1 e 3) e animais (4 e 6). M: marcador de peso molecular 50 pb; 1 e 4: DNA extraído de material fecal positivo para *G. duodenalis* (3 μ L); 2 e 5: DNA de trofozoíta (1 μ L DNA); 3-6: controles negativos. Tamanho esperado do produto: 214 pb..... 54
- Fig. 11.** Amplificação do gene citocromo b em fezes modernas. 1: DNA extraído de fezes de cachorro (3 μ L); 3: DNA extraído de fezes de gato doméstico (3 μ L); 2 e 4: controles negativos. M: marcador de peso molecular 50 pb. Tamanho esperado do produto: 210 e 204 pb respectivamente. 55
- Fig. 12.** Amplificação para os alvos específicos de *G. duodenalis* usando DNA do coprólito experimental. 1: B-giardina, 5 μ L (tamanho esperado de 324 pb); 3: nested B-giardina, 2 μ L (tamanho esperado de 147 pb); 5-6: *gdh* em humanos e animais, 5 μ L (tamanho esperado de 214 pb); 2, 4 e 7: controles negativos. M: low DNA mass de 100 pb..... 56
- Fig. 13.** Amplificação para os alvos específicos de *G. duodenalis* e citocromo b do felino usando o template da PCR reconstrutiva. 1: B-giardina (5 μ L); 3: nested B-giardina (1 μ L); 5: *gdh* em humanos (5 μ L); 7: *gdh* em animais (5 μ L); 9: citocromo b (5 μ L); 2, 4, 6, 8, 10: controles negativos. M: marcador de peso molecular 50 pb. Tamanhos esperados (indicados por setas): 324 pb para o B-giardina; 214 pb para a nested B-giardina; 210 pb para o *gdh* em humanos e animais; 204 pb para o citocromo b no felino..... 56
- Fig. 14.** Amplificação para o gene B-giardina (PCR primária) em amostras arqueológicas humanas positivas para *G. duodenalis* pelo ELISA (5 μ L). Neg: controle negativo. M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto (indicado por uma seta): 324 pb..... 57
- Fig. 15.** Amplificação para o gene B-giardina (nested PCR) em amostras arqueológicas humanas positivas para *G. duodenalis* pelo ELISA (2 μ L). Neg: controle negativo. M: marcadores de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass

de 100 pb. Tamanho esperado do produto (indicado por uma seta): 147 pb.....	58
Fig. 16. Amplificação do gene <i>gdh</i> em amostras arqueológicas humanas positivas para <i>G. duodenalis</i> pelo ensaio ELISA (5 µL). Neg: controle negativo. M: marcadores de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto: 214 pb.....	59
Fig. 17. Amplificação do gene <i>gdh</i> em amostras arqueológicas não humanas positivas para <i>G. duodenalis</i> pelo ensaio ELISA (5 µL). Neg: controle negativo. M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto: 214 pb.	60
Fig. 18. Amplificação para o gene citocromo b em <i>Kerodon rupestris</i> . 1-8: amostras arqueológicas de roedor (5 µL); 9: controle negativo. M: marcadores de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto (indicado por uma seta): 205 pb.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de <i>Giardia</i> consideradas como válidas.....	18
Quadro 2. Descrição das amostras arqueológicas usadas neste estudo.....	32
Quadro 3. Descrição dos oligonucleótidos usados neste estudo.....	37
Quadro 4. Padronização das condições de PCR e nested-PCR para os genes-alvo usados neste estudo.....	39
Quadro 5. Resumo dos achados de protozoários em material antigo de origem humana.....	45
Quadro 6. Detecção de protozoários por ELISA em coprólitos e sedimento segundo sítios arqueológicos.....	50
Quadro 7. Detecção de protozoários no material arqueológico estudado.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> que acometem humanos.....	19
Tabela 2. Espécies de <i>Entamoeba</i> com hábitat intestinal que infectam humanos.....	21
Tabela 3. Teste de detecção parasitária em sedimento e sobrenadante pelo ensaio imunoenzimático.....	48
Tabela 4. Valores de densidade óptica (DO) para material fecal e coprólitos experimentais.....	48
Tabela 5. Detecção de protozoários pelo ELISA em coprólitos e sedimento.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR: reação em cadeia da polimerase

DNA: ácido desoxirribonucleico

SSU rRNA: subunidade menor do RNA ribossomal

Gdh: glutamato deidrogenase

Tpi: triose-fosfato isomerase

B-giardina: beta giardina

Ef1 α : fator de elongação 1-alfa

ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática

Gp60: glicoproteína 60kDA

AP: antes do presente

AD: anno Domini

AC: antes de Cristo

DO: densidade óptica

HVS1: região hipervariável 1

IFI: imunofluorescência indireta

pb: pares de bases

RESUMO

Apesar dos protozoários intestinais apresentarem uma distribuição global, a sua recuperação do material arqueológico é ainda rara. Esta escassez poderia estar associada a dificuldades na detecção devido as técnicas usadas e a fragilidade das estruturas parasitárias. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de protozoários intestinais, principalmente os zoonóticos, em coprólitos de origem humana e animal usando diferentes abordagens metodológicas. Para isto, foram selecionadas 70 amostras provenientes de 15 sítios arqueológicos da América do Sul. Com o objetivo de padronizar as metodologias de identificação de protozoários em material antigo, os testes foram realizados primeiramente em coprólitos experimentais. A detecção imunoenzimática foi realizada em todas as amostras usando-se um kit ELISA específico para *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* sp. e *Entamoeba histolytica/dispar*. As amostras positivas para *G. duodenalis* foram analisadas pela microscopia na tentativa de identificar estruturas parasitárias características preservadas no material. Finalmente, e usando-se as mesmas amostras, fragmentos dos genes B-giardina e *gdh* foram amplificados por PCR e sequenciados. Este estudo representa o primeiro relato de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. em amostras de origem humana e animal e o primeiro registro de *E. histolytica/dispar* em material arqueológico do Brasil. A presença de *G. duodenalis* em coprólitos de origem humana e animal do mesmo sítio arqueológico sugere a circulação zoonótica do parasito no passado. *G. duodenalis* não foi detectada pela microscopia óptica nas amostras arqueológicas. As fezes usadas no preparo do coprólito experimental tinham abundantes cistos antes da dessecação, contudo após dessecação e reidratação estruturas identificáveis foram escassas e a perda de morfologia característica prejudicou o diagnóstico. Finalmente, a padronização das condições de amplificação nas fezes frescas mostrou-se eficiente ao ser testada no coprólito experimental. Da mesma forma, os alvos desenhados para detectar o gene *gdh* foram capazes de identificar *G. duodenalis* em uma amostra arqueológica caracterizada como genótipo zoonótico A. Este achado reforça a evidência sobre a transmissão zoonótica do parasito na América do Sul em tempos pré-colombianos.

Palavras-chaves: paleoparasitologia, protozoários intestinais, *Giardia duodenalis*, coprólitos, ELISA, DNA antigo.

ABSTRACT

Although intestinal protozoa present a worldwide distribution, their recovery from archaeological contexts is still exceptional. This scarcity might be associated with difficulties in their detection through traditional microscopy techniques and the sensitivity of their parasitic structures. The aim of this study was to investigate the presence of enteric protozoa, mainly the zoonotic, in coprolites of human and animal origin using different methodological approaches. For this purpose, we selected 70 samples from 15 archaeological sites in South America. In order to standardize the identification of protozoa in ancient remains, tests were performed in experimental coprolites as well. Immunoenzymatic detection was performed in all the samples using an ELISA kit specific for *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* sp., and *Entamoeba histolytica/dispar*. Positive samples for *G. duodenalis* were then analyzed under the microscope in order to identify characteristic parasitic structures preserved in the samples. Finally, fragments of the B-giardin and gdh genes were amplified by PCR in the same samples and sequenced. This study represents the first record of *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* sp. in samples of human and animal origin and the first identification of *E. histolytica/dispar* in archaeological remains from Brazil. The presence of *G. duodenalis* in coprolites of human and animal origin from the same archaeological site, suggests the zoonotic circulation of the parasite in the past. No positive sample was found by microscopy in the archaeological samples. The feces used to prepare the experimental coprolite had abundant cysts before desiccation; nonetheless, after desiccation and rehydration, identifiable structures were scarce and the loss of characteristic morphology impaired the diagnosis. Finally, the standardization of amplification conditions in fresh feces showed to be successful when tested in the experimental coprolite. Likewise, the primers designed to detect the gdh gene were able to identify *G. duodenalis* in one archaeological sample, which was possible to assign to genotype A. This finding reinforces the evidence suggesting a zoonotic transmission of *G. duodenalis* in pre-Columbian South America.

Key words: paleoparasitology, intestinal protozoa, *Giardia duodenalis*, coprolites, ELISA, ancient DNA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Parasitismo e relações parasitárias

O parasitismo constitui uma das associações mais comuns entre os seres vivos. É um fenômeno de interdependência entre espécies que influencia a organização e a evolução da vida, estruturando a biodiversidade tanto do hospedeiro como do parasito e suas histórias evolutivas¹. Os parasitos são encontrados em todos os organismos vivos, constituindo-se em agentes importantes na regulação de populações e ecossistemas, mediante o impacto sobre a reprodução do hospedeiro, seu crescimento e sobrevivência². Eles representam mais da metade de todas as espécies vivas, o que sugere que todas sofrem de algum grau de infecção³.

O estudo dos protozoários teve seu início com a descoberta do microscópio no século XVII por Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). Os protozoários são organismos unicelulares que apresentam uma ampla distribuição em diversos habitats. O grupo inclui os agentes etiológicos de algumas das doenças com maior prevalência de óbitos no mundo, e outros agentes que cumprem algum papel em cadeias alimentares, mantêm o balanço de ecossistemas ou atuam como comensais de várias espécies.

1.2. Biologia dos protozoários

Dentre os protozoários que infectam humanos, exceto pelo gênero *Balantidium* cuja dimensão está em torno de 150 µm, a maioria deles apresenta um tamanho reduzido, com uma membrana plasmática que os separa do exterior e organelas especializadas que auxiliam na locomoção, sendo elas pseudópodes, flagelos ou cílios. O DNA encontra-se organizado em cromossomos contidos em um ou mais núcleos. A maioria dos protozoários é aeróbica e contém mitocôndrias que lhes fornecem energia, embora vários protozoários intestinais sejam capazes de crescimento anaeróbico mediante o uso de hidrogenossomas, mitossomas ou glicossomos. Os protozoários apresentam duas formas de reprodução, uma assexuada por fissão binária, fissão múltipla e formação de esporos, e uma sexuada por conjugação ou produção de gametas. A alimentação é realizada em alguns casos através da membrana plasmática, em outros é necessária a presença de estruturas especializadas. O estágio que se alimenta e cresce é conhecido como trofozoíta, porém sob condições adversas alguns protozoários podem se transformar em cistos que resistem à falta de alimento, pH e

temperaturas elevadas, propriedades que lhes permitem atingir novos hospedeiros e favorecer a transmissão^{4,5}.

Este estudo foi dirigido a três protozoários intestinais (*Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, e *Cryptosporidium* sp.) que contribuem para os casos de morbidade por doença diarreica, principalmente nos países em desenvolvimento. Também não são incomuns em países desenvolvidos, onde são responsáveis por surtos de diferentes dimensões. Todos eles compartilham várias características, pois todos possuem estágios parasitários dentro do hospedeiro, todos têm o potencial para causar doença e morte em alguns casos, e produzem cistos ou oocistos que sobrevivem no meio ambiente, assegurando a sua transmissão.

1.3. Protozoários intestinais de importância médica

1.3.1. *Giardia duodenalis*

A infecção por *Giardia* spp. vem sendo estudada há cerca de 300 anos, desde que o cientista holandês, Antonie van Leeuwenhoek, constatou sua presença pelo exame das suas próprias fezes mediante microscópios construídos por ele mesmo⁶. Desde então, descreveram-se diversas espécies e genótipos deste protozoário, tendo por base seu encontro em hospedeiros diferentes e a morfologia do parasito.

Giardia spp. é um parasito que infecta a uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados⁷, com mais de 50 espécies descritas na primeira metade do século XX⁸. Seis espécies de *Giardia* spp. são aceitas atualmente, sendo elas *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. psittaci*, *G. muris*, *G. microti* e *G. duodenalis* (quadro 1). Análises filogenéticas do gene SSU rRNA (subunidade menor do RNA ribossomal) e vários genes constitutivos codificando para glutamato desidrogenase (*gdh*), triose-fosfato isomerase (*tpi*), beta-giardina (β giardina) e fator de elongação 1-alfa (*ef1* α)^{9,10}, têm confirmado uma grande variabilidade em *G. duodenalis*, sugerindo que esse protozoário deveria ser considerado um complexo com genótipos distintos, similares em morfologia e com diferenças nos hospedeiros específicos¹¹⁻

¹⁸.

Quadro 1

Espécies de *Giardia* consideradas como válidas

Espécies	Descrita por	Ano	Genótipo	Hospedeiros principais
<i>Giardia duodenalis</i>	Davaine	1875	A	Humanos, primatas não humanos, ruminantes, alpacas, suínos, equinos, canídeos domésticos e silvestres, felídeos, roedores e marsupiais
			B	Humanos, primatas não humanos, bovinos, cães, equinos, coelhos e castores
			C, D	Canídeos domésticos e silvestres
			E	Ruminantes domésticos e suínos
			F	Felinos
			G	Ratos
			H	Pinípedes
<i>Giardia agilis</i>	Kunstler	1882	-	Anfíbios
<i>Giardia microti</i>	Benson	1908	-	Roedores
<i>Giardia muris</i>				
<i>Giardia ardeae</i>	Noller	1920	-	Aves
<i>Giardia psittaci</i>	Erlandsen & Bemrick	1987		

Fonte: modificada de Feng & Xiao¹⁰

Potencial zoonótico de *Giardia duodenalis*.

Para determinar o potencial zoonótico da infecção por *G. duodenalis*, é importante considerar o espectro dos hospedeiros das diferentes espécies, seus genótipos, o potencial de transmissão entre espécies e os fatores ambientais e de risco relacionados à exposição ao parasito. *G. duodenalis* tem sido isolada de vários hospedeiros, mostrando a existência de espécies específicas e de dois genótipos particulares com um amplo espectro de distribuição e de caráter zoonótico¹⁹. A ocorrência destes genótipos (A e B) em hospedeiros humanos e não humanos na mesma área geográfica, apóia o potencial de transmissão zoonótica²⁰⁻³³.

Epidemiologia molecular de *Giardia* spp.

A detecção de cistos de *Giardia* spp. em amostras fecais é o método mais usado para o diagnóstico da giardíase, e ensaios imunoenzimáticos, imunocromatográficos e de imunofluorescência estão disponíveis para a detecção de *G. duodenalis* em forma de kits comerciais³⁴. Embora no campo de diagnóstico de rotina ensaios moleculares sejam incipientes, no campo da pesquisa a análise por PCR tradicional vem aumentando como ferramenta de diagnóstico para detectar *Giardia* spp., em conjunto com outros protozoários

intestinais como *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* e *Dientamoeba fragilis*, mostrando alta sensibilidade e especificidade quando comparada aos métodos convencionais³⁵⁻⁴⁴.

A maioria dos estudos moleculares sobre *Giardia* spp. depende da análise dos genes-alvo SSU rRNA, beta giardina, *gdh* e *tpi*. O gene-alvo conservado SSU rRNA é usado para a genotipagem e diferenciação entre as espécies do gênero, enquanto o gene *tpi*, mais variável, é usado para a subgenotipagem. O gene beta giardina é um gene de cópia única específico para *Giardia*⁴⁵ e o gene *gdh* codifica a enzima que mantém o potencial redox intracelular do protozoário⁷, apresentando taxas de substituição intermediárias entre os genes SSU rRNA e *tpi*⁴⁶. O uso de diferentes loci tem mostrado inconsistências nos resultados das genotipagens, em consequência, a análise multilocus está sendo cada vez mais usada na caracterização de *G. duodenalis* em humanos e animais⁴⁷.

1.3.2. *Cryptosporidium* spp.

As primeiras observações de *Cryptosporidium* foram feitas no ano de 1907, quando Ernest Edward Tyzzer descreveu a espécie *C. muris*⁴⁸ e mais tarde *C. parvum*⁴⁹⁻⁵⁰.

As espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* infectam um amplo espectro de vertebrados, incluindo a espécie humana (tabela 1). A maioria dos casos humanos de criptosporidíase no mundo são provocados por *C. parvum*, *C. hominis*⁵¹⁻⁵⁶ e *C. meleagridis*⁵⁷⁻⁵⁸. Entre as cinco espécies mais comuns diagnosticadas em humanos, *C. parvum* e *C. hominis* são responsáveis por mais de 90% dos casos na maioria das áreas⁵⁹.

Tabela 1
Espécies de *Cryptosporidium* que acometem humanos

Espécies	Descrita por	Ano	Hospedeiros principais
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Tyzzer	1912	Artiodátila, humanos
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Slavin	1955	Aves, humanos
<i>Cryptosporidium felis</i>	Iseki	1979	Gatos
<i>Cryptosporidium canis</i>	Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal, Dubey	2001	Cães
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lal, Xiao	2002	Humanos, primatas não humanas

Fonte: modificado de Xiao *et al.*⁶⁰

Potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp.

Biologicamente, *C. parvum* e *C. hominis* diferenciam-se na especificidade do hospedeiro, apoiando a teoria da co-evolução parasito-hospedeiro no gênero *Cryptosporidium*⁶⁰. A natureza hospedeiro-específica de *Cryptosporidium* spp. indica que a maioria das espécies provavelmente não representa um risco de infecção aos humanos. Porém, enquanto as espécies ou genótipos podem infectar preferencialmente algumas espécies de hospedeiros, não implica que o parasito não possa potencialmente infectar outras^{59,61}.

C. parvum tem recebido maior atenção na transmissão zoonótica da criptosporidíase, infectando grande parte dos mamíferos, porém a caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. de vários animais tem mostrado a sua ausência em mamíferos silvestres^{62,63}. Enquanto a infecção por *C. hominis* é mais comum em áreas urbanas, a infecção por *C. parvum* tem maior prevalência em áreas rurais, onde parece se sustentar nas práticas de criação de animais⁶¹. Vários estudos tem mostrado uma dominância de *C. hominis* em humanos em países em desenvolvimento, responsáveis por 70-90% das infecções⁶⁴⁻⁷².

Epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* spp.

Tradicionalmente, o diagnóstico da criptosporidíase dependia de técnicas de coloração, mas outras técnicas alternativas vêm sendo usadas, incluindo o teste ELISA e vários ensaios de PCR⁷³⁻⁷⁶. O gene SSU rRNA é geralmente usado na genotipagem de *Cryptosporidium* spp. em humanos, animais e amostras de água, por ser de cópia múltipla e exibir tanto regiões semi-conservadas como hiper variáveis, que facilitam o desenho de alvos específicos para o gênero⁷⁷. Para estudar a transmissão de espécies em distintos hospedeiros, tem sido usada a análise da glicoproteína 60kDA (*gp60*), marcador polimórfico único identificado no genoma de *Cryptosporidium* que dirige a neutralização da resposta imune em humanos⁷⁸.

1.3.3. *Entamoeba* spp.

No ano 1875, Fedor Losch descreveu a presença de trofozoítas de uma ameba em fezes disentéricas, as quais chamou de *Amoeba coli*, sem lhe atribuir uma significância etiológica. Mais tarde em 1903, Schaudinn introduziu o termo *Entamoeba coli* para as espécies não patogênicas isoladas de pacientes assintomáticos e *E. histolytica* para aquelas que causavam disenteria⁷⁹. Atualmente é conhecido o papel de *E. histolytica* como agente etiológico da amebíase intestinal não invasiva, em geral assintomática; e das formas invasivas restritas ao

trato intestinal e associadas ou não à forma extraintestinal, sendo a forma invasiva responsável pela alta morbidade e mortalidade por diarreia e outros agravos à saúde em países em desenvolvimento^{80,81}. O parasito infecta 500 milhões de pessoas por ano, causando doença em 50 milhões dos casos, óbito em 100.000 indivíduos ao ano⁸² e constituindo a terceira causa de morte por doença infecciosa, depois da malária e esquistossomose⁸³.

O gênero *Entamoeba* inclui muitas espécies, das quais seis tem por hábitat o lúmen intestinal humano^{84,85} (tabla 2). Embora as espécies *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii* sejam morfológicamente idênticas, apresentam diferenças em aspectos bioquímicos e genéticos⁸⁶⁻⁹¹, sendo patogênica somente a primeira.

Tabela 2

Espécies de *Entamoeba* com hábitat intestinal que infectam humanos

Espécie	Descrita por	Ano	Hospedeiro principal
<i>Entamoeba histolytica</i>	Schaudinn	1903	Humanos e outros primatas
<i>Entamoeba dispar</i>	Brumpt	1925	Humanos
<i>Entamoeba moshkovskii</i>	Tshalaia	1941	Humanos
<i>Entamoeba polecki</i>	Prowazek	1912	Suínos e outros primatas
<i>Entamoeba coli</i>	Grassi	1879	Humanos
<i>Entamoeba hartmanni</i>	Prowazek	1912	Humanos

Fonte: modificado de Ponce-Gordo & Martínez Díaz⁹³

E. histolytica tem por hábitat o intestino grosso, multiplicando-se e formando cistos que são eliminados com as fezes, podendo infectar outros indivíduos quando ingeridos com água ou alimentos contaminados. Os parasitos podem invadir a parede intestinal causando ulcerações e diarreia sanguinolenta, conhecida como disenteria amebiana. Se estes alcançarem a circulação, podem ser transportados a outros tecidos^{79,92}.

Potencial zoonótico de *Entamoeba* spp.

O risco no campo da saúde coletiva pela transmissão zoonótica de *E. histolytica* é mínimo. O cão pode ser uma fonte potencial de infecção humana após o consumo de água e alimentos contaminados por fezes humanas, porém o parasito raramente o infecta, apresentando neste um baixo índice de encistamento⁹⁴. Outras espécies potencialmente zoonóticas de *Entamoeba* spp. (*E. coli*, *E. polecki* e *E. hartmanni*) têm sido reportadas em humanos^{95,96}, primatas não humanos^{96,97}, cães e marsupiais^{98,99}.

Epidemiologia molecular de *Entamoeba* spp.

A microscopia óptica não consegue distinguir entre *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*, constituindo uma técnica obsoleta no diagnóstico da amebíase, embora a detecção de hemácias dentro de trofozoítas seja mais comum na infecção por *E. histolytica*^{100,101}. Os ensaios antigênicos ELISA específicos para *E. histolytica* usam anticorpos policlonais ou monoclonais, mostrando ser mais sensíveis e específicos que a microscopia ao obter testes positivos em 60-90% dos casos¹⁰². Atualmente existem kits imunoenzimáticos específicos para *E. histolytica*, mas ainda não são muito usados; a maioria dos testes disponíveis no mercado distinguem somente as amebas como um complexo *E. histolytica-E. dispar*.

Um grande número de ensaios de PCR estão disponíveis para detecção de *Entamoeba* spp., mostrando excelente sensibilidade e especificidade^{91,103}, baseada na amplificação de sequências de DNA espécie-específicas usando diferentes modalidades das técnicas de PCR^{90,104-106}.

1.4. Abordagens metodológicas para detecção de protozoários em material moderno.

A maioria dos laboratórios de microbiologia médica usam procedimentos de diagnóstico convencionais, como cultura, testes imunológicos e microscopia. A microscopia apresenta algumas desvantagens ao depender da experiência e habilidades do microscopista para a detecção e identificação correta de parasitos. Além disso, a intermitência da eliminação de cistos e oocistos pode levar a resultados falsos negativos¹⁰⁷. No entanto, a microscopia possui a vantagem de permitir a identificação de diversas espécies de parasitos na amostra analisada, o que não é sempre possível fazer nos testes imunológicos específicos¹⁰⁸.

A detecção por antígenos é uma alternativa rápida e efetiva para vários parasitos, porém sua sensibilidade é limitada, precisando de um teste para cada espécie³⁴. As ferramentas moleculares também oferecem uma detecção rápida e sensível dos parasitos intestinais, embora mantendo-se limitada devido aos altos custos de implementação, inibidores nas amostras fecais¹⁰⁹ e necessidade de laboratórios especializados.

Na última década, vários métodos têm sido publicados para a detecção de DNA parasitário; métodos mais simples e efetivos têm sido desenvolvidos^{36,110}, além de equipamentos mais sofisticados e de amplificação mais rápida com a capacidade de detecção

de mais de um parasito em uma mesma PCR, como PCR multiplex e PCR em tempo real¹¹¹⁻¹¹³.

1.5. Parasitos antigos e evolução

Há 50.000-70.000 anos que *Homo sapiens* saiu do sudeste africano¹¹⁴⁻¹¹⁸, se expandindo ao Oriente Médio e, de forma independente e em várias ondas migratórias, à Europa e Ásia até habitar todos os espaços do globo. Porém, levou consigo diversos parasitos que o acompanharam nas suas migrações.

O estudo de parasitos em material antigo, seja arqueológico ou paleontológico, faz parte da paleoparasitologia, disciplina que tem reunido múltiplos estudos, desde a descrição pioneira de ovos de *Schistosoma haematobium* em múmias egípcias por Sir Armand Ruffer no início do século XX¹¹⁹. Seu desenvolvimento inicialmente foi concomitante ao da paleopatologia, quando as duas baseavam-se no estudo de corpos mumificados, geralmente provenientes de populações do Antigo Egito, para o diagnóstico histológico de doenças em tecidos.

A análise de coprólitos propriamente dita teve seu início na segunda metade do século XX¹²⁰ com a introdução da técnica da reidratação em fosfato trissódico¹²¹ e análise microscópica. Os primeiros trabalhos mostraram a antiguidade da relação parasito-hospedeiro, tentando entender o processo saúde e doença de povos indígenas, as relações evolutivas entre humanos, animais, parasitos e a distribuição de zoonoses ao longo do tempo em diferentes lugares^{122,123}.

O estudo de parasitos no passado depende da distribuição e disponibilidade dos restos antigos, a ecologia das doenças infecciosas e o uso de técnicas adequadas para sua detecção. Uma grande variedade de parasitos têm sido recuperada em material antigo, tanto no Velho Mundo como nas Américas, sendo a maioria dos achados de helmintos¹²⁴. Apesar dos protozoários exibirem uma distribuição global, eles não são facilmente recuperados de contextos arqueológicos. Esta escassez pode estar relacionada às dificuldades na sua detecção usando microscopia óptica e à fragilidade das estruturas parasitárias que são menos resistentes aos processos tafonômicos, levando a uma subestimação da presença dos protozoários no passado.

1.6. Abordagens metodológicas para detecção de protozoários em material antigo

1.6.1. Análise macroscópica e microscópica

Apesar de se encontrar limitada à preservação do corpo e pontos de referência específicos, o exame macroscópico de lesões tem sido a técnica mais usada na aproximação às doenças no material arqueológico. Como exemplo, encontraram-se alterações indicativas de doença de Chagas no intestino grosso de uma múmia pré-colombiana nos Estados Unidos da América¹²⁵, e posteriormente confirmada pelo diagnóstico molecular¹²⁶, como também em múmias do Brasil^{127,128}. Há também descrições de lesões sugestivas de doença de Chagas em número considerável de corpos mumificados da região andina¹²⁹.

A busca de documentos históricos já oferece um método indireto para se estudar as infecções no passado. Revisando documentos médicos, relatos de autópsias e registros de óbito feitos por médicos da corte dos Medici, Gino Fornaciari e colaboradores, conseguiram reconstruir a história médica de uma das famílias mais influentes do Renascimento italiano¹³⁰⁻¹³². De forma similar, a origem da leishmaniose nas Américas foi discutida baseada em documentos etno-históricos e representações de cerâmica Mochica (*huacos*), exibindo lesões parecidas às encontradas na leishmaniose mucocutânea¹³³.

A microscopia tem sido o método tradicional de identificação de parasitos na paleoparasitologia. Os primeiros achados de protozoários em fezes fossilizadas (coprólitos) foram assim descritos¹³⁴⁻¹³⁶. Lamentavelmente, a maioria desses achados não foram registrados por fotografias ou imagens, dificultando comparações com estudos posteriores.

1.6.2. Imunodiagnóstico de proteínas antigas

Apesar de ter sugerido que a diagênese pode alterar a antigenicidade de proteínas antigas¹³⁷, alguns estudos propõem que elas retêm uma maior integridade e especificidade antigênica¹³⁸, sendo mais resistentes do que o DNA antigo ao decaimento tafonômico¹³⁹⁻¹⁴¹. Este enfoque tem incluído proteínas antigas de plantas e animais que têm persistido no tempo^{140,142-146}. A detecção de antígenos em material antigo tem utilizado diversas técnicas, incluindo imunocromatografia, detecção imunoenzimática (ELISA) e análise imunohistoquímica^{130,131, 147-152}.

Na paleoparasitologia, a imunofluorescência e os ensaios imunoenzimáticos têm sido as técnicas mais utilizadas no reconhecimento de antígenos no material arqueológico¹⁵³⁻¹⁵⁷. Técnicas bioquímicas foram usadas inicialmente em 1989, quando Faulkner e colaboradores aplicaram imunofluorescência indireta para identificar cistos de *Giardia* em coprólitos humanos datados de 2177 ± 145 antes do presente (AP)¹⁵⁸.

1.6.3. DNA antigo

A recuperação de sequências de DNA mitocondrial de uma quagga¹⁶⁰ e a clonagem molecular de DNA de uma múmia egípcia¹⁶¹ foram as primeiras tentativas de recuperar DNA antigo, porém, com ausência da técnica de PCR, o isolamento de clones portadores da mesma sequência era um objetivo difícil de atingir. O desenvolvimento da PCR^{162,163} tornou possível a produção ilimitada de número de cópias escassas de DNA. As primeiras aplicações da PCR em DNA antigo^{164,165} apontaram à duas dificuldades técnicas, o dano molecular e a contaminação com DNA moderno¹⁶⁶⁻¹⁶⁹.

Os primeiros estudos de DNA antigo usaram tecido mole e osso, por ser o último abundante no registro fóssil e preservar melhor o DNA. O estudo de coprólitos como fonte de DNA antigo começou no ano 1998 e desde então, a variedade de fontes tem incluído também cabelo, concheiros de roedores do gênero *Neotoma*, sedimento, penas e cascas de ovos, entre outros¹⁷⁰.

Uma segunda revolução na pesquisa em DNA antigo foi introduzida no ano 2005 com o uso de sequenciamento de DNA de última geração¹⁷¹. Estas tecnologias aumentaram em 300 vezes a recuperação de DNA quando comparadas com o sequenciamento tradicional Sanger, permitindo reconstruir vários genomas mitocondrais antigos, seja por sequenciamento por shotgun ou em combinação com PCR multiplex ou hibridização molecular¹⁷²⁻¹⁷⁵.

O progresso na pesquisa de DNA antigo tem sido principalmente dirigido pela tecnologia. Além destas grandes revoluções existem abordagens metodológicas (tais como a melhoria nas técnicas de extração de DNA e modificações da PCR) que, apesar de representarem um menor avanço, também têm trazido sua contribuição. Os primeiros estudos de DNA antigo em paleoparasitologia foram realizados em múmias animais experimentais, mostrando que as técnicas moleculares também conseguiam recuperar DNA parasitário de material

¹ *Equus quagga* é um equídeo da África do Sul que foi extinto em 1883¹⁵⁹.

arqueológico¹⁷⁶. Contudo, a biologia molecular tem sido utilizada principalmente para a confirmação dos achados, tendo já identificado malária, leishmaniose visceral e doença de Chagas. Atualmente, a biologia molecular não tem sido utilizada na identificação de protozoários intestinais em material antigo.

Apesar dos protozoários intestinais apresentarem uma distribuição global, eles não são recuperados com facilidade do registro arqueológico, sendo ainda muito raros na literatura. Essa escassez poderia estar relacionada às dificuldades da sua detecção pela técnica tradicional da microscopia óptica e ao caráter frágil das estruturas parasitárias que não apresentam uma boa preservação. Esta pesquisa foi principalmente dirigida ao estudo de *G. duodenalis*, dada à existência de publicações prévias identificando o parasito em material arqueológico. Ao proporcionar uma detecção mais sensível e específica, o uso da biologia molecular em material antigo permitiria a identificação ao nível de genótipo do parasito, oferecendo uma abordagem interessante ao estudo do potencial zoonótico de *G. duodenalis* no passado, ênfase ainda pouco explorada na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a presença de protozoários intestinais, principalmente de caráter zoonótico, em coprólitos humanos e animais mediante o uso de diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar as técnicas usadas na recuperação de protozoários intestinais, através de uma revisão sistemática dos achados em material arqueológico.
- Examinar coprólitos experimentais positivos para *G. duodenalis* mediante microscopia óptica, para visualizar diferenças morfológicas nas estruturas observadas tanto neles quanto nas amostras arqueológicas, e diagnóstico molecular, a fim de padronizar as metodologias a serem empregadas nas amostras arqueológicas.
- Identificar a presença de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* sp. e *E. histolytica/dispar* em coprólitos experimentais e amostras arqueológicas mediante o uso de ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) específicos para cada protozoário.
- Examinar por microscopia óptica as amostras arqueológicas positivas para *G. duodenalis* pelo diagnóstico imunoenzimático.
- Caracterizar molecularmente isolados de *G. duodenalis* em amostras arqueológicas.
- Confirmar molecularmente a origem zoológica dos coprólitos de origem não humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Breve resumo da metodologia

Primeiramente foi feita uma revisão sistemática de literatura com o objetivo de comparar as metodologias usadas no estudo de protozoários no passado. Selecionou-se material fecal moderno positivo para cada protozoário e, com a finalidade de padronizar as técnicas de recuperação de protozoários em material antigo, foram preparados coprólitos experimentais usando parte deles. Tanto as amostras experimentais quanto as arqueológicas foram processadas e sedimentadas (fig. 1). Todas as amostras foram submetidas a testes imunoenzimáticos específicos para cada protozoário. As amostras positivas para *G. duodenalis* pelo teste ELISA foram analisadas pela microscopia óptica (fig. 2) e posteriormente testadas pela biologia molecular (fig. 3). Todos os testes foram padronizados em material fecal moderno, testados em material experimental e finalmente aplicados nas amostras arqueológicas.

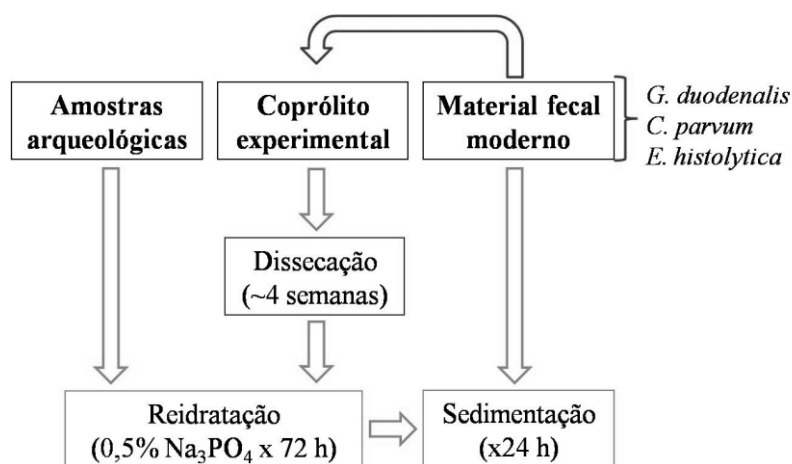


Fig. 1. Fluxograma do processamento das amostras

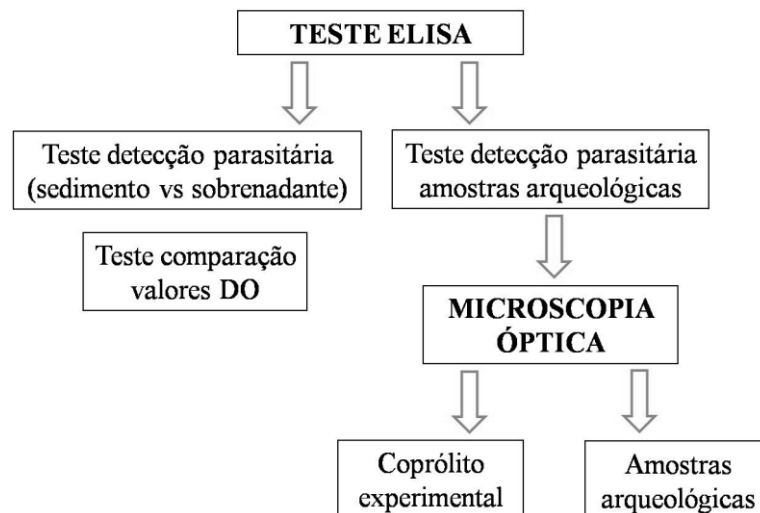


Fig. 2. Fluxograma do diagnóstico imunoenzimático e microscopia óptica.

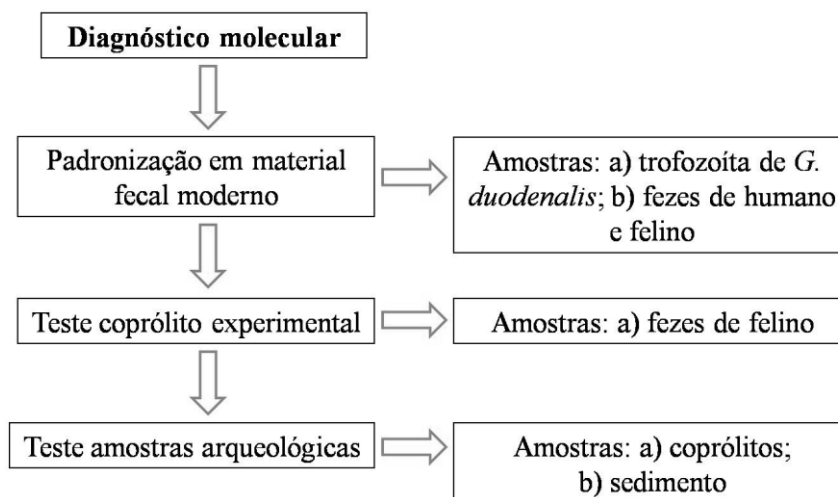


Fig. 3. Fluxograma do diagnóstico molecular.

3.2. Revisão sistemática de literatura

A revisão de literatura teve como objetivo identificar e sumarizar a distribuição geográfica dos protozoários provenientes de material arqueológico humano no passado, enfatizando a metodologia usada nos estudos. Os descritores usados na pesquisa em bases eletrônicas incluíram assuntos relacionados a paleoparasitologia, arqueologia e paleopatologia. As principais bases utilizadas foram PubMed e ScienceDirect, além de consultas a autores com publicações nestas áreas. Os dados analisados nas publicações, foram principalmente espécies de protozoários identificadas, sítios arqueológicos, datações,

metodologia empregada e resultados. Não houve exclusão quanto ao ano de publicação ou idioma.

3.3. Amostras

Material fecal moderno.

Material fecal positivo para *G. duodenalis* (origem humana e de felino), *C. parvum* (ruminante) e *E. histolytica* (humano), foi selecionado de material coletado a fresco depositado no laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense, laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e do Departamento de Ciências Biológicas (ENSP/FIOCRUZ) respectivamente. O material fecal positivo foi usado como controle positivo no teste imunoenzimático e a amostra positiva para *G. duodenalis* foi usada também na padronização e teste das condições de amplificação da PCR.

Coprólitos experimentais.

Com o objetivo de padronizar a metodologia de identificação de protozoários em material antigo, os testes foram realizados primeiramente em coprólitos experimentais. Estes foram preparados colocando-se 2,5 gramas de material fecal positivo para os protozoários propostos, em uma estufa a ~37-40°C e pesados periodicamente até não haver mais perda de peso.

Coprólitos e sedimento.

Foram selecionados 70 coprólitos e/ou sedimento, de origem humana e animal, provenientes de 14 sítios arqueológicos em três países da América do Sul (fig. 4, quadro 2), priorizando aquelas com origem e datação conhecida. Todos eles fazem parte da coleção do laboratório de Paleoparasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ).

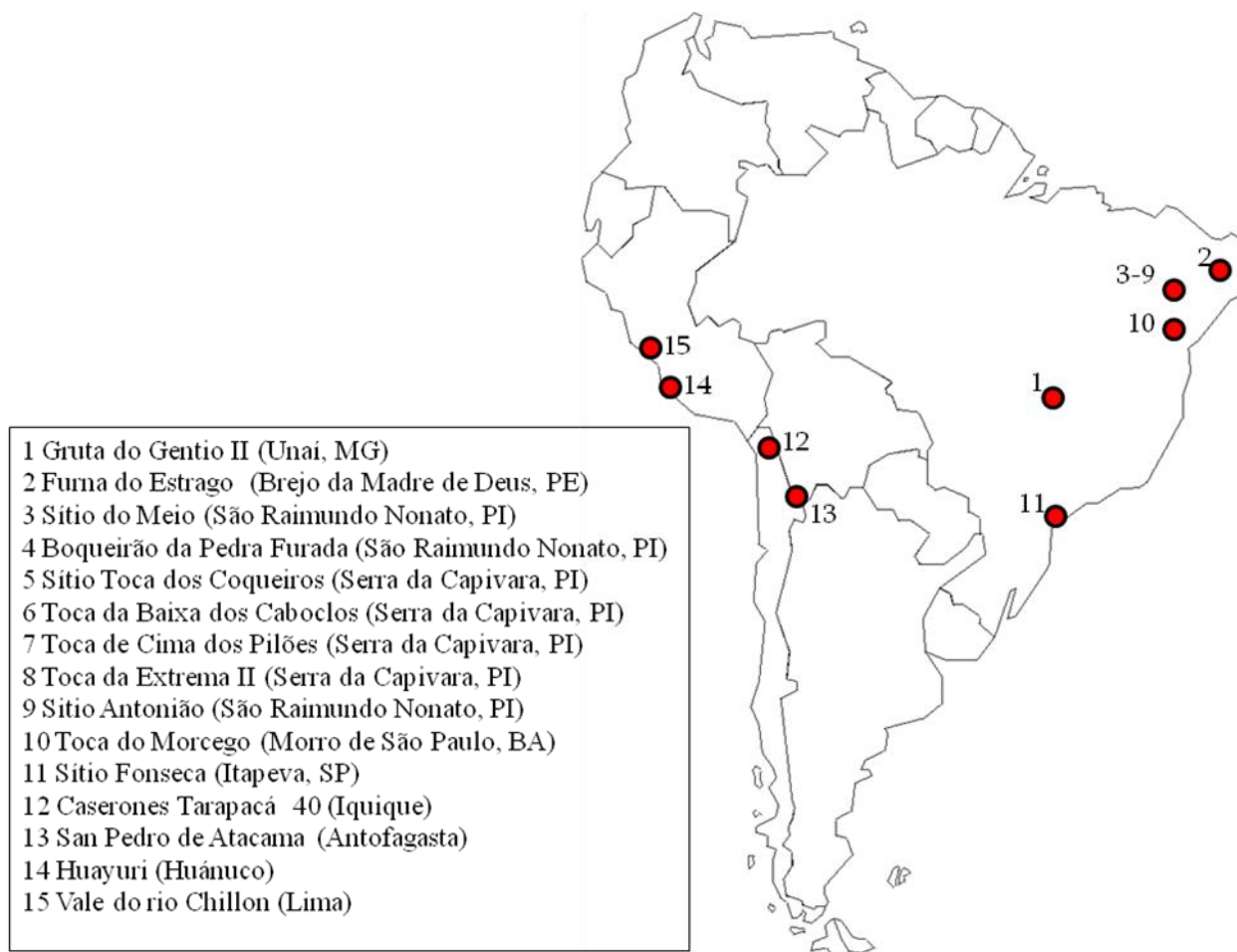


Fig. 4. Mapa mostrando a localização aproximada dos sítios arqueológicos usados neste estudo.

Quadro 2

Descrição das amostras arqueológicas usadas neste estudo

Nº	ID amostra	Sítio arqueológico	Datação	Origem	
				Coprólito	Sedimento
1	4	Gruta do Gentio II (Minas Gerais, Brasil)	3490±120 a 430±70 AP	Humano	-
2	5a				
3	16				
4	17				
5	22				
6	28B				
7	29				
8	38				
9	43				
10	44a				
11	337	Boqueirão da Pedra Furada (Piauí, Brasil)	7230±80 AP	Humano	-
12	338				
13	1882				
14	1883A				
15	1883B				
16	350			Roedor	-
17	351				
18	356		8170±80 AP	Roedor	-
19	359				
20	353		9800±60 AP	Humano	-
21	1884		9800±60 AP		
22	1876				
23	848	Sítio do Meio (Piauí, Brasil)	9150±60 AP	Felídeo	-
24	934		SI	Roedor	-
25	944		SI		
26	985 a.2		SI	-	I
27	1020		SI	Humano	-
28	1474	Sítio Fonseca (São Paulo, Brasil)	1010±100 AP	-	Humano
29	1476				
30	1477				
31	1478				

AP: antes do presente; AD:Anno Domini; SI: sem informação, mas do período pré-colombiano;

I: origem incerta; -: não se aplica. Nota: detalhes providos ao nível de acurácia permitido pelas fontes originais

Quadro 2
(continuação)

Nº	ID amostra	Sítio arqueológico	Datação	Origem	
				Coprólito	Sedimento
32	510	Furna do Estrago (Pernambuco, Brasil)	4000-5000 AP	Humano	-
33	511				
34	728N		SI		
35	729a		SI		
36	730b		SI		
37	731a		SI		
38	1608	Toca dos Coqueiros (Piauí, Brasil)	8870±60 AP	-	I
39	1633			Canídeo	-
40	1670			Felídeo	-
41	1042			Humano	-
42	1618				
43	1678				
44	1140	Toca da Baixa dos Caboclos (Piauí, Brasil)	SI	-	I
45	1172C		400±50 AP	Humano	-
46	1172D			Roedor	-
47	1186				
48	1192				
49	768	Toca da Cima dos Pilões (Piauí, Brasil)	2290±60 AP	Roedor	-
50	773	Sítio Antônio (Piauí, Brasil)	9670±140 AP	Roedor	-
51	1580	Toca do Extrema II (Piauí, Brasil)	4730±110 AP	Roedor	-
52	1590	Toca do Morcego (Bahia, Brasil)	9200 AP	Felídeo	-
53	M05	San Pedro de Atacama (Antofagasta, Chile)	940-1240 AD	Humano	-
54	M09				
55	M12				
56	M06		100-500 AD		
57	M33		900-1450 AD		
58	M17		1300 AC-500 AD		
59	M23		Horizonte Meio		
60	637		750-1100 AD		
61	654				

AP: antes do presente; AD:Anno Domini; SI: sem informação, mas do período pré-colombiano;

I: origem incerta; -: não se aplica. Nota: detalhes providos ao nível de acurácia permitido pelas fontes originais

Quadro 2
(continuação)

Nº	ID amostra	Sítio arqueológico	Datação	Origem	
				Coprólito	Sedimento
62	665	Caserones Tarapaca 40 (Iquique, Chile)	900 AC-800 AD	Humano	-
63	683				
64	643				
65	678				
66	628	Huayuri (Huánuco, Peru)	Período Intermediário Tardio 1200-1400 AD	Humano	-
67	639				
68	676				
69	1565	Vale do rio Chillón (Lima, Peru)	Período Incaico Tardío	Humano	-
70	1567				

AP: antes do presente; AD: Anno Domini; SI: sem informação, mas do período pré-colombiano;

I: origem incerta; -: não se aplica. Nota: detalhes providos ao nível de acurácia permitido pelas fontes originais

3.4. Processamento das amostras

As amostras arqueológicas e os coprólitos experimentais foram processados no laboratório de Paleoparasitologia (ENSP/FIOCRUZ). Dependendo da disponibilidade, entre 0,5-2 gramas de cada coprólito foram selecionadas, sendo primeiramente reidratadas em solução de fosfato trissódico à 0,5%¹²¹ por 72 horas no mínimo. Posteriormente foram homogeneizadas na mesma solução, filtradas em gaze para reter macro-resíduos e submetidas à sedimentação espontânea pela técnica de Lutz¹⁷⁷ por 24 horas na geladeira. O sedimento obtido foi coletado em tubos de 15 mL, codificado e imediatamente estocado em geladeira, sem uso de conservantes. Uma alíquota (200 µL) de cada amostra foi armazenada em freezer para o diagnóstico molecular.

3.5. Pesquisa parasitológica

3.5.1. Diagnóstico imunoenzimático (ELISA)

A detecção de antígenos em material antigo foi realizada no laboratório de imunodiagnóstico do Departamento de Ciências Biológicas (ENSP/FIOCRUZ), usando-se o

ensaio imunoenzimático ELISA (IVD Research) para a detecção de proteínas de parede específicas para cada protozoário.

O uso de sedimento versus sobrenadante foi testado para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. em uma seleção aleatória de amostras antigas, seguindo o protocolo dos fabricantes e algumas modificações padronizadas por Gonçalves *et al.*¹⁵⁴ para material antigo. Os coprólitos experimentais e o material fecal fresco, a partir do qual eles foram produzidos, foram testados também durante a padronização com o objetivo de comparar a intensidade do sinal obtido, tanto entre eles quanto entre as amostras antigas.

Os resultados foram analisados visualmente a partir de mudanças na cor dentro dos poços e pela leitura da densidade óptica (DO) em um espectrofotômetro leitor de placas (leitura bicromática a 450/620-650 nm). Amostras que apresentaram valores de densidade óptica iguais ou superiores a 0.08 foram consideradas positivas para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp., enquanto valores iguais ou superiores a 0.15, foram considerados positivos para *E. histolytica/dispar*, segundo indicações do fabricante. Os testes foram replicados para todas as amostras com o uso de um segundo kit para cada protozoário. As amostras que foram diagnosticadas como positivas para a presença de *G. duodenalis* no ensaio imunoenzimático foram posteriormente analisadas por microscopia óptica e diagnóstico molecular, com a finalidade de comparar as diferentes técnicas de detecção. O diagnóstico molecular seria capaz de genotipar o isolado, identificando por ventura algum com caráter zoonótico, o que as demais técnicas não seriam hábeis em apontar.

3.5.2. Diagnóstico microscópico

Sedimento do coprólito experimental foi usado para montar lâminas que foram coradas com lugol e observadas em microscópio óptico em aumento de 100X e 400X, com a finalidade maior de identificar alterações na estrutura dos cistos e se ainda assim estes seriam identificáveis. Sedimento de cada amostra arqueológica positiva para a presença de *G. duodenalis* no ensaio imunoenzimático foi analisado pela leitura microscópica de 4 lâminas por cada amostra. Eventualmente algumas estruturas observadas com tamanho ou morfologia compatível aos cistos de *G. duodenalis* atuais foram fotografadas e medidas.

3.5.3. Diagnóstico molecular

3.5.3.1. Padronização das condições de diagnóstico em material fecal moderno

Amostras.

As análises de DNA foram realizadas nos laboratórios de Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal Fluminense. A extração de DNA da amostra fecal de felino foi realizada usando o kit comercial QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) com algumas modificações padronizadas por Adamska *et al.*¹⁷⁸ e por Leles *et al.*¹⁷⁹ para extração de DNA de parasitos com estruturas resistentes, como cistos de *Giardia* spp. e ovos de *Ascaris* spp., respectivamente.

Na padronização das condições de cada PCR foram usadas: a) uma diluição 1:10 de uma amostra já extraída de trofozoítas de *G. duodenalis* da cepa de cultivo WB (AACB00000000.2); b) uma amostra fecal de humano e outra de felino, diagnosticadas como positivas para cistos de *G. duodenalis* pela microscopia óptica e c) água ultrapura autoclavada como controle negativo da reação.

Desenho dos alvos.

Os alvos para *G. duodenalis* foram desenhados a partir da sequência do genoma completo do parasito, depositada no GenBank. Para o gene conservado B-giardina, foi desenhado um par de alvos para obter um fragmento de 324 pb; um segundo par de alvos incluído dentro do fragmento anterior foi desenhado para maximizar a especificidade da região desejada. Como o gene B-giardina é de cópia única, e como o material antigo encontra-se altamente fragmentado, foram desenhados alvos para obter um fragmento de 214 pb do gene *gdh*, presente em múltiplas cópias. Foram usadas bases nucleotídicas degeneradas em ambos os genes-alvos com o objetivo de detectar os dois grandes grupos de genótipos zoonóticos A e B, e alguns genótipos animais (quadro 3).

Quadro 3

Descrição dos oligonucleotídeos usados neste estudo

	Nome	Sequência	Região	Tamanho produto (pb)	Organismo	Referências
Hospedeiro humano	Bg1arF1/ Bg1arR1	5'-TGAACCAGCGCGTCAGCAGG-3'	B-giardina*	324	<i>Giardia duodenalis</i>	Este estudo
		5'-GGCGTTCGTTTGGATGGCGA-3'				
	Bg1arR2	5'-GCCTGGCGCTTCCTCGACTC-3'		147		
	GdhF1/ GdhR1_H	5'-CTTCCGYGTBCCMTGGATGG-3'	Gdh	214	<i>Homo sapiens</i>	Leles ¹⁸²
		5'-RAAGTCGGAGCCGCCCTTTC-3'				
	L16234/ H16422	5'-CACATCAACTGCAACTCCAA-3'	HVS1	188		
		5'-ATTGATTTACGGAGGATGG-3'				
Hospedeiro não humano	GdhF1/ GdhR1_A	5'-CTTCCGYGTBCCMTGGATGG-3'	Gdh	214	<i>Giardia duodenalis</i>	Este estudo
		5'-RAAGTCRGAGCCGCCCTTTC-3'				
	DTcytbF/ DTcytbR	5'-TTGACCTCCCAGCACCATCT-3'	Citocromo b	210	<i>Cerdocyon thous</i>	
		5'-TGGAGGCACCATTTGCATGT-3'				
	KRcytbF/ KRcytbR	5'-TCCCTTCGTCATCGCAGCCCT-3'		205	<i>Kerodon rupestris</i>	
		5'-TGGGTCACCGAGGAGGTTCGG-3'				
	PCcytbF/ PCcytbR	5'-TGCAATCCTCCGATCCATCCCCA-3'		204	<i>Puma concolor</i>	
		5'-GGATGTTCTACGGGTTGGCCGC-3'				

* também detecta alguns genótipos animais.

Para confirmar a presença de inibidores nas amostras, assim como a origem do material arqueológico, alvos para os diferentes hospedeiros foram testados previamente à realização da PCR para *Giardia* sp. Para as amostras humanas foram usados primers já descritos na literatura (quadro 3), na tentativa de identificar amostras possivelmente inibidas, e para as amostras identificadas pela morfometria como pertencentes a espécies de animais, diferentes alvos foram desenhados para detectar a presença do gene citocromo b. Como estas últimas provêm do Piauí, os alvos foram desenhados considerando espécies endêmicas da área. No caso dos felídeos, os alvos foram desenhados para identificar a espécie *Puma concolor* (onça), amplamente distribuída no Novo Mundo; para os canídeos, foram desenhados alvos para identificar a espécie *Cerdocyon thous* (cachorro do mato), espécie endêmica ao norte da América do Sul; e finalmente, para os roedores desenharam-se alvos para a espécie nativa do nordeste brasileiro, *Kerodon rupestris* (mocó) (quadro 3). Todos os alvos foram desenhados usando o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Amplificação de genes específicos para *G. duodenalis* a partir de DNA moderno.

Foram testadas duas condições diferentes de $MgCl_2$ (2,5 mM e 3,0 mM) para os alvos B-giardina e gdh, usando as amostras modernas já citadas. Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L, usando os alvos e as condições listadas nos quadros 3 e 4, respectivamente. Para cada uma das reações de PCR foram testadas três diferentes temperaturas de hibridização de oligonucleotídeos (58°C, 60°C, 63°C) para o gene B-giardina, e seis (58°C a 63°C) para o gene gdh. Após a eletroforese e visualização do gel, ficou definida a melhor condição para o ensaio. Os produtos da PCR obtidos para o alvo B-giardina foram logo submetidos à reação de nested-PCR nas duas concentrações de magnésio para todas as temperaturas. A quantidade de DNA usada na padronização foi determinada segundo trabalhos prévios¹⁸⁰.

Quadro 4

Padronização das condições de PCR e nested-PCR para os genes-alvo usados neste estudo

Gene alvo	Quantidade de DNA ou template	Reagentes (Invitrogen) (volume final de 25 µL)	Ciclagem	Alvos	Tamanho esperado do produto
B-giardina	PCR primária: 3 µL/ 5 µL*	1. 2 unidades de Taq polimerase 2. Tampão 1x 3. 0.2 mM cada dNTP 4. 3 mM de magnésio 5. 0.2 µM de cada alvo 6. Água Milli-Q autoclavada até completar 25 µL (considerando volume do template)	94°Cx5min, 94°Cx30seg, 59°Cx30seg, 72°Cx30seg, 72°Cx7min Nº de ciclos: 45	BgiarF1/BgiarR1	324 pb
	nested PCR: 1 µL/ 2 µL*		94°Cx5min, 94°Cx30seg, 61°Cx30seg, 72°Cx30seg, 72°Cx7min Nº de ciclos: 35	BgiarF1/BgiarR2	147 pb
Gdh	1 µL/ 3 µL*		94°Cx5min, 94°Cx30seg, 59°Cx30seg, 72°Cx30seg, 72°Cx7min Nº de ciclos: 45	gdhF1/gdhR1_H gdhF1/gdhR1_A	214 pb
Citocromo b	3 µL/ 5 µL*		94°Cx5min, 94°Cx20seg, 55°Cx20seg, 72°Cx20seg, 72°Cx7min Nº de ciclos: 35	DTcytbF1/DTcytbR1	210 pb
			94°Cx5min, 94°Cx20seg, 60°Cx20seg, 72°Cx20seg, 72°Cx7min Nº de ciclos: 35	PCcytbF1/PCcytbR1	204 pb
				KRcytbF1/KRcytbR1	205 pb
HVS1	2 µL* + 1 µL [#] amplicon		94°Cx5min, 94°Cx20seg, 55°Cx20seg, 72°Cx30seg, 72°Cx7min Nº de ciclos: 45	L16234/ H16422	188 pb

* quantidade de DNA usada para amostras antigas; [#] adicionado nas amostras não humanas para testar inibição.

Logo após, 8 µL de cada produto obtido foram levados à eletroforese em gel de agarose a 2,5% (75V por 60 minutos seguidos de 70V por 20 minutos) e corados com brometo de etídio (5 µg/mL) por 10 minutos. Os produtos da PCR foram purificados usando colunas de sílica (GE Healthcare), quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific Inc) e sequenciados. Cada amostra foi sequenciada em ambas as fitas, usando para cada reação de sequenciamento 6,5 µL de DNA purificado e 1 µL do alvo na concentração de 50 ng/µL. O sequenciamento foi realizado na plataforma da FIOCRUZ e SeqUFF da Universidade Federal Fluminense utilizando o sequenciador automático Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Amplificação de genes específicos para espécies não humanas a partir de DNA moderno.

Apenas os alvos para canídeos e felídeos foram testados para fezes frescas de cão e gato doméstico respectivamente, usando alvos e condições indicadas nos quadros 3 e 4.

Análise das sequências e alinhamentos.

A qualidade dos cromatogramas foi analisada usando o programa Chromas Lite versão 2.1 (Technelysium Pty Ltd 2007). As sequências obtidas foram editadas e comparadas às depositadas no GenBank através da ferramenta BlastSearch¹⁸¹, disponível no Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI).

3.5.3.2. Coprólito experimental

O coprólito experimental foi processado nos laboratórios usados para trabalho com DNA moderno. Foram realizadas amplificações para os genes específicos de *G. duodenalis* e para o gene citocromo b de felino, uma vez que o coprólito experimental foi feito a partir de fezes de um gato doméstico, usando alvos e condições listadas nos quadros 3 e 4. Além disso, foi realizada uma reação de PCR prévia a PCR convencional sem incluir os oligonucleotídeos¹⁸³, com o objetivo de comparar a qualidade da recuperação do DNA, usando DNA direto do coprólito experimental versus o uso do template da PCR reconstrutiva. Os produtos das amplificações foram posteriormente comparados com aqueles obtidos para DNA moderno e antigo.

3.5.3.3. DNA antigo

Crítérios de autenticidade.

Vários critérios de autenticidade têm sido propostos para a pesquisa em DNA antigo¹⁶⁶. Neste estudo foram usadas as seguintes precauções: a) *seleção das amostras*: quando possível, as amostras foram retiradas do interior de fragmentos desprendidos mecânicamente dos coprólitos na tentativa de evitar contaminantes exteriores; b) *extração e controles*: múltiplos brancos de extração, contendo água destilada, e controles negativos de PCR foram processados junto com as amostras para verificar alguma eventual contaminação com DNA moderno ou contaminação cruzada entre as amostras arqueológicas processadas; c) *reagentes e equipamento de uma via*: foi garantido o isolamento físico do laboratório de extração e do laboratório de preparo da PCR. Todos os reagentes e equipamentos utilizados naquela etapa foram usados unicamente naquele procedimento. Adicionalmente os resultados positivos serão replicados em outro laboratório.

Extração de DNA antigo.

As extrações de DNA antigo foram realizadas em um laboratório fisicamente separado dos laboratórios para trabalho com DNA moderno, usando o kit comercial QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) com algumas modificações padronizadas por Adamska *et al.*¹⁷⁸, para extração de DNA de cistos de *G. duodenalis* e por Leles *et al.*¹⁸⁴, para extração de DNA de material antigo.

Inicialmente, ~200 µL de cada amostra positiva no teste ELISA foram submetidos a um tratamento físico de 3 ciclos de ferve-congela (fervura a ~98°C por 3 minutos, seguida por congelamento em nitrogênio líquido por 3 minutos) para promover o rompimento da parede do cisto. As amostras foram extraídas em grupos de cinco incluindo sempre um branco de extração. Após extração, todas as amostras foram eluídas em 50 µL de tampão AE (fornecido pelo fabricante), purificadas usando-se o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e congeladas.

Amplificações de genes específicos a partir de material antigo – Teste de inibição.

Assim como acontece com vários fósseis, os coprólitos contêm fortes inibidores com peso molecular, tamanho e cargas similares ao DNA. Inibidores da PCR são geralmente co-extraídos com DNA antigo, já que as amostras têm sido expostas a contaminantes ambientais por milhares de anos. Sendo assim, a inibição da PCR pelas amostras arqueológicas humanas foi testada mediante a amplificação de um fragmento pequeno do gene HVS1 e nas amostras arqueológicas de origem não humana foram testados alvos das espécies respectivas (quadros 3 e 4). A agrupação taxonômica dos coprólitos foi determinada no contexto de pesquisas prévias a partir da morfometria do coprólito¹⁸⁵. Adicionalmente, para as amostras identificadas previamente como de origem humana, para afastar possibilidades de erro optou-se por adicionar um amplicon humano no intuito de amplificar o gene HVS1.

Amplificações de genes específicos a partir de material antigo – Teste de contaminação.

O DNA antigo encontra-se geralmente muito degradado, assim quando o tamanho do amplicon é maior do que 300 pb¹⁸⁶, é considerado um indicador de amplificação preferencial de fragmentos extensos e intactos de DNA moderno. Para descartar contaminação com DNA parasitário moderno durante a extração, todos os brancos foram testados para amplificar um fragmento de 511 pb do gene B-giardina (GiarF, 5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'; GiarR, 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'), usando as condições citadas em Lalle *et al.*¹⁸⁷.

Amplificação de genes específicos de *G. duodenalis* a partir de material antigo.

No intuito de reconstruir em parte o DNA fragmentado, foi realizada uma reação de PCR prévia a PCR convencional sem incluir os oligonucleotídeos¹⁸³. A mesma foi feita nas seguintes condições: 1U de Platinum Taq, 2.5 µL tampão 10x, 0.2 µL de 25 mM dNTP, 1.5 µL de MgCl₂ (Invitrogen) em um volume final de 25 µL. A ciclagem usada foi de 94°C por 2 min, 20 ciclos de 94°C por 4 seg, 50°C por 4 seg e 72°C por 40 seg, sem uso da extensão final. O template da PCR reconstrutiva foi usado posteriormente nas amplificações de PCR no material antigo para os alvos B-giardina e *gdh*, usando os alvos e as condições listadas nos quadros 3 e 4 respectivamente. Contudo, também se

realizou PCR convencional, utilizando-se como *template* diretamente o DNA, conforme condições já mencionadas previamente, na tentativa de averiguar em quais das PCRs obter-se-ia melhor rendimento, com ou sem o uso da PCR reconstitutiva.

Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados como já descrito para DNA moderno. Da mesma forma, as sequências foram analisadas usando os programas já mencionados.

4. RESULTADOS

4.1. Revisão sistemática de literatura

Quarenta e oito publicações relacionadas ao estudo de protozoários em material antigo foram recuperadas das bases de dados eletrônicas, de 1954 a 2012. Pôde se observar com este levantamento bibliográfico que a maioria dos estudos se concentra em protozoários sistêmicos, como aqueles que causam doença de Chagas, leishmanioses e malária, em detrimento dos protozoários intestinais. Ressalta-se a inexistência de trabalhos de biologia molecular com protozoários intestinais (quadro 5). Para maiores detalhes ver o artigo completo (anexo).

Quadro 5

Resumo dos achados de protozoários em material antigo de origem humana

Protozoário	Origem (sítio arqueológico)	Período	Métodos	Resultados (positivas/ total analisadas)	Referências
<i>Giardia duodenalis</i>	Nahal-Mishmar (Israel)	160 AD	Microscopia	NI/2	Witenberg ¹³⁵
	Big Bone Cave, Tennessee (Estados Unidos)	2177±145 AP	IFI	NI/8	Faulkner <i>et al.</i> ¹⁵⁸
	Múmias pré-colombianas (Andes)	3000-500 AP	IFI	7/20	Allison <i>et al.</i> ¹⁵³
			ELISA	2/7	
	Antelope House, Arizona (Estados Unidos)	1200-1300 AD	ELISA	3/83	Gonçalves <i>et al.</i> ¹⁵⁴
	Lübeck (Alemanha)	1500-1600 AD			
	Namur (Bélgica)	Século XVIII AD			
	Los Gavilanes (Peru)	2375-1525 AC	IFI	1/18	Ortega & Bonavia ¹⁸⁸
	Manache (Peru)	500-900 AD		1/2	
	Chevennez (Suíça)	Séculos VII-IX AD	ELISA	5/5	Le Bailly ¹⁸⁹
	La Mothe (França)	Séculos X-XI AD	ELISA, IFI	1/9	Le Bailly <i>et al.</i> ¹⁵⁷
<i>Entamoeba</i> spp.	Acre (Israel)	Século XIII AD	ELISA	1/8	Mitchell <i>et al.</i> ¹⁹⁰
	El Plomo (Chile)	Pré-colombiano	Microscopia	1/1	Pizzi & Schenone ¹³⁴
	Nahal-Mishmar (Israel)	160 AD	Microscopia	NI/2	Witenberg ¹³⁵
	Huari (Peru)	Pré-colombiano	Microscopia; ELISA	2/7; 0/3	Fouant <i>et al.</i> ¹³⁶
	Alto Ramírez (Chile)			2/11; 0/9	
	Atacama (Chile)			3/26; 0/21	
	Cabuza (Chile)			3/29; 0/20	
	Tiwanaco (Chile)			1/5; 0/5	

AD: anno Domini; NI: não informado; AP: antes do presente; IFI: imunofluorescência indireta; ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática;

AC: antes de Cristo.

Quadro 5
(continuação)

Protozoário	Origem (sítio arqueológico)	Período	Métodos	Resultados (positivas/ total analisadas)	Referências
<i>Entamoeba</i> spp.	Fortin Minana (Argentina)	Século XIX AD	ELISA	9/11	Gonçalves <i>et al.</i> ¹⁵⁴
	Namur (Bélgica)	Séculos XIV-XVIII AD		2/12	
	Castillon-du-Gard (França)	Século III AD		2/14	
	Gresine (França)	2500 AP		1/5	
	Arbon (Suíça)	5300 AP		3/5	
	Canyon De Chelly (Estados Unidos)	800-700 AP		3/17	
	Hornstaad-Hörnle I, Stockwiesen, Torwiesen II, Taschenwiese, Gründwiesen (Alemanha)	3900-2500 AC	ELISA	0/30	Le Bailly & Bouchet ¹⁵⁶
	Arbon-Bleiche 3, Chevenez (Suíça)	3400 BC-século IX AD		5/11	
	Chalain, Lattes, Pineuilh, Épinal (França)	3200 BC-século XVII AD		4/23	
	Vilnius (Lituânia)	Século XIX AD		0/6	
	Kouphovouno (Grécia)	5000-2000 AC		5/5	
	Alexandria, Saqqarah (Egito)	715 BC-século VII AD		0/11	
	Sai (Núbia)	275 BC-350 AD		0/3	
	Shillourokambos (Chipre)	7500-7000 AC		0/3	
	Qumram (Israel)	100 AC		0/2	
	Meadowlark (Estados Unidos)	Século XIX AD	ELISA	3/5	Le Bailly & Bouchet ¹⁵⁶ ; Le Bailly <i>et al.</i> ¹⁹¹
	Acre (Israel)	Século XIII AD	ELISA	6/8	Mitchell <i>et al.</i> ¹⁹⁰

AD: anno Domini; NI: não informado; AP: antes do presente; IFI: imunofluorescência indireta; ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática;

AC: antes de Cristo.

Quadro 5
(continuação)

Protozoário	Origem (sítio arqueológico)	Período	Métodos	Resultados (positivas/ total analisadas)	Referências
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Andes (Chile-Peru)	3000-500 AP	ELISA	8/15	Allison <i>et al.</i> ¹⁵³
	PV35-4 (Peru)	770-830 AD	IFI	1/2	Ortega & Bonavia ¹⁸⁸
	Acre (Israel)	Século XIII AD	ELISA	0/8	Mitchell <i>et al.</i> ¹⁹⁰
	La Mothe (França)	Séculos X-XI AD	IFI	0/9	Le Bailly <i>et al.</i> ¹⁵⁷
<i>Chilomastix mesnili</i>	Nahal-Mishmar (Israel)	160 AD	Microscopia	NI/2	Witenberg ¹³⁵
<i>Isospora belli</i>	Andes (Chile-Peru)	3000-500 AP	IFI	16/20	Allison <i>et al.</i> ¹⁵³
<i>Cyclospora cayetanensis</i>				2/20	
<i>Sarcocystis hominis</i>				1/20	

AD: anno Domini; NI: não informado; AP: antes do presente; IFI: imunofluorescência indireta; ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática;

AC: antes de Cristo.

4.2. Detecção imunoenzimática de protozoários em coprólitos e material antigo

Os valores de densidade óptica obtidos usando sedimento e sobrenadante não apresentaram diferenças significativas (tabela 3), porém, considerando o relato de sedimentação de oocistos não viáveis em fezes após centrifugação¹⁹², foi usado o sedimento no teste das amostras arqueológicas. No caso de *Cryptosporidium* sp., o ensaio imunoenzimático não detectou positividade para o protozoário, apesar da amostra ter sido diagnosticada como positiva pela microscopia óptica.

Tabela 3
Teste de detecção parasitária em sedimento e sobrenadante
pelo ensaio imunoenzimático

Protozoários	Valores DO ^a		<i>t</i> ^b
	Sedimento	Sobrenadante	
<i>G. duodenalis</i>	0.103	0.095	0.057
<i>Cryptosporidium</i> sp.	0.0059	0.0036	0.454

^aDO>0.08 indica positividade para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp.; ^b *P* valor<0.05

Ao comparar os valores de densidade óptica para o material fecal e os coprólitos experimentais (tabela 4), não se observou uma diminuição significativa na intensidade do sinal nos últimos. No caso de *E. histolytica/dispar*, o ensaio imunoenzimático não detectou positividade para o protozoário, apesar da amostra ter sido diagnosticada como positiva pela microscopia óptica.

Tabela 4
Valores de densidade óptica (DO) para material fecal e coprólitos experimentais.

Protozoários	Valores DO ^a		<i>t</i> ^b
	Material fecal	Coprólitos experimentais	
<i>G. duodenalis</i>	1.76	0.986	0.383
<i>Cryptosporidium</i> sp.	0.989	0.338	0.623
<i>E. histolytica/dispar</i>	0.016	0.005	0.688

^aDO>0.08 indica positividade para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp., DO>0.15 indica positividade para *E. histolytica/dispar*; ^b *P* valor<0.05

Um total de 29 amostras (41,42%) foram positivas para o antígeno de *G. duodenalis*, 18 (25,71%) para *Cryptosporidium* spp. e 3 (4,28%) para *E. histolytica/dispar* (tabela 5). A leitura visual foi concordante com a espectrofotometria em todas as amostras. A descrição dos achados segundo sítios arqueológicos encontra-se no quadro 6.

Tabela 5

Detecção de protozoários pelo ELISA em coprólitos e sedimento

Protozoários	Amostras arqueológicas				Total N= 70
	Humanos N= 47	Roedores N= 12	Carnívoros N= 4	Sedimento N= 7	
<i>G. duodenalis</i>	14	7	4	4	29
<i>Cryptosporidium</i> sp.	9	4	1	4	18
<i>E. histolytica/dispar</i>	0	0	0	3	3

Quadro 6

Detecção de protozoários por ELISA em coprólitos e sedimento segundo sítios arqueológicos

Sítio arqueológico	Nº amostras positivas				
	Humanos	Roedores	Felídeos	Canídeos	Sedimento
Gruta do Gentio II	2 Gd, 1 coinfeção Gd-Cs (amostra 29)	-	-	-	-
Boqueirão da Pedra Furada	3 Gd, 1 coinfeção Gd-Cs (amostra 1882)	1 Gd, 1 Cs, 1 coinfeção Gd-Cs (amostra 359)	-	-	-
Sítio do Meio	-	1 Cs	1 Gd	-	-
Sítio Fonseca	-	-	-	-	1 coinfeção Gd-Cs (amostra 1474), 3 coinfecções Gd-Cs-Ehd (amostras 1476,1477 e 1478)
Furna do Estrago	1 coinfeção Gd-Cs (amostra 729a)	-	-	-	-
Toca dos Coqueiros	-	-	1 Gd	1 Gd	-
Toca da Baixa dos Caboclos	1 coinfeção Gd-Cs (amostra 1172C)	3Gd	-	-	-
Sítio Antônio	-	1 Gd	-	-	-
Toca da Cima dos Pilões	-	-	-	-	-
Toca da Extrema II	-	1 coinfeção Gd-Cs (amostra 1580)	-	-	-
Toca do Morcego	-	-	1 Gd	-	-
SP Atacama	1 Gd, 2 coinfeção Gd-Cs (amostras M09 3 M17)	-	-	-	-
Caserones-Tarapaca 40	1 coinfeção Gd-Cs (amostra 643)	-	-	-	-
Huayuri	1 Cs, 1 coinfeção Gd-Cs (amostra 676)	-	-	-	-
Vale do rio Chillón	1 Cs	-	-	-	-

Gd: *G. duodenalis*; Cs: *Cryptosporidium* spp.; Ehd: *E. histolytica/dispar*; -: amostra negativa.

4.3. Avaliação do diagnóstico microscópico para a detecção de *Giardia* em material antigo

O exame microscópico foi negativo para *G. duodenalis* nas amostras arqueológicas. Porém, algumas estruturas observadas preservaram membrana característica e tamanho sugestivo de *Giardia* sp. (10 μ M x 7.5 μ M), mas apresentaram alterações na morfologia interna que impediram a identificação de estruturas parasitárias características (fig. 5A-B). As fezes usadas para o coprólito experimental tinham abundantes cistos de *G. duodenalis* antes de ser dessecadas, porém após dessecação e reidratação, cistos identificáveis foram escassos e apresentavam morfologia alterada (fig. 5C).

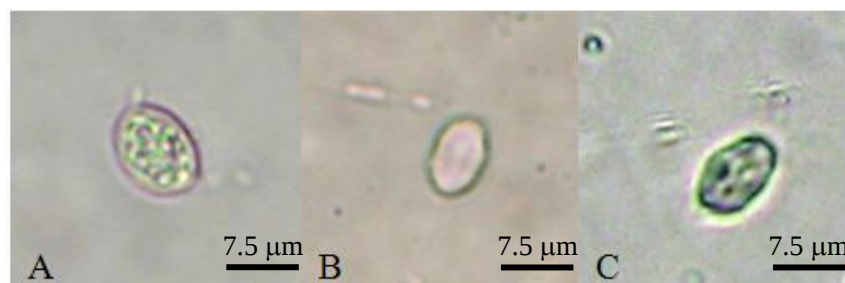


Fig. 5. Estruturas compatíveis com *Giardia* sp. observadas em material arqueológico e experimental. A: estrutura recuperada de coprólito humano (Gruta do Gentio II); B: estrutura recuperada de coprólito de canídeo (Toca dos Coqueiros); C: cisto de *G. duodenalis* identificado no coprólito experimental através da técnica de sedimentação espontânea.

4.4. Diagnóstico molecular

4.4.1. Padronização das condições de amplificação para alvos específicos em material moderno.

Padronização da PCR primária e nested PCR para o gene alvo B-giardina.

A partir da visualização dos produtos amplificados, foi possível determinar aproximadamente as melhores condições para a reação da PCR primária (fig. 6). Enquanto as amplificações obtidas para a amostra de trofozoita foram nítidas e únicas na altura esperada, as amplificações correspondentes para a amostra de fezes apresentaram bandas difusas e de baixa especificidade. O uso de 3 mM de $MgCl_2$ favoreceu o aparecimento de amplificações na altura esperada para a amostra de fezes e, a pesar de observar maior intensidade destas

com o aumento da temperatura, foi selecionada uma temperatura (59°C) para usar na PCR primária, com a finalidade de torná-la mais permissiva para amplificação do material antigo e posteriormente poder aumentá-la na nested PCR.

As amplificações para a nested PCR (fig. 7) apresentaram maior especificidade ao usar uma concentração menor de magnésio, porém, como a intensidade da amplificação foi baixa, escolheu-se uma concentração maior de magnésio a temperatura intermediária (61°C) para o trabalho com DNA antigo. Ao repetir as amplificações para fezes de felino e trofozoítas usando as condições escolhidas tanto para a PCR primária quanto para a nested, observou-se um perfil diferente ao obtido para a padronização, exibindo amplificações únicas e intensas para a PCR primária e nested PCR (fig. 8).

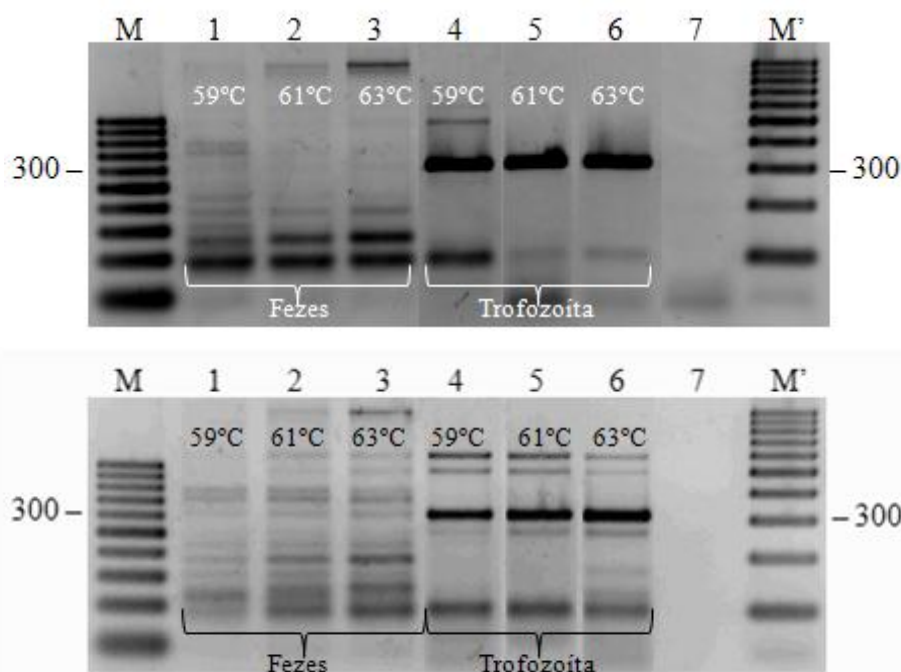


Fig. 6. Padronização da PCR para o gene B-giardina, usando 3 temperaturas de anelamento (59°C, 61°C e 63°C) e duas condições de mangnésio (2 mM MgCl₂, figura superior e 3 mM MgCl₂, figura inferior). M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. 1-3: DNA extraído de material fecal de humano positivo para *G. duodenalis* (3 µL); 4-6: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 7: controle negativo. Tamanho esperado do produto: 324 pb.

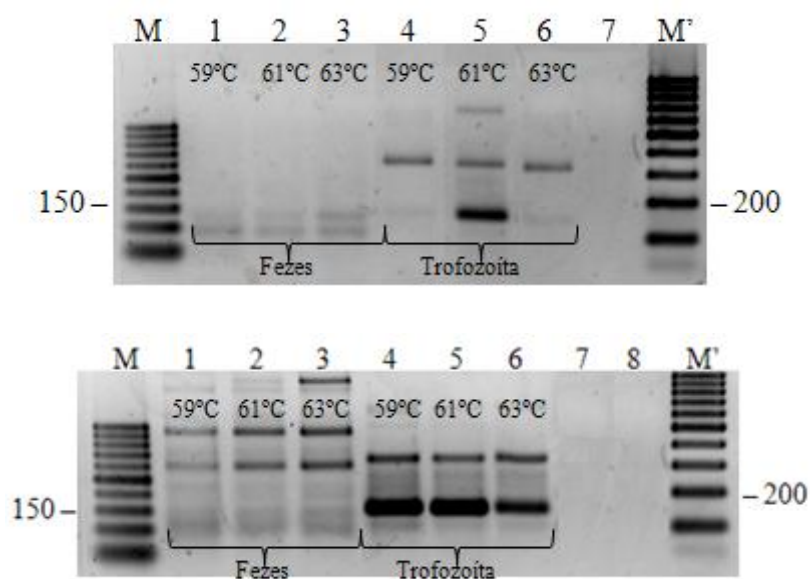


Fig. 7. Padronização da nested PCR para o gene B-giardina, usando 3 temperaturas de anelamento (59°C, 61°C e 63°C) e duas condições de magnésio (2 mM MgCl₂, figura superior e 3 mM MgCl₂, figura inferior). M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. 1-3: DNA extraído de material fecal de humano positivo para *G. duodenalis* (2 µL); 4-6: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 7: controle negativo da PCR primária; 8: controle negativo da nested PCR. Tamanho esperado do produto: 147 pb.

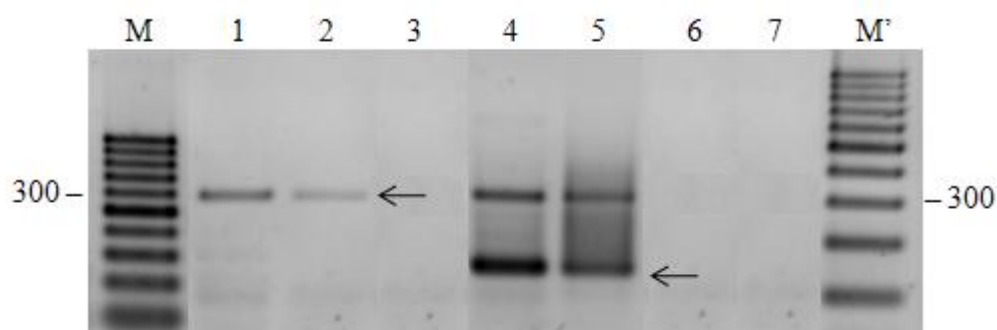


Fig. 8. Amplificação do gene B-giardina segundo as condições escolhidas para a PCR primária (1-3) e nested PCR (4-7). M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. 1 e 4: DNA extraído de material fecal de felino positivo para *G. duodenalis* (3 µL); 2 e 5: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 3 e 6: controles negativos da PCR primária; 7: controle negativo da nested PCR. Tamanho esperado do produto para PCR primária e nested PCR (indicado por uma seta): 324 pb e 147 pb, respectivamente.

Padronização da PCR para o gene alvo *gdh*.

A figura 9 ilustra a padronização da PCR para a amplificação do gene alvo *gdh* em humanos usando como *template* a diluição de material com DNA de trofozoíta. Obtiveram-se amplificações únicas na altura esperada, exibindo maior intensidade ao aumentar a concentração de magnésio na reação. Para a detecção do gene de *Giardia* sp. em fezes foi selecionada uma temperatura de 59°C e uma concentração de 3 mM MgCl₂. A amplificação do *gdh* para humanos e animais foi posteriormente testada em fezes (fig. 10), obtendo para ambos amplificações únicas na altura esperada. Observaram-se amplificações inespecíficas na amostra de trofozoíta ao serem usados os alvos do gene para animais, em concordância com a origem humana do trofozoíta.

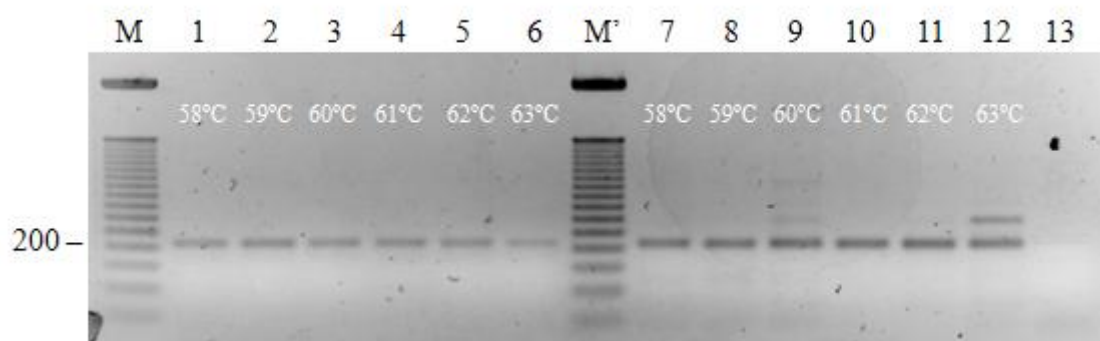


Fig. 9. Padronização da PCR para o gene *gdh* em humanos (1 µL DNA trofozoíta de *G. duodenalis*), usando seis temperaturas de anelamento (58°C a 63°C) e duas condições de magnésio (1-6: 2 mM MgCl₂; 7-12: 3 mM MgCl₂; 13: controle negativo). M-M': marcadores de peso molecular 50 pb.

Tamanho esperado do produto: 214 pb.

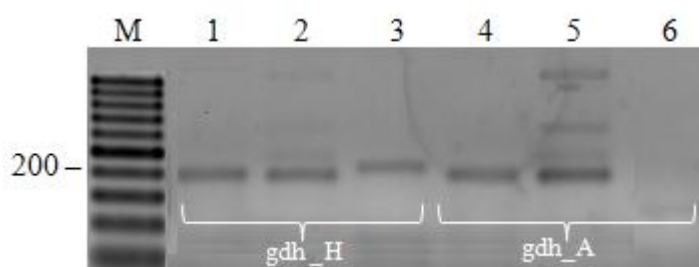


Fig. 10. Amplificação do gene *gdh* segundo as condições escolhidas para o gene em humanos (1 e 3) e animais (4 e 6). M: marcador de peso molecular 50 pb; 1 e 4: DNA extraído de material fecal de felino positivo para *G. duodenalis* (3 µL); 2 e 5: DNA de trofozoíta (1 µL DNA); 3-6: controles negativos.

Tamanho esperado do produto: 214 pb.

Padronização do gene alvo citocromo b em amostras animais modernas.

Obtiveram-se amplificações na altura esperada para o gene citocromo b em material fecal de gato doméstico e de cachorro (fig. 11).

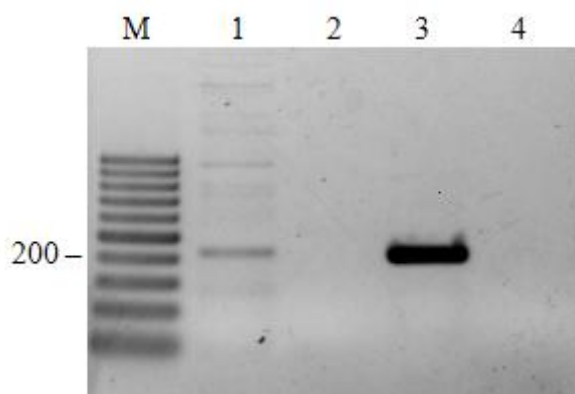


Fig. 11. Amplificação do gene citocromo b em fezes modernas. 1: DNA extraído de fezes de cachorro (3 μ L); 3: DNA extraído de fezes de gato doméstico (3 μ L); 2 e 4: controles negativos. M: marcador de peso molecular 50 pb. Tamanho esperado do produto: 210 e 204 pb respectivamente.

Sequenciamento.

O sequenciamento dos produtos obtidos identificou a presença de *G. duodenalis* para a trofozoíta e as fezes de felino. A primeira confirmou-se como genótipo A, enquanto as segundas como genótipo F. A origem taxonômica dos animais foi confirmada em ambos casos.

4.4.2. Amplificação para alvos específicos no coprólito experimental

Quando testados usando DNA do coprólito experimental, os alvos para o gene B-giardina na PCR primária amplificaram na altura esperada. Usando as condições padronizadas, não foi possível amplificar o fragmento esperado para a nested PCR, devido a um excesso de DNA, inclusive quando em testes posteriores foi usado 1 μ L do template e 3 μ L na PCR primária. Obtiveram-se amplificações na altura esperada para o gene *gdh* de humanos e animais, porém, dado que o coprólito experimental foi preparado usando fezes de felino, a amplificação para o gene *gdh* de animais foi mais específica (fig. 12). Os mesmos alvos foram amplificados usando o template da PCR reconstitutiva do coprólito experimental, obtendo-se amplificações mais específicas para todos os casos (fig. 13). Portanto, as

amplificações posteriores em material arqueológico foram realizadas usando o template da PCR reconstitutiva.

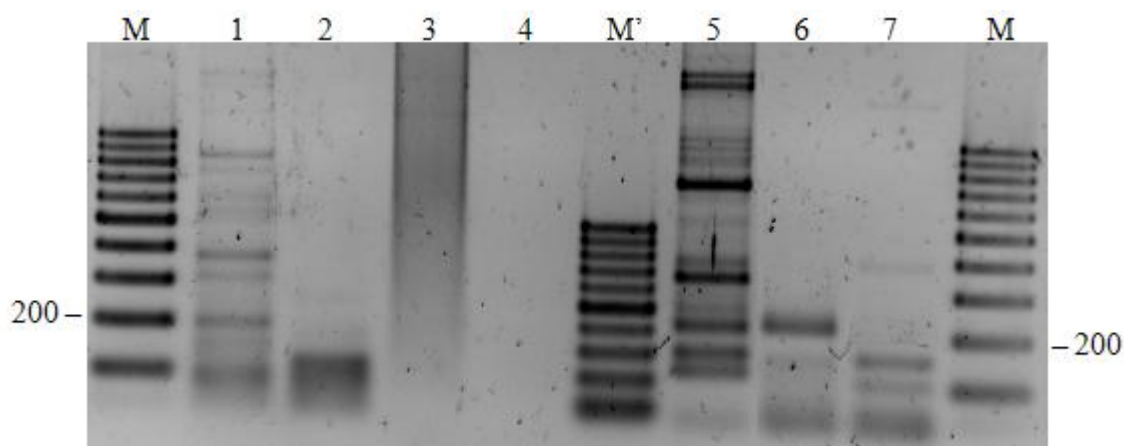


Fig. 12. Amplificação para os alvos específicos de *G. duodenalis* usando DNA do coprólito experimental. 1: B-giardina, 5 μ L (tamanho esperado de 324 pb); 3: nested B-giardina, 2 μ L (tamanho esperado de 147 pb); 5-6: gdh em humanos e animais, 5 μ L (tamanho esperado de 214 pb); 2, 4 e 7: controles negativos. M: low DNA mass de 100 pb.

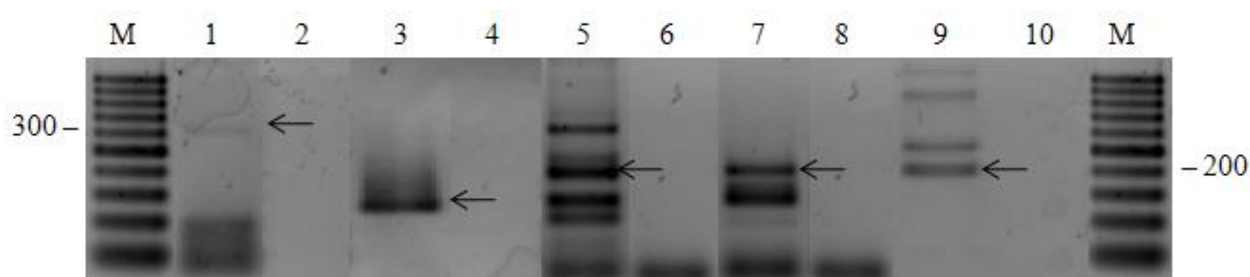


Fig. 13. Amplificação para os alvos específicos de *G. duodenalis* e citocromo b do felino usando o template da PCR reconstitutiva. 1: B-giardina (5 μ L); 3: nested B-giardina (1 μ L); 5: gdh em humanos (5 μ L); 7: gdh em animais (5 μ L); 9: citocromo b (5 μ L); 2, 4, 6, 8, 10: controles negativos. M: marcador de peso molecular 50 pb. Tamanhos esperados (indicados por setas): 324 pb para o B-giardina; 214 pb para a nested B-giardina; 210 pb para o gdh em humanos e animais; 204 pb para o citocromo b no felino.

4.4.3. Amplificação para alvos específicos em material antigo

Apenas uma das 29 amostras testadas apresentou inibidores da PCR, mesmo após segunda purificação. No caso do teste de contaminação, ao tentar amplificar um fragmento maior do gene B-giardina, não se obtiveram amplificações nas amostras arqueológicas nem nos brancos de extração, descartando a presença de DNA moderno do parasito nas amostras.

Amplificação do gene alvo B-giardina em material antigo.

Das 29 amostras arqueológicas consideradas positivas pelo diagnóstico imunoenzimático, 3 tiveram amplificação na altura esperada para o gene alvo B-giardina na PCR primária (fig. 14) e 6 na nested PCR (fig 15).

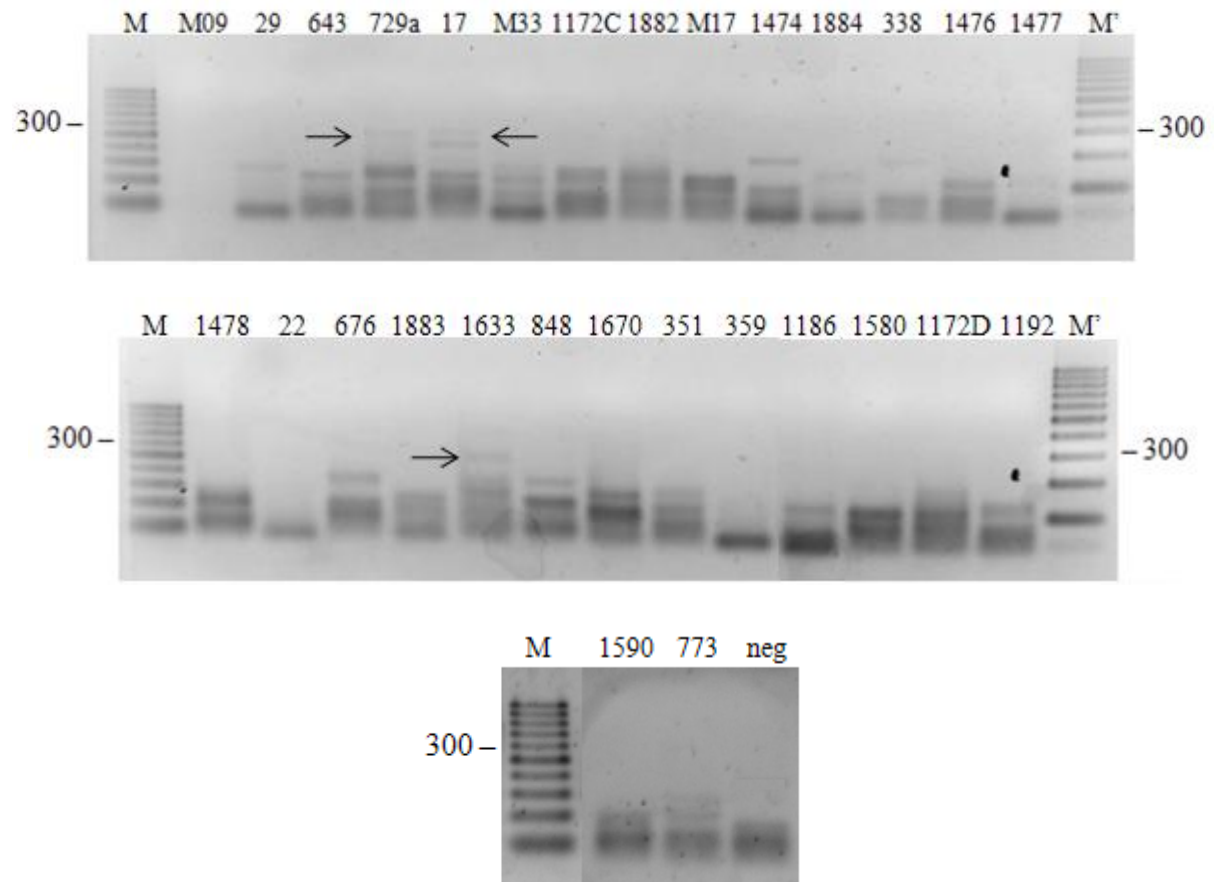


Fig. 14. Amplificação para o gene B-giardina (PCR primária) em amostras arqueológicas humanas positivas para *G. duodenalis* pelo ELISA (5 µL). Neg: controle negativo. M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto (indicado por uma seta): 324 pb.

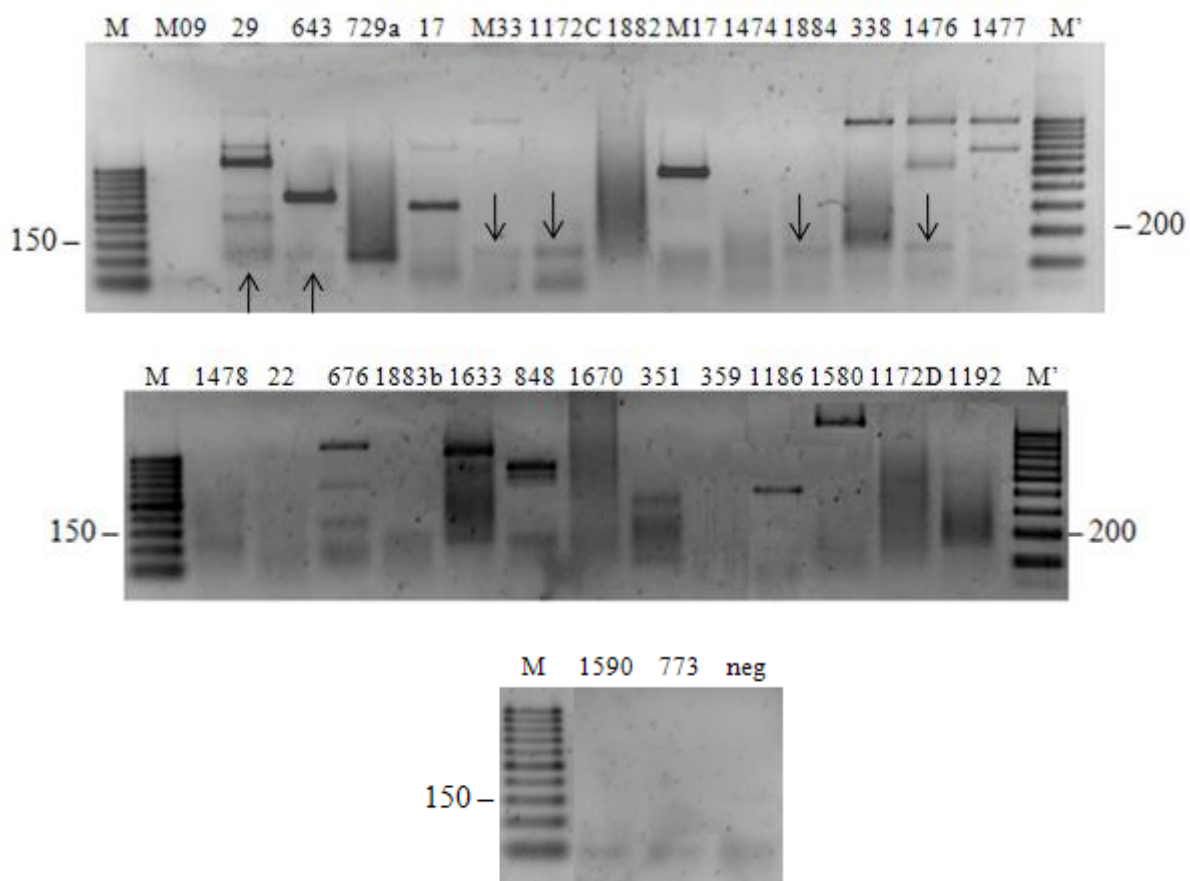


Fig. 15. Amplificação para o gene B-giardina (nested PCR) em amostras arqueológicas humanas positivas para *G. duodenalis* pelo ELISA (2 μ L). Neg: controle negativo. M: marcadores de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto (indicado por uma seta): 147 pb.

Amplificação do gene alvo *gdh* de humanos e animais em material antigo.

Das 29 amostras arqueológicas consideradas positivas pelo diagnóstico imunoenzimático, 24 apresentaram amplificação na altura esperada para o gene alvo *gdh* humano (fig. 16) e 21 para o *gdh* animal (fig. 17).

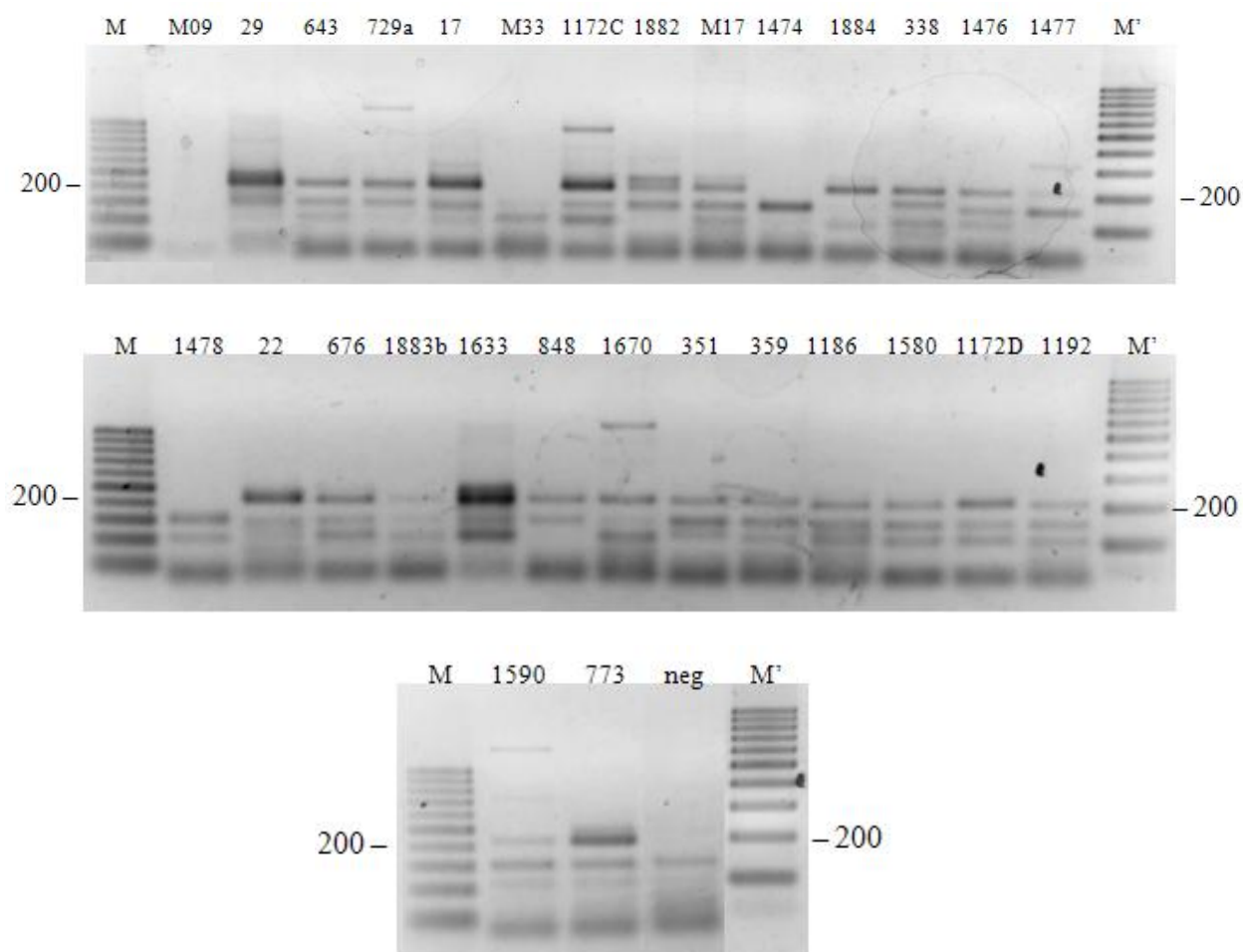


Fig. 16. Amplificação do gene *gdh* de humanos em amostras arqueológicas positivas para *G. duodenalis* pelo ensaio ELISA (5 μ L). Neg: controle negativo. M: marcadores de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto: 214 pb.

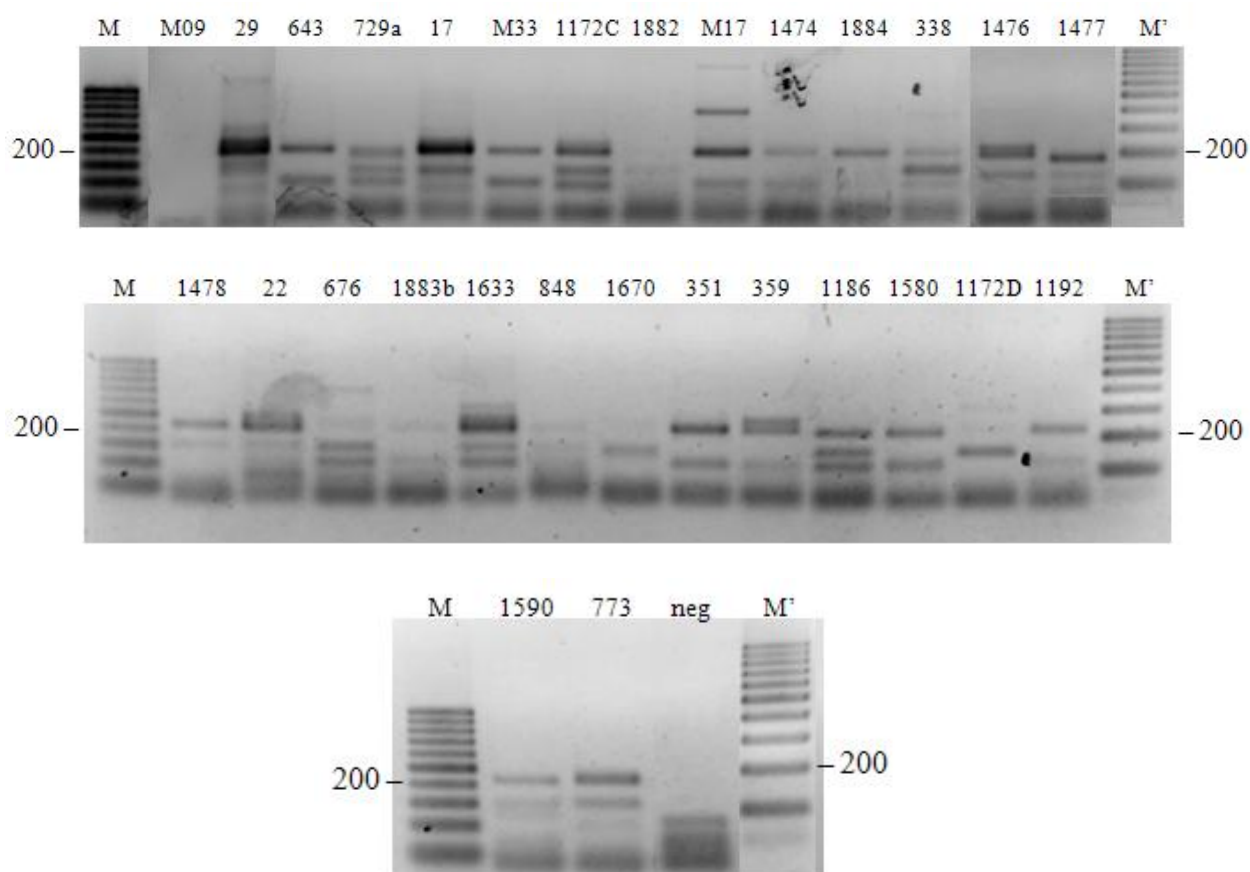


Fig. 17. Amplificação do gene *gdh* de animais em amostras arqueológicas positivas para *G. duodenalis* pelo ensaio ELISA (5 μ L). Neg: controle negativo. M: marcador de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto: 214 pb.

Amplificação do gene alvo citocromo b em amostras arqueológicas de origem animal.

Das amostras de roedor foi apenas possível obter uma amplificação na altura esperada para o gene alvo (fig. 18). Nenhuma amplificação foi obtida para amostras de canídeos ou felídeos.

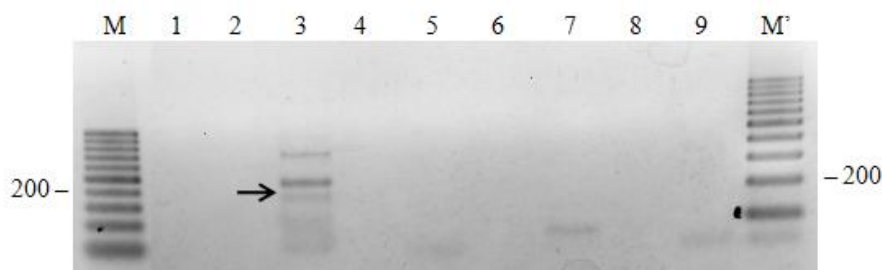


Fig. 18. Amplificação para o gene citocromo b em *Kerodon rupestris*. 1-8: amostras arqueológicas de roedor (5 μ L); 9: controle negativo. M: marcadores de peso molecular 50 pb; M': low DNA mass de 100 pb. Tamanho esperado do produto (indicado por uma seta): 205 pb.

4.4.4. Sequenciamento

O genótipo F de *G. duodenalis* foi identificado apenas para o gene *gdh* de animais, desde que o coprólito experimental foi preparado usando fezes de felino. No coprólito experimental, a origem taxonômica do hospedeiro também foi confirmada.

Das 24 amostras que exibiram amplificação no tamanho esperado para o gene *gdh* de humanos, 11 apresentaram cromatogramas de boa qualidade. Em um caso foram observados altos níveis de similaridade (99%) com sequências do genótipo A de *G. duodenalis* depositadas no GenBank. No caso do gene *gdh* de animais, das 21 amostras consideradas positivas, obtiveram-se 9 cromatogramas de boa qualidade, contudo não foi possível identificar a presença do parasito, onde a maioria das amplificações obtidas apontaram serem outros microorganismos. Os controles negativos que apresentaram amplificações, mesmo não estando na altura esperada, foram sequenciados e não mostraram similaridade com sequências de nenhum organismo depositado no GenBank.

Quadro 7

Detecção de protozoários no material arqueológico estudado.

ID amostra	ELISA			Microscopia	Biologia molecular							
	Gd	Cs	Ehd		Bgiar	Resultados seq.	nBgiar	Resultados seq.	Gdh_H	Resultados seq.	Gdh_A	Resultados seq.
4	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5a	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	+	-	-	-	+	R	-	-	+	<i>Micromonospora</i>	+	R
22	+	-	-	cisto ¹	-	-	-	-	+	R	+	R
28B	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	+	+	-	larvas + cisto	-	-	+	R	+	R	-	-
38	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
43	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
44a	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
337	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
338	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R	+	R
350	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
351	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Kocuria rhizophila</i>	+	R
353	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
356	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
359	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	+	<i>Thermobifida fusca</i> <i>A. dehalogenans</i>
1882	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>Sanguibacter keddieii</i> <i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	-	-
1883A	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1883B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1884	+	-	-	-	-	-	+	R	+	R	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>S. keddieii</i> <i>G. polyisoprenivorans</i>
1876	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
848	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R	-	-
934	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

¹Estrutura compatível com cisto; Pos: amostra positiva; -: amostra negativa; R: cromatograma de baixa qualidade; NA: não se aplica.

Quadro 7
(continuação)

ID amostra	ELISA			Microscopia	Biologia molecular							
	Gd	Cs	Ehd		Bgiar	Resultados seq.	nBgiar	Resultados seq.	Gdh_H	Resultados seq.	Gdh_A	Resultados seq.
944	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
985 a.2	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1020	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1474	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Arthrobacter aurescens</i>
1476	+	+	+	-	-	-	+	R	+	<i>G. duodenalis</i>	+	R
1477	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R
1478	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R
510	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
511	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
728N	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
729a	+	+	-	-	+	R	-	-	+	R	+	R
730b	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
731a	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1042	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1608	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1618	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1633	+	-	-	Ovo de acantocéfalo + cisto	+	R	-	-	+	R	+	R
1670	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R	-	-
1678	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1140	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1172C	+	+	-	-	-	-	+	R	+	R	+	R
1172D	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Coprococcus catus</i>	-	-
1186	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R	+	<i>Brachybacterium faecium</i>

¹ Estrutura compatível com cisto; Pos: amostra positiva; -: amostra negativa; R: cromatograma de baixa qualidade; NA: não se aplica.

Quadro 7
(continuação)

ID amostra	ELISA			Microscopia	Biologia molecular							
	Gd	Cs	Ehd		Bgiar	Resultados seq.	nBgiar	Resultados seq.	Gdh_H	Resultados seq.	Gdh_A	Resultados seq.
1192	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	+	R
768	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
773	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R	+	R
1580	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>Anaeromyxobacter sp</i> <i>S. keddiei</i>	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>G. polyisoprenivorans</i> <i>Anaeromyxobacter sp</i>
1590	+	-	-	-	-	-	-	-	+	R	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>S. keddiei</i> <i>G. polyisoprenivorans</i>
M05	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
M06	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
M09	+	+	-	-	inibida	-	Inibida	-	Inibida	-	inibida	-
M12	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
M17	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Porphyra yezoensis</i>	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>S. keddiei</i> <i>G. polyisoprenivorans</i>
M23	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
M33	+	-	-	-	-	-	+	R	-	-	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>S. keddiei</i> <i>G. polyisoprenivorans</i>
628	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
637	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
639	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
643	+	+	-	-	-	-	+	R	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>Anaeromyxobacter sp</i>	+	<i>A. dehalogenans</i> <i>S. keddiei</i>
654	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
665	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

¹ Estrutura compatível com cisto; Pos: amostra positiva; -: amostra negativa; R: cromatograma de baixa qualidade; NA: não se aplica.

Quadro 7
(continuação)

ID amostra	ELISA			Microscopia	Biologia molecular							
	Gd	Cs	Ehd		Bgiar	Resultados seq.	nBgiar	Resultados seq.	Gdh_H	Resultados seq.	Gdh_A	Resultados seq.
676	+	+	-	cisto	-	-	-	-	+	<i>Phenylobacterium zucineum</i> <i>A. dehalogenans</i> <i>Corynebacterium urealyticum</i>	-	-
678	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
683	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1565	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1567	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

¹ Estrutura compatível com cisto; Pos: amostra positiva; -: amostra negativa; R: cromatograma de baixa qualidade; NA: não se aplica.

5. DISCUSSÃO

5.1. Detecção microscópica de *G. duodenalis* em coprólitos

As primeiras descrições de protozoários intestinais em material arqueológico foram secundárias a achados de parasitos de maiores dimensões^{134,135,158}. Subsequentemente e com a crescente disponibilidade de kits comerciais para diagnóstico de protozoários, o número de estudos aumentou. Por exemplo, *G. duodenalis*, *C. parvum* e *Entamoeba* spp. têm sido identificados com êxito em amostras tanto do Novo como do Velho Mundo, datado de 5300 AP ao século XIX (Frías *et al.*¹⁹³, anexo).

Vários parasitos de espécies animais têm sido recuperadas de coprólitos de origem humana, sugerindo falso parasitismo em alguns casos e zoonoses em outros. A maioria destes estudos têm sido realizados com helmintos. Contudo, muitas das infecções consideradas zoonoses, como a criptosporidíase e a giardíase, podem ser confirmadas só pela caracterização molecular de genótipos e subgenótipos. Não existem relatos do diagnóstico por biologia molecular para protozoários intestinais em material arqueológico, sendo ainda preteridos em relação a outras protozooses e, mesmo nestes poucos trabalhos, amostras animais não têm sido testadas. A microscopia foi a primeira técnica usada no diagnóstico paleoparasitológico. No caso de *G. duodenalis*, existem apenas dois trabalhos usando microscopia óptica como método de detecção; o primeiro não obteve resultados positivos para o parasito¹³⁵ e o segundo só detectou cistos em uma das 83 amostras analisadas¹⁵⁴. Estudos posteriores fizeram uso da técnica de imunofluorescência indireta para identificar protozoários em material arqueológico, encontrando *G. duodenalis* em amostras de vários sítios arqueológicos do Novo Mundo e em um sítio na Europa mostrando ser possível a preservação da morfologia do cisto^{153,157,158,188}.

No presente estudo, *G. duodenalis* não foi identificada mediante a microscopia óptica no material arqueológico. Estruturas semelhantes a *Giardia* foram observadas em algumas lâminas porém, dada à perda de morfologia característica, não foi possível fazer um diagnóstico preciso. Contudo, o estudo a partir do coprólito experimental permitiu observar que houve uma perda considerável na visualização dos cistos quando comparado ao material moderno. A morfologia de alguns cistos ficou completamente alterada principalmente quanto as estrutura internas, prejudicando o seu diagnóstico. Sendo assim, e considerando-se que o material arqueológico esteve submetido a uma condição de dessecação mais extrema e por

um tempo maior, é provável que o mesmo tenha se passado nos cistos do protozoário em material arqueológico em escala muito maior. Tal fato corroboraria a escassez de achados deste protozoário ou sua completa ausência até o momento pelos métodos convencionais de microscopia óptica. Porém, dada a intensidade da alteração na morfologia dos cistos do coprólito experimental o qual foi proveniente de um material previamente visualizado a fresco que continham muitos cistos com morfologia características, é possível que algumas das estruturas observadas sejam cistos de *Giardia* sp. A imunofluorescência indireta poderia ajudar na confirmação do diagnóstico de *Giardia* nas amostras que apresentarem um diagnóstico incerto, uma vez que esta tem mostrado resultados mais promissores no material arqueológico e necessitando basicamente da morfologia externa do cisto.

5.2. Diagnóstico imunoenzimático de protozoários em material antigo

Neste estudo obteve-se um grande número de amostras arqueológicas positivas para o antígeno de *G. duodenalis*. Os testes imunoenzimáticos para *G. duodenalis* usados nas diferentes pesquisas em material arqueológico (TechLab, Alexon ProSpecT e IVD Research[†]) detectam a mesma proteína de membrana altamente estável do cisto de *Giardia* (CWP1), produzida e liberada por trofozoítas em encistamento¹⁹⁴. A questão dos falsos positivos já foi considerada em trabalhos anteriores¹⁹⁰ onde se inferiu que dada a ausência de falsos positivos com microorganismos comensais do trato gastrointestinal, reações cruzadas com microorganismos comensais do solo seriam improváveis. No entanto, os resultados obtidos a partir dos testes imunoenzimáticos devem ser interpretados com cautela, uma vez que o material arqueológico apresenta contaminantes não testados na padronização dos testes.

Uma característica do ciclo de vida de *G. duodenalis* que poderia estar favorecendo a obtenção de um maior número de resultados positivos pela análise imunoenzimática, é a eliminação contínua de antígenos¹⁹⁵, ao contrário da eliminação de cistos que é intermitente. Além disso, a melhor preservação antigênica no tempo foi considerada¹⁵³, no entanto não existe evidência que sustente a detecção diferencial de *G. duodenalis* e microorganismos presentes no solo.

[†] Teste para *Giardia* do TechLab, Inc., Blacksburg, VA, usado por Mitchell *et al.*¹⁹⁰ e LeBailly *et al.*¹⁵⁷; ensaio de microplaca da Alexon ProSpecT *Giardia* (Alexon, Inc., Sunnyvale, CA), usado por Gonçalves *et al.*¹⁵⁴; e o kit para a detecção de *Giardia* (IVD Research, Inc., Carlsbad, CA) utilizado neste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo através dos testes imunoenzimáticos revelaram a presença dos três protozoários pesquisados no material arqueológico do Novo Mundo. A detecção de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. em várias espécies animais constitui uma primeira aproximação ao estudo de protozoários de potencial zoonótico em animais, onde além da presença de co-infecção de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. em algumas amostras de origem humana e animal, observou-se *G. duodenalis* em coprólitos humanos e animais provenientes do mesmo sítio arqueológico. *G. duodenalis* é um parasito ubíquo que pode ser transmitido com facilidade entre espécies, sendo os animais importantes reservatórios para o parasito. *Kerodon rupestris*, uma espécie endêmica do nordeste brasileiro, apresentou uma alta prevalência do parasito, atuando como um potencial portador de genótipos zoonóticos.

Devido a muitas espécies poderem infectar-se por *Cryptosporidium* sp., existe um grande número de potenciais reservatórios. O ensaio imunoenzimático não indica especificidade para as espécies zoonóticas de *Cryptosporidium*, portanto não é possível saber se a detecção corresponde à mesma espécie em todos os casos. Apesar de *C. parvum* apresentar uma alta prevalência em gado, neste estudo o gado pode ser excluído como reservatório, uma vez que a maior parte dos animais de criação não existiam em tempos pré-colombianos no Brasil, sendo introduzidos posteriormente pelos Europeus. Por outro lado, a introdução ocasional do parasito em populações de animais domésticos por animais silvestres deve ter acontecido de forma regular. A domesticação do cobaia (*Cavia* sp.), tem sido reportada em tempos pré-colombianos¹⁹⁶, onde o armazenamento de grãos teria aproximado roedores silvestres dos domesticados. De qualquer forma, distinguir as espécies zoonóticas daquelas próprias de roedores representa ainda um grande desafio para a paleoparasitologia.

Além dos achados anteriores, foi registrado o primeiro caso de *E. histolytica/dispar* no Brasil em amostras recuperadas de um enterramento atribuído à tradição Tupi-Guarani em Itapeva, Estado de São Paulo¹⁹⁷.

5.3. Diagnóstico molecular de *G. duodenalis* em material arqueológico

Extração de DNA parasitário.

A pesquisa em DNA antigo caracteriza-se por tentar se sobrepor ao problema da escassa preservação de DNA em vários estados de degradação. A maioria dos métodos de extração têm sido desenhados para tratar espécimes frescos de células intactas e DNA de alto peso

molecular. Em espécimes antigos, estruturas celulares preservadas não são geralmente encontradas e, devido a modificações químicas, pode ser difícil recuperar DNA em uma solução aquosa¹⁹⁸. Além disso, o DNA antigo encontra-se degradado de várias formas^{164,167}, por isso os métodos de extração também têm que evitar tratamentos agressivos, como temperaturas altas ou uso de detergentes fortes^{199,200} que adicionam danos ao DNA antigo.

O primeiro problema a se enfrentar no trabalho com DNA antigo, que se torna um problema maior na paleoparasitologia molecular, é o processo de extração, onde DNA endógeno é extraído da amostra em conjunto com DNA de bactérias e fungos acumulados nela, tanto de microorganismos vivendo no sedimento ao redor da amostra, quanto daqueles introduzidos durante a coleta e armazenamento. Além do mais, a quantidade de DNA exógeno extraído excede em várias vezes a quantidade de DNA endógeno²⁰¹⁻²⁰³.

Neste estudo foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) para a extração de DNA parasitário. Este kit já foi testado em paleoparasitologia, porém visando a extração de DNA de helmintos¹⁸⁴, parasitos que por serem multicelulares apresentam quantidades maiores de DNA quando comparados com protozoários. Além disso, o trabalho com helmintos permite o isolamento do espécime das fezes, como por exemplo seus ovos, aumentando a qualidade do DNA e facilitando amplificações posteriores. A principal dificuldade durante este estudo foi a qualidade/disponibilidade do DNA extraído, o que pode estar refletindo em uma baixa quantidade de DNA parasitário disponível, uma alta degradação dificultando a amplificação e/ou altas quantidades de DNA de outros organismos.

Amplificação de DNA parasitário.

O sucesso da amplificação depende da padronização da sensibilidade dos alvos e especificidade e homogeneização das temperaturas de anelamento. O tamanho máximo de amplificação de fragmentos encontra-se limitado pelo grau de fragmentação do *template* de DNA antigo, onde é recomendado o uso de alvos menores do que ~300 pb¹⁸⁶. Neste estudo, observou-se a amplificação de produtos pequenos, o que pode estar refletindo amplificação preferencial de fragmentos pequenos presentes em número maior devido à fragmentação do DNA antigo.

Os coprólitos contêm grandes quantidades de inibidores de PCR que interferem na amplificação de DNA e são co-purificados com o DNA antigo. O desempenho da PCR variou entre os diferentes genes alvos e entre as diferentes abordagens metodológicas. Ao usar o DNA do coprólito experimental para amplificar o gene B-giardina, obteve-se uma

amplificação única de baixa intensidade, enquanto que ao usar a PCR reconstitutiva como *template*, a recuperação foi menor, não conseguindo obter uma amplificação na altura esperada. O contrário observou-se no caso do gene *gdh*, onde o uso do *template* da PCR reconstitutiva permitiu uma amplificação única de intensidade forte na altura esperada. Segundo o anterior, optou-se pelo melhor rendimento no *gdh* que, ao ser multicópias, poderia aumentar as chances de recuperar DNA antigo. A ausência de amplificações para o gene citocromo *b*, pode estar indicando a baixa preservação do DNA antigo do hospedeiro, uma vez que as amostras não estavam inibidas.

A padronização das condições de amplificação em material moderno mostrou ter êxito ao ser testada no coprólito experimental. Da mesma forma, os alvos desenhados para detectar o gene *gdh* em amostras arqueológicas mostraram serem capazes de identificar *G. duodenalis* em pelo menos uma amostra que foi possível atribuir ao genótipo A.

O DNA antigo é altamente modificado por processos oxidativos que são os principais responsáveis pela baixa taxa de recuperação de DNA não danificado de espécimes arqueológicos²⁰³. No caso das amostras arqueológicas, os fatores que impediram a amplificação de DNA antigo podem ter apresentado variações entre sítios arqueológicos, se originando tanto do ambiente dos restos na forma de ácidos húmicos, fúlvicos, taninos e DNA exógeno, quanto da degradação do próprio espécime^{164,204}. Outro fator influenciando na preservação de DNA antigo é a temperatura na área de onde o fóssil se originou. Estudos têm mostrado que amostras provenientes de climas áridos apresentam uma taxa de amplificação menor quando comparada com amostras recuperadas de climas frios^{205,206}.

Apesar dos alvos serem específicos para detectar o gene B-giardina e o *gdh* de *Giardia* sp. de humanos e animais, ao sequenciar os produtos, obtiveram-se sequências para diversas espécies de bactérias, principalmente de solo, fato este que não havia sido observado nas amostras fecais modernas. Devido ao alto grau de contaminação das amostras, coletadas em diferentes épocas e usando diferentes abordagens metodológicas, determinar quando estas bactérias passaram a fazer parte da amostra, torna-se complexo. De fato, é possível que a baixa detecção do parasito pela biologia molecular esteja relacionada à baixa recuperação de cistos pela microscopia óptica. Além disso, a presença de altas concentrações de DNA de outros organismos em algumas amostras pode levar a uma competição durante a amplificação e o sequenciamento, dificultando a detecção de DNA do parasito.

Uma forma de superar este problema seria a implementação de uma série de alvos para obter fragmentos pequenos (~150 pb incluindo os alvos) que sobrepostos gerariam

sequências mais longas específicas do protozoário. Uma abordagem metodológica que tem mostrado ser eficiente na pesquisa de DNA antigo é o uso da PCR quantitativa, focada em registrar a quantidade do amplicon presente durante a fase exponencial da PCR. As vantagens da PCR quantitativa na pesquisa de DNA antigo incluem a otimização da recuperação do DNA, a detecção de inibidores da PCR, a avaliação rápida da preservação, a autenticidade do DNA antigo²⁰⁷ e a menor manipulação do material, diminuindo uma exposição a eventuais outros contaminantes.

5.4. Sobre o uso de coprólitos experimentais.

Mais do que descobertas revolucionárias ou a obtenção de resultados esperados, a paleoparasitologia precisa dedicar uma linha de pesquisa ao desenvolvimento de tecnologias, metodologias e modelos experimentais que permitam um maior e melhor aproveitamento do material que muitas vezes é esgotado no mesmo processo de análise. Neste sentido, a dedicação de recursos orientados à experimentação torna-se quase uma responsabilidade dos mesmos pesquisadores com o patrimônio arqueológico que está sendo pesquisado.

Apesar dos coprólitos constituírem uma fonte importante de informação, eles são muito frágeis e a sua descoberta muitas vezes ao acaso. O uso de modelos experimentais na paleoparasitologia tem permitido a experimentação sem a perda de material escasso^{176,208,209}. No caso dos coprólitos, fezes frescas com as características desejadas a serem analisadas nos coprólitos, são colocadas durante semanas em uma estufa simulando o processo de dessecação responsável pela preservação da maior parte dos coprólitos. Porém, como a pesquisa em coprólitos tem se focado em entender variáveis afetando a recuperação de helmintos, aspectos dos processos tafonômicos que podem estar afetando a recuperação de protozoários intestinais podem ter sido negligenciados.

O problema da transferência de DNA entre estratos causando contaminação têm sido referido previamente²¹⁰, mostrando a necessidade de ampliar as variáveis a serem controladas. Testar as condições que facilitam o movimento de moléculas livres de DNA entre estratos constituiria uma abordagem importante, permitindo entender melhor as relações do coprólito com o seu ambiente próximo.

Este estudo representa o primeiro relato de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. em amostras de origem humana e animal e o primeiro registro de *E. histolytica/dispar* em material arqueológico do Brasil. Os protozoários intestinais têm sido diagnosticados em

material arqueológico usando diferentes abordagens metodológicas. Dada à sua baixa sensibilidade, a microscopia óptica por si só, não é uma técnica recomendada na pesquisa de protozoários intestinais em material antigo. A detecção imunoenzimática, por sua vez, oferece um diagnóstico rápido e específico para cada protozoário. Porém, esta técnica não permite a identificação ao nível de genótipo da espécie. A biologia molecular mostrou-se uma ferramenta capaz de identificar o genótipo zoonótico A do parasito em pelo menos uma amostra arqueológica, porém sua sensibilidade é ainda muito baixa, podendo levar à obtenção de falsos negativos.

6. CONCLUSÕES

- A detecção dos três protozoários intestinais em material arqueológico mostra a presença deles no passado. Neste estudo foi descrito o primeiro registro de *E. histolytica/dispar* em material arqueológico do Brasil.
- A identificação de *G. duodenalis* em coprólitos de origem humana e animal, pelo ensaio imunoenzimático, sugere a circulação zoonótica deste parasito em tempos pré-colombianos.
- A microscopia óptica mostrou-se uma técnica de baixa sensibilidade na detecção de *G. duodenalis* em coprólitos experimentais, o que pode explicar a baixa recuperação do parasito em contextos arqueológicos.
- Este estudo representa a primeira tentativa de detecção molecular de *G. duodenalis* em amostras arqueológicas de origem humana e animal. A biologia molecular mostrou-se uma ferramenta capaz de identificar o genótipo zoonótico A do parasito em pelo menos uma amostra arqueológica, porém a sua sensibilidade é ainda muito baixa, podendo levar a obtenção de falsos negativos.
- Não foi possível confirmar molecularmente a origem zoológica dos coprólitos animais.

7. REFERÊNCIAS

1. Thomas F, Verneau O, De Meeûs T, Renaud F 1996. Parasites as host evolutionary prints: insights into host evolution from parasitological data. *Int J Parasitol* 26 (7): 677-686.
2. Morand S & Deter J 2009. Parasitism and regulation of the host population. Em: Thomas F, Guégan JF, Renaud F, editors. *Ecology and evolution of parasitism*. Oxford University Press, pp. 240.
3. De Meeûs T & Renaud F 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends Parasitol* 18(6): 247-251.
4. Sterling & Adams 2004. *The pathogenic enteric protozoa: Giardia, Entamoeba, Cryptosporidium and Cyclospora*. Kluwer Academic Publishers, pp. 182.
5. Khan NA 2008. *Emerging protozoa pathogens*. Taylor & Francis Group, pp. 384.
6. Adam RD 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55: 706-732.
7. Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-475.
8. Thompson RCA 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35.
9. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 213: 321-333.
10. Feng Y & Xiao L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24 (1): 110-140.
11. Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA 1988. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am J Trop Med Hyg* 38: 65-73.
12. Andrews RH, Adams M, Boreham PFL 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol* 19: 183-190.
13. Homan WL, van Enckevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van Knapen F 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 78: 316-323.

14. Homan WL, Gilsing M, Bentala H, Limper L, van Knapen F 1998. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol Res* 84: 707-714.
15. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83: 44-51.
16. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16: 1135-1144.
17. Thompson RCA 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30: 1259-1267.
18. Monis PT & Thompson RCA 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonoses: fact or fiction? *Inf Gen Evol* 3: 233-244.
19. Thompson RCA & Smith A 2011. Zoonotic enteric protozoa. *Vet Parasitol* 182: 70-78.
20. Graczyk TK, Bosco-Nizey J, Ssebide B, Thompson RCA, Read C, Cranfield MR 2002. Anthroponotic *Giardia duodenalis* genotype (Assemblage A) infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. *J Parasitol* 88: 905-909.
21. Moro D, Lawson MA, Hobbs RP, Thompson RCA 2003. Pathogens of house mice on arid Boullanger Island and subantarctic Macquarie Island Australia. *J Wildl Dis* 39: 762-771.
22. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9: 1444-1452.
23. Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. *Trends Parasitol* 21: 370-376.
24. Appelbee AJ, Thompson RCA, Measures LM, Olson ME 2010. *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded Seals from the Gulf of St. Lawrence Canada. *Vet Parasitol* 173: 19-23.
25. Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Thompson RCA 2007. The molecular characterization of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet Parasitol* 150: 33-38.

26. Kutz SJ, Thompson RCA, Polley L, Kandola K, Nagy J, Wielinga CM, Elkin BT 2008. *Giardia* assemblage A: human genotype in muskoxen in the Canadian Arctic. *Parasites & Vectors* 1: 32-35.
27. Dixon BR, Parrington LJ, Parenteau M, Leclair D, Santín M, Fayer R 2008. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in the intestinal contents of ringed seals (*Phoca hispida*) and bearded seals (*Erignathus barbatus*) in Nunavik, Quebec, Canada. *J Parasitol* 94: 1161-1163.
28. Teichroeb JA, Kutz SJ, Parkar U, Thompson RCA, Sicotte P 2009. Ecology of the gastrointestinal parasites of *Colobus vellerosus* at Boabeng-Fiema Ghana: possible anthroponotic transmission. *Am J Phys Anthropol* 140: 498-507.
29. Thompson RCA, Colwell DD, Shury T, Appelbee AJ, Read C, Njiru Z, Olson ME 2009. The molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in coyotes from Alberta Canada, and observations on some cohabiting parasites. *Vet Parasitol* 159: 167-170.
30. Thompson RCA, Lymbery AJ, Smith A 2010a. Emerging parasite diseases and wildlife. *Int J Parasitol* 40: 1163-1170.
31. Thompson RCA, Smith A, Lymbery AJ, Averis S, Morris KD, Wayne AF 2010b. *Giardia* in Western Australian wildlife. *Vet Parasitol* 170: 207-211.
32. Ash A, Lymbery AJ, Lemon J, Vitali S, Thompson RCA 2010. Molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* in an endangered carnivore-the african painted dog. *Vet Parasitol* 174: 206-212.
33. Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TL, Kent AD, Goldberg TL 2010. Molecular Epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in Western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (5): e683.
34. Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, Adusu E, Jelinek T 2006. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect* 12 (7): 656-659.
35. Ghosh S, Debnath A, Sil SDA, Chattopadhyay DJ, Das P 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol Cell Probes* 14: 181-189.
36. Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes* 17: 223-225.

37. Guy RA, Xiao C, Horgen PA 2004. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 42: 3317-3320.
38. Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienens EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42: 1220-1223.
39. Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SM, Mondal D, Houpt E, Petri WA Jr 2007. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg* 76 (4): 713-717.
40. Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A 2007. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 13 (12): 1186-1191.
41. Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Moller L, van Lieshout L, Verweij JJ 2007. Detection of diarrhea causing protozoa in general practice patients in the Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 13: 1001-1007.
42. Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ 2009. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect* 15: 869-874.
43. Ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ 2009. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 1045-1053.
44. Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, Gargiulo F, Manca N, Dettori G, Chezzi C 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66: 261-267.
45. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E 2002. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Inter J Parasitol* 32(8): 1023-1030.
46. Wielinga CM & Thompson RC 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitol* 134: 1795-1821.
47. Cacciò SM & Ryan U 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.

48. Tyzzer EE 1907. A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 5: 12-13.
49. Tyzzer EE 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd* 26: 394-412.
50. Upton SJ & Current WL 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J Parasitol* 71: 625-629.
51. Awad-el-Kariem FM, Robinson HA, Dyson DA, Evans D, Wright S, Fox MT, McDonald V 1995. Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing. *Parasitol* 110: 129-132.
52. Awad-El-Kariem FM, Robinson HA, Petry F, McDonald V, Evans D, Casemore D 1998. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitol Res* 84: 297-301.
53. Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, Beard CB, Arrowood MJ, Lal AA 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis* 4: 681-685.
54. Widmer G, Tchack L, Spano F, Tzipori S. 1998. A Study of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 685-686.
55. Xiao LH, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R, Lal AA 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65: 3386-3391.
56. Cacciò S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol* 120: 237-244.
57. Silverlås C, Mattsson JG, Insulander M, Lebbad M 2012. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *Int J Parasitol* 42 (11): 963-967.
58. Berrilli F, D'Alfonso R, Giangaspero A, Marangi M, Brandonisio O, Kaboré Y, Glé C, Cianfanelli C, Lauro R, Di Cave D 2012. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106 (3): 191-195.

59. Xiao L & Ryan UM 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 17: 483-490.
60. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 17: 72-97.
61. Xiao L & Feng Y 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 309-323.
62. Zhou L, Fayer R, Trout JM, Ryan UM, Schaefer FW, Xiao L 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting furbearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl Environ Microbiol* 70: 7574-7577.
63. Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Nadareski CA, Reid M, Xiao L 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl Environ Microbiol* 73: 6475-6483.
64. Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantic-Pavlinic M, Bern C, Sulaiman IM, Glaberman S, Lal AA, Xiao L 2001. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J Eukaryot Microbiol* 48: 28-31.
65. Peng MM, Meshnick SR, Cunliffe NA, Thindwa BD, Hart CA, Broadhead RL, Xiao L 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J Eukaryot Microbiol* 50 (Suppl): 557-559.
66. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 183: 492-497.
67. Tiangtip R & Jongwutiwes S 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop Med Int Health* 7: 357-364.
68. Cama VA, Bern C, Sulaiman IM, Gilman RH, Ticona E, Vivar A, Kawai V, Vargas D, Zhou L, Xiao L 2003. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J Eukaryot Microbiol* 50 (Suppl): 531-533.
69. Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA 2003. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 41: 1458-1462.

70. Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwati SK, Revathi G, Hart CA 2006. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75: 78-82.
71. Gatei W, Das P, Dutta P, Sen A, Cama V, Lal AA, Xiao L 2007. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect Genet Evol* 7: 197-205.
72. Bushen OY, Kohli A, Pinkerton RC, Dupnik K, Newman RD, Sears CL, Fayer R, Lima AA, Guerrant RL 2007. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 101: 378-384.
73. Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva JJ 1996. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. *J Clin Microbiol* 34: 1769-1772.
74. Zhu G, Marchewka MJ, Ennis JG, Keithly JS 1998. Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis* 177: 1443-1446.
75. Higgins JA, Fayer R, Trout JM, Xiao L, Lal AA, Kerby S, Jenkins MC 2001. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *J Microbiol Methods* 47: 323-337.
76. Gile M, Warhurst DC, Webster KA, West DM, Marshall JA 2002. A multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) on the dihydrofolate reductase gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* genotypes 1 and 2. *Parasitol* 125: 35-44.
77. Xiao L 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 124: 80-89.
78. O'Connor RM, Wanyiri JW, Cevallos AM, Priest JW, Ward HD 2007. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Mol Biochem Parasitol* 156: 80-83.
79. Jackson TFHG 1998. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int J Parasitol* 28: 181-186.
80. Petri WA Jr, Haque R, Lyerly D, Vines RR 2000. Estimating the impact of amoebiasis on health. *Parasitol Today* 16: 320-321.

81. Ohnishi K, Kato Y, Imamura A, Fukayama M, Tsunoda T, Sakaue Y, Sakamoto M, Sagara H 2004. Present characteristics of symptomatic *Entamoeba histolytica* infection in the big cities of Japan. *Epidemiol Infect* 132: 57-60.
82. World Health Organization. The world health report: 1997. Geneva: World Health Organization, 1997.
83. Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 30: 401-410.
84. Petri WA Jr & Singh U 1999. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* 29: 1117-1125.
85. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J 2007. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 45: 1035-1037.
86. Clark CG & Diamond LS 1991. The Laredo strain and other 'Entamoeba histolytica like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol* 46: 11-18.
87. Gatti S, Cevini C, Atzori C, Muratori S, Zerboni R, Cusini M, Scaglia M 1992. Non-pathogenic *Entamoeba histolytica* in Italian HIV-infected homosexuals. *Zentbl Bakteriol* 277: 382-388.
88. Diamond LS & Clark CG 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40: 340-344.
89. Haque R, Ali RIKM, Clark CG, Petri Jr WA 1998. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasit Int* 47 (3): 201-202.
90. Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA Jr, Haque R, Clark CG 2003. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 9: 580-584.
91. Hamzah ZS, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P 2006. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J Clin Microbiol* 44: 3196-3200.
92. Cox FEG 2002. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 15 (4): 595-612.
93. Ponce-Gordo F & Martínez-Díaz, RA 2010. Taxonomía y filogenia del género *Entamoeba*. Una revisión histórica. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 69 (1): 5-37.

94. Barr SC 1998. Enteric protozoal infections. Em: Greene CE *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: WB Saunders Co, pp. 482-491.
95. Meloni BP, Thompson RC, Hopkins RM, Reynoldson JA, Gracey M 1993. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from Aboriginal communities in the Kimberley. *Med J Aust* 158: 157-159.
96. Stensvold CR, Lebbad M, Victory EL, Verweij JL, Tannich E, Alfellani M, Legarraga P, Clark CG 2011. Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protistol* 162: 525-541.
97. Howells ME, Pruetz J, Gillespie TR 2011. Patterns of gastro-intestinal parasites and commensals as an index of population and ecosystem health: the case of sympatric Western Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and Guinea Baboons (*Papio hamadryas papio*) at Fongoli, Senegal. *Am J Primatol* 73: 173-179.
98. Campos Filho PC, Barros LM, Campos JO, Braga VB, Cazorla IM, Albuquerque GR, Carvalho SM. 2008. Zoonotic parasites in dog feces at public squares in the municipality of Itabuna, Bahia, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 17: 206-209.
99. Youn H 2009. Review of zoonotic parasites in medical and veterinary fields in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 47: 133-141.
100. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Aguirre A, Castanon G, Hall A, Guhl F, Ruiz-Palacios G, Miles MA, Warhurst DC 1994. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J Clin Pathol* 47: 236-239.
101. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 33: 2558-2561.
102. Singh U & Ehrenkaufer GM 2009. Recent insights into *Entamoeba* development: identification of transcriptional networks associated with stage conversion. *Parasitol* 39 (1): 41-47.
103. Sanchez-Guillén MDC, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Arguelles A, Ackers J, Shire A, Talamas-Rohana P 2002. Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 66: 731-737.

104. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, Da Silva AJ 2005. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 43: 5491-5497.
105. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri Jr. WA, Haque R 2005. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Clin Microbiol* 43: 2168-2172.
106. Khairnar K, Parija SC, Palaniappan R 2007. Diagnosis of intestinal amoebiasis by using nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *J Gastroenterol* 42: 631-40.
107. Mahdy A, Lim Y, Surin J, Wan K, Hesham A 2008. Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 465-470.
108. Vidal AMB & Catapani WR 2005. Enzyme-linked immunosorbent assay immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *São Paulo Med J* 123 (6): 282-285.
109. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry K, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35: 995-998.
110. Verweij JJ, Pit DS, van Lieshout L, Baeta SM, Dery GD, Gasser RB, Polderman AM 2001. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Trop Med Int Health* 6: 726-31.
111. Cockerill FR & Smith TF 2002. Rapid-Cycle real-time PCR: a revolution for clinical microbiology. *ASM News* 68: 77-83.
112. Klein D 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 8 (6): 257-260.
113. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JLN, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT 2011. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol* 49 (1): 257-262.
114. Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonn  -Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P, Ibrahim M, Jenkins T, Kidd JR, Mehdi SQ, Seielstad MT, Wells RS, Piazza A, Davis RW, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL, Oefner

- PJ 2000. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet* 26 (3): 358-361.
115. Ingman M & Gyllensten U 2001. Analysis of the complete human mtDNA genome: methodology and inferences for human evolution. *J Hered* 92: 454-461.
 116. Zhivotovsky LA, Rosenberg NA, Feldman MW 2003. Features of evolution and expansion of modern humans, inferred from genome-wide microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 72: 1171-1186.
 117. Liu H, Prugnolle F, Manica A, Piazza A 2006. A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *Am J Hum Genet* 79: 230-237.
 118. Mellars P 2006. Why did modern human populations disperse from Africa ca. 60.000 years ago? A new model. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 103: 9381-9386.
 119. Ruffer MA 1910. Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the twentieth dynasty (1250-1000 BC). *Br Med J* 1: 16.
 120. Araújo A, Reinhard K, Bastos O, Costa LC, Pirmez C, Iñiguez A, Vicente AC, Morel CM, Ferreira LF 1998. Paleoparasitology: perspectives with new techniques. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40: 371-376.
 121. Callen EO & Cameron TWM 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Scientist* 8: 35-40.
 122. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1988. *Paleoparasitologia no Brasil*. PEC/ENSP, Rio de Janeiro, 158 pp.
 123. Araújo A & Ferreira LF 2000. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 (Suppl. I): 89-93.
 124. Gonçalves MLC, Araujo A, Ferreira LF 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 103-118.
 125. Reinhard K, Fink M, Skiles J 2003. A case of megacolon in Rio Grande Valley as a possible case of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 165-172.
 126. Dittmar K, Jansen AM, Araújo A, Reinhard K 2003. Molecular diagnosis of prehistoric *T. cruzi* in the Texas-Coahuila border region. *Paleopathol Newsl* (Suppl): 4.
 127. Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM 2008. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *T. cruzi* I in the archaeological

- remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 514-516.
128. Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Fernando Ferreira L, Araujo A, Vicente AC, Jansen AM 2008. Chagas disease in ancient hunter-gatherer populations, Brazil. *Em Infect Dis* 14: 1001-1002.
129. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, A-Arroyo FC, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC 1999. Isolation of *T. cruzi* DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 108: 401-407.
130. Fornaciari G, Giuffra V, Ferroglio E, Gino S, Bianucci R 2010a. *Plasmodium falciparum* immunodetection in bone remains of members of the Renaissance Medici family (Florence, Italy, sixteenth century). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 104: 583-587.
131. Fornaciari G, Giuffra V, Ferroglio E, Gino S, Bianucci R 2010b. Malaria was the killer of Francesco I de Medici (1531-1587). *Am J Med* 123 (6): 568-569.
132. Nerlich AG, Bianucci R, Trisciuglio A, Schönián G, Ball M, Giuffra V, Bachmeier B, Pusch CM, Ferroglio E, Fornaciari G 2012. Leishmaniasis during Italian Renaissance, 1522-1562. *Emerg Infect Dis* 18: 184-186.
133. Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist Cienc Saúde-Manguinhos* 10 (3): 853-882.
134. Pizzi T & Schenone H 1954. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Bol Chil Parasitol* 9: 73-75.
135. Witenberg G 1961. Human parasites in archaeological findings. *Bull Israel Expl Soc* 25: 86.
136. Fouant MM, Allison M, Gerszten E, Focacci G 1982. Parasitos intestinales entre los indígenas precolombinos. *Rev Chungara* 9: 285-299.
137. Collins MJ, Westbroek P, Muyzer G, de Leeuw JW 1992. Experimental-evidence for condensation-reactions between sugars and proteins in carbonate skeletons. *Geochim Cosmochim Acta* 56: 1539-1544.
138. Smith PR & Wilson MT 1990. Detection of haemoglobin in human skeletal remains by ELISA. *J Archaeol Sci* 17: 255-268.

139. Nielsen-Marsh CM, Richards MP, Hauschka PV, Thomas-Oates JE, Trinkaus E, Pettitt PB, Karavanic I, Poinar H, Collins MJ 2005. Osteocalcin protein sequences of Neanderthals and modern primates. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 102: 4409-4413.
140. Organ CL, Schweitzer MH, Zheng W, Freimark LM, Cantley LC, Asara JM 2008. Molecular phylogenetics of mastodon and *Tyrannosaurus rex*. *Science* 320: 499.
141. Heaton K, Solazzo C, Collins MJ, Thomas-Oates J, Bergström ET 2009. Towards the application of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS) to the analysis of ancient proteins from artefacts. *J Archaeol Sci* 36: 2145-2154.
142. Collins MJ, Muyzer G, Westbroek P, Curry GB, Sandberg PA, Xu SJ, Quinn R, Mackinnon DI 1991. Preservation of fossil biopolymeric structures: conclusive immunological evidence. *Geochim Cosmochim Acta* 55: 2253-2257.
143. Muyzer G, Sandberg P, Knapen MHJ, Vermeer C, Collins M, Westbroek P 1992. Preservation of the bone protein osteocalcin in dinosaurs. *Geology* 20: 871-874.
144. Collins MJ, Walton D, Curry GB, Riley MS, Von Wallmenich TN, Savage NM, Muyzer P, Westbroek P 2003. Long-term trends in the survival of immunological epitopes entombed in fossil brachiopod skeletons. *Org Geochem* 34: 89-96.
145. Asara JM, Garavelli JS, Slatter DA, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC 2007a. Interpreting sequences from mastodon and *T. rex*. *Science* 317: 1324-1325.
146. Asara JM, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC. 2007b. Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science* 316: 280-285.
147. Miller RL, Armelagos GJ, Ikram S, De Jonge N, Krijger FW, Deelder AM 1992. Palaeoepidemiology of *Schistosoma* infection in mummies. *BMJ* 304: 555-556.
148. Bianucci R, Mattutino G, Lallo R, Charlier Ph, Jouin-Spriet H, Peluso A, Higham T, Torre C, Rabino Massa E 2008a. Immunological evidence of *Plasmodium falciparum* infection in a child mummy from the Early Dynastic Period. *J Archaeol Sci* 35: 1880-1885.
149. Bianucci R, Rahalison L, Massa ER, Peluso A, Ferroglio E, Signoli M 2008b. Technical note: a rapid diagnostic test detects plague in ancient human remains: an example of the interaction between archaeological and biological approaches (south-eastern France, 16th-18th centuries). *Am J Phys Anthropol* 136: 361-367.

150. Lepidi H 2008. Histologic detection of past pathogens. Em: Raoult D & Drancourt M (Eds.), *Paleomicrobiology: Past Human Infections*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 69-72.
151. Bianucci R, Rahalison L, Peluso A, Rabino Massa E, Ferroglio E, Signoli M, Langlois, JV, Gallien V 2009. Plague immunodetection in remains of religious exhumed from burial sites in central France. *J Archaeol Sci* 36: 616-621.
152. Tran TN, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M 2011. Beyond ancient microbial DNA: nonnucleotidic biomolecules for paleomicrobiology. *BioTechniques* 50 (6): 370-80.
153. Allison MJ, Bergman T, Gerszten E 1999. Further studies on parasites in antiquity. *Am J Clin Pathol* 112: 605-609.
154. Gonçalves MLC, Araujo A, Duarte R, Pereira da Silva J, Reinhard K, Bouchet F, Ferreira LF 2002. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 640-643.
155. Gonçalves MLC, Silva V, Andrade C, Rocha G, Le Bailly M, Bouchet F, Ferreira LF, Araujo A 2004. Amoebiasis distribution in the past: first steps in using an immunoassay technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 88-91.
156. Le Bailly M & Bouchet F 2006. Paléoparasitologie et immunologie: l'exemple d'*Entamoeba histolytica*. *Rev Archéom* 30: 129-135.
157. Le Bailly M, Gonçalves MLC, Harter-Lailheugue S, Prodéo F, Araujo A, Bouchet F 2008. New finding of *Giardia intestinalis* (Eukaryote, Metamonad) in Old World archaeological site using immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 103 (3): 298-300.
158. Faulkner C, Patton S, Johnson SS 1989. Prehistoric parasitism in Tennessee: Evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *J Parasitol* 75: 461-463.
159. Dolan JM 1983. The *Quagga* commemorated. *Zoonoos* 56: 13-15.
160. Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284.
161. Pääbo S 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.

162. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
163. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
164. Pääbo S 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1939-1943.
165. Pääbo S & Wilson AC 1988. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387-388.
166. Cooper A & Poinar HN 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289: 1139.
167. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S 2001. Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2: 353-359.
168. Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38: 645-679.
169. Gilbert M, Bandelt H, Hofreiter M, Barnes I 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol* 20: 541-544.
170. Shapiro & Hofreiter 2012. Ancient DNA: methods and protocols (methods in molecular biology, vol. 840). Humana Press, pp. 259.
171. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
172. Miller W, Drautz DI, Ratan A, Pusey B, Qi J, Lesk AM, Tomsho LP, Packard MD, Zhao F, Sher A, Tikhonov A, Raney B, Patterson N, Lindblad-Toh K, Lander ES, Knight JR, Irzyk GP, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Pringle T, Schuster SC

2008. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456: 387-390.
173. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspinas AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prufer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Hober B, Hoffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PL, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328: 710-722.
 174. Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R, Bertalan M, Nielsen K, Gilbert MT, Wang Y, Raghavan M, Campos PF, Kamp HM, Wilson AS, Gledhill A, Tridico S, Bunce M, Lorenzen ED, Binladen J, Guo X, Zhao J, Zhang X, Zhang H, Li Z, Chen M, Orlando L, Kristiansen K, Bak M, Tommerup N, Bendixen C, Pierre TL, Gronnow B, Meldgaard M, Andreasen C, Fedorova SA, Osipova LP, Higham TF, Ramsey CB, Hansen TV, Nielsen FC, Crawford MH, Brunak S, Sicheritz-Ponten T, Villems R, Nielsen R, Krogh A, Wang J, Willerslev E 2010. Ancient human genome sequence of an extinct PalaeoEskimo. *Nature* 463: 757-762.
 175. Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PL, Maricic T, Good JM, Marques-Bonet T, Alkan C, Fu Q, Mallick S, Li H, Meyer M, Eichler EE, Stoneking M, Richards M, Talamo S, Shunkov MV, Derevianko AP, Hublin JJ, Kelso J, Slatkin M, Pääbo S 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468: 1053-1060.
 176. Bastos OM, Araújo A, Ferreira LF, Santoro A, Wincker P, Morel CM 1996. Experimental paleoparasitology: identification of *T. cruzi* DNA in desiccated mouse tissue. *Paleopathol News* 94: 5-8.
 177. Lutz A 1919. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11: 121-155.
 178. Adamska M, Leońska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B 2010. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. *Parasite* 17 (4): 299-305.

179. Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM 2009. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new Brazilian *Ascaris* sp. genotype. *Vet Parasitol* 163: 167-170.
180. Sudré AP 2012. Otimização da técnica da PCR e nested-PCR e genotipagem de *Giardia intestinalis* em caprinos de exploração leiteira [Tese de Doutorado: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica].
181. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17): 3389-3402.
182. Leles D 2010. Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761). [Tese de Doutorado: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro]. Pp. 162.
183. Golenberg EM, Bickel A, Weihs P 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res* 24: 5026-5033.
184. Leles D, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP, Iñiguez AM 2008. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-colombian South America times. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 106-108.
185. Chame M 2003. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 71-94.
186. Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, Macphee RD, Buigues B, Tikhonov A, Huson DH, Tomsho LP, Auch A, Rampp M, Miller W, Schuster SC 2006. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311 (5759): 392-394.
187. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35: 207-213.
188. Ortega YR & Bonavia D 2003. *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *J Parasitol* 83 (3): 635-636.
189. Le Bailly M 2005. 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 [PhD Thesis: Université de Rims Champagne Ardenne, Reims]

190. Mitchell PD, Stern E, Tepper Y 2008. Dysentery in the crusader kingdom of Jerusalem: an ELISA analysis of two medieval latrines in the City of Acre (Israel). *J Archaeol Sci* 35: 1849-1853.
191. Le Bailly M, Gonçalves MLC, Lefèvre C, Roper D, Pye JW, Araujo A, Bouchet F 2006. Parasitism in Kansas in the 1800s-A glimpse to the past through the analysis of grave sediments from Meadowlark cemetery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 53-56.
192. Bukhari Z & Smith HV 1995. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J Clin Microbiol* 33: 2592-2595.
193. Frías L, Leles D, Araújo A 2013. Studies on protozoa in ancient remains. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 108 (1): 1-12.
194. Boone JH, Wilkins TD, Nash TE, Brandon JE, Macias EA, Jerris RC, Lysterly DM 1999. TechLab and alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. *J Clin Microbiol* 37 (3): 611-614.
195. Rosoff JD & Stibbs HH 1986. Physical and chemical characterization of a *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of giardiasis. *J Clin Microbiol* 24 (6): 1079-1083.
196. Wing E 1986. Domestication of Andean mammals. Em: Vuilleumier F & Monasterio M. *High altitude tropical biogeography*. Oxford University Press, pp: 246-264.
197. Pallestrini L 1969. *Sítio arqueológico Fonseca*. Museu Paulista da Universidade de São Paulo, pp.104.
198. Geigl EM 2002. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* 44 (3): 337-342.
199. Rohland N & Hofreiter M 2007a. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2 (7): 1756-1762.
200. Rohland N & Hofreiter M 2007b. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 42 (3): 343-352.
201. Noonan JP, Hofreiter M, Smith D, Priest JR, Rohland N, Rabeder G, Krause J, Dettler JC, Pääbo S, Rubin EM 2005. Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 309 (5734): 597-599.

202. Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Pääbo S 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444: 330-336.
203. Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24 (7): 1304-1307.
204. Tuross N 1994. The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50 (6): 530-535.
205. Edwards CJ, MacHugh DE, Dobney KM, Martin L, Russell N, Horwitz LK, McIntosh SK, MacDonald KC, Helmer D, Tresset A, Vigne J-D, Bradley DG 2001. Ancient DNA analysis of 101 cattle remains: limits and prospects. *J Archaeol Sci* 31, 695-710.
206. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ 2003. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol* 45 (3): 203-217.
207. Meyer M, Briggs AW, Maricic T, Höber B, Höffner B, Krause J, Weihmann A, Pääbo S, Hofreiter M 2008. From micrograms to picograms: quantitative PCR reduces the material demands of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* 36(1): e5.
208. Confalonieri U, Ribeiro Filho BM, Ferreira LF, Araújo A 1985. The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. *Paleopathol News* 51: 9-11.
209. Araújo A 1988. Dessecação experimental de fezes contendo ovos de ancilostomídeos. Em: Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U. *Paleoparasitologia no Brasil*. Rio de Janeiro: PEC/ENSP, pp. 110-112.
210. Haile J, Holdaway R, Oliver K, Bunce M, Gilbert MTP, Nielsen R, Munch K, Ho SYW, Shapiro B, Willerslev E 2007. Sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Mol Biol Evol* 24 (4): 982-989.

ANEXO

Studies on protozoa in ancient remains - A Review

Liesbeth Frías¹, Daniela Leles², Adauto Araújo^{1/+}

¹Escola Nacional de Saúde Pública-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Paleoparasitological research has made important contributions to the understanding of parasite evolution and ecology. Although parasitic protozoa exhibit a worldwide distribution, recovering these organisms from an archaeological context is still exceptional and relies on the availability and distribution of evidence, the ecology of infectious diseases and adequate detection techniques. Here, we present a review of the findings related to protozoa in ancient remains, with an emphasis on their geographical distribution in the past and the methodologies used for their retrieval. The development of more sensitive detection methods has increased the number of identified parasitic species, promising interesting insights from research in the future.

Key words: paleoparasitology - mummies - coprolites - infectious diseases - protozoa - paleoepidemiology

Since the beginning of the last century, paleoparasitology has been focused on understanding the origin and evolution of infectious diseases, relying on archaeological and paleontological material to do so. A wide diversity of intestinal parasites has been retrieved from ancient remains, primarily from helminths (Gonçalves et al. 2003). However, although protozoa exhibit a global distribution, they are not recovered easily from archaeological contexts. This scarcity might be related to difficulties in detecting these organisms using traditional optical microscopy and to the sensitivity of parasitic structures, which are less resistant to taphonomic processes, leading to a low estimation of protozoa in the archaeological record.

This literature review aims to identify and summarise the geographic distribution of protozoa in the archaeological record, with an emphasis on protozoa associated with humans, including both intestinal and tissue parasites and the methodologies used to study them in ancient remains. An electronic database search was performed targeting studies on protozoa in the fields of paleoparasitology, archaeology and paleopathology and authors showing previous research efforts on this subject. The search comprised all publications found on this topic in PubMed and ScienceDirect and their bibliographies were screened as well. The data extracted from the literature included parasite species, archaeological sites and dates, the methods applied and the results of the studies. There were no exclusions related to publication dates or languages.

Methodological approaches to the identification of protozoa

Although macroscopic examinations of lesions are generally limited to making observations of body preservation and the presence of specific landmarks, this

technique is the most direct way of approaching disease in archaeological remains. For example, Chagas disease was diagnosed based on an altered large intestinal tract in a pre-Columbian mummy (Reinhard et al. 2003) and later confirmed via molecular biological methods (Dittmar et al. 2003). However, this finding was exceptional, as the majority of infectious diseases will not be detected using such methodology. Consulting historical documents provides an indirect method for approximating protozoan infections. By reviewing medical documents, autopsy reports and original death certificates recorded by court physicians, Gino Fornaciari et al. (2010a, b) reconstructed the medical history of one of the most influential families of the Italian Renaissance, the Medici (Nerlich et al. 2012).

In a similar manner, the origin of leishmaniasis in the Americas was discussed based on ethno-historical documents and anthropomorphic representations on Mochica ceramics (*huacos*) showing lesions similar to those found in mucous leishmaniasis (Altamirano-Enciso et al. 2003).

Microscopy has been the traditional method for parasite identification in paleoparasitological analyses and the first protozoa found in fossilised faeces (coprolites) were described using this technique (Pizzi & Schenone 1954, Witenberg 1961, Fouant et al. 1982). Unfortunately, most of these early findings were not accompanied by photographs or images, preventing comparisons with later studies.

Immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) have been the most commonly employed techniques for antigen recognition in ancient remains. Biochemical techniques were initially used in this field in 1989, when Faulkner et al. (1989) applied indirect immunofluorescence to identify *Giardia* cysts from human coprolites dated to $2,177 \pm 145$ years before present (BP). Since that time, various intestinal parasites have been successfully identified via these techniques in coprolites around the world (for a review, see Gonçalves et al. 2003).

With the development of methods for ancient DNA recovery, tracing parasitic diseases became possible. Analyses of ancient DNA in the field of paleoparasitology

Financial support: CNPq, FAPERJ

+ Corresponding author: adauto@ensp.fiocruz.br

Received 1 October 2012

Accepted 23 November 2012

tology were first performed in experimental animal mummies and demonstrated that molecular techniques could recover parasitic DNA from archaeological material (Bastos et al. 1996). In paleoparasitology, molecular biological methods have been used primarily for species confirmation, resulting in the identification of *falciparum* malaria, visceral leishmaniasis (VL) and Chagas disease. However, there are limitations to these techniques. The need to retrieve small DNA fragments from parasitic structures that are difficult to preserve and are usually associated with material of uncertain archaeological dates makes further analyses difficult.

Several parasites of animal species have been recovered from coprolites of human origin, suggesting false parasitism in some cases and zoonosis in others. Most of these studies have been performed on helminths. However, many of the infections considered to be zoonoses, such as cryptosporidiosis and giardiasis, can only be confirmed through molecular characterisation of genotypes and subgenotypes. No enteric protozoa have been identified by these methods to date. Nevertheless, beyond the application of these techniques for diagnostic purposes, they would expand the ability to study protozoan infections in the past.

A brief history of studies on protozoa in ancient remains

The analysis of protozoa in the archaeological record (Fig. 1) relies on the distribution and availability of ancient remains, the ecology of infectious diseases and the use of adequate detection techniques. Studies conducted in amber specimens have provided an idea of how old the association with protozoans is (Table I). The discovery of a trypanosomatid (of the genus *Paleoleishmania*) within a female sandfly in Cretaceous Burmese amber indicates that vector-borne parasites already existed by the Early Cretaceous (Poinar & Poinar 2004). The description of a trypanosomatid from faecal droplets adjacent to *Triatoma dominicana* provides the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association, dating to the mid-Tertiary era (Poinar 2005a). The presence of *Plasmodium*

dominicana in a Tertiary Dominican Republic amber specimen establishes a minimum age for the genus *Plasmodium* and places avian malaria in the Americas by the mid-Tertiary, supporting earlier theories that some species responsible for primate malaria could have evolved in the Americas (Poinar 2005b). Indirect evidence based on the frequency of erosive lesions found in tyrannosaurids suggests infection by a *Trichomonas gallinae*-like protozoan and represents the first report of an avian-transmissible disease in non-avian theropod dinosaurs (Wolff et al. 2009). Cysts similar to those of the extant genus *Entamoeba* have been preserved in coprolites from the Early Cretaceous, enabling the description of two new genera and species, *Entamoebites antiquus* (Poinar & Boucot 2006) and *Endamoebites proterus* (Poinar 2009). Unsporulated coccidian oocysts (*Archeococcidia antiquus* sp. nov. and *Archeococcidia nothotheriopsae* sp. nov.) have also been described in coprolites from a Shasta ground sloth (*Nothotheriops shastensis*) (Schmidt et al. 1992).

In addition, *Eimeria* oocysts from various animal species have been retrieved from archaeological contexts. The first such report refers to oocysts in deer coprolites dated to 9000 BP from northeastern Brazil, for which a new species (*Eimeria lobatoï*) was suggested (Ferreira et al. 1992) and oocysts of *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* have been detected in mummified camelids from Peru (Leguía et al. 1995, Leguía 1999). More recently, *E. macusaniensis* was recovered from various archaeological sites in Santa Cruz, Argentina (Fugassa & Barberena 2006, Fugassa & Guichón 2006, Fugassa 2007, Fugassa et al. 2007, Beltrame et al. 2010), where the host specificity of this species enabled more reliable identification of camelids in archaeological deposits. Furthermore, by comparing the dimensions of oocysts from these archaeological sites, a temporal trend was established indicating a size reduction over time (Fugassa et al. 2008). This discovery offers insight into host-parasite coevolution and paleoenvironmental changes.

A large number of publications have addressed the study of mummified human remains, which have shown preservation varying from excellent to very poor (Lyn-



Fig. 1: paleodistribution of enteric protozoa (white spots) and blood protozoa (black spots) in humans.

TABLE I
Summary of studies on protozoa in extinct animals^a

Protozoan	Origin (paleontological/archaeological site)	Period	Host	References
<i>Archeococcidia antiquus</i> sp. nov.	Rampart Cave, Grand Canyon (Arizona, USA)	10500 ± 180 BP	Shasta ground sloth (<i>Nothotheriops shastensis</i>)	Schmidt et al. (1992)
<i>Archeococcidia nothotheriopsae</i> sp. nov.	Burmese amber	Early Cretaceous	Sandfly	Poinar & Poinar (2004)
<i>Paleoleishmania proterus</i> gen. nov., sp. nov.	La Toca amber mine (Dominican Republic)	Mid-Tertiary	<i>Triatoma dominicana</i> sp. nov.	Poinar (2005a)
<i>Trypanosoma antiquus</i> sp. nov.	Dominican Republic amber	Mid-Tertiary	<i>Culex</i> mosquito	Poinar (2005b)
<i>Plasmodium dominicana</i> sp. nov.	Belgium	Early Cretaceous	<i>Iguanodon</i>	Poinar & Boucot (2006)
<i>Entamoebites antiquus</i>	Amber beds in Kachin (Burma)	Early Cretaceous	Sandfly larvae	Poinar (2007)
Free living trypanosomatids	Burmese amber	Early Cretaceous	Termite	Poinar (2009)
<i>Endamoebites proterus</i> gen. nov.			(<i>Kaloterme burmensis</i> sp. nov.)	
<i>Trichomonas gallinae</i> -like protozoan	North America	Latest Maastrichtian	Tyrannosaurids	Wolff et al. (2009)
<i>Eimeria lobatol</i>	Perna I, São Raimundo Nonato (Piauí, Brazil)	9000 BP	Deer	Ferreira et al. (1992)
<i>Eimeria macusaniensis</i> , <i>Eimeria ivitaensis</i>	Peru	1000 BP	Camelids	Leguia et al. (1995)
			(<i>Lama glama</i> , <i>Lama alpaca</i>)	
<i>E. macusaniensis</i>	Orejas de Burro 1	3978-3720 cal. year BP	Camelids	Fugassa & Barberena (2006)
	Nombre de Jesús	XVI century AD	Camelids	Fugassa & Guichón (2006)
	Cerro Casa de Piedra 7	8000 BP	Camelids	Fugassa (2007)
	Cerro Casa de Piedra	Middle Holocene	Felines	Fugassa et al. (2009)
		Late Holocene	Uncertain human origin	Beltrame et al. (2010)

a: all studies used microscopy as identification method, except for Wolff et al. (2009) who analysed erosive lesions; AD: *Anno Domini*; BP: before present.

nerup 2007). Soft tissue preservation depends on rapid dehydration overtaking postmortem decay and can be brought about either by natural conditions (a hot or very cold dry climate) or via artificial means (mortuary practices preventing degradation). Hence, the dry and salty climate of the Saharan and Atacama Deserts, the cold winds and permanent ice of the Andean Cordillera and the aridity of the Argentinean Pampas and Brazilian Savannah (*Cerrado* and *Caatinga*) present ideal conditions for tissue preservation. Similarly, bodies within sealed tombs are generally well preserved, facilitating the identification of diseases that do not necessarily leave traces in bone (Cockburn et al. 1998, Aufderheide 2003).

Enteric protozoa are expected to be found worldwide, as gastrointestinal infections represent one of the oldest and most common associations of infectious disease with humanity. In addition, these organisms do not require specific vectors, as they are generally transmitted by contaminated food and water. Blood protozoa, on the other hand, depend strongly on the distribution of their vectors and, consequently, on various environmental factors.

Forty-eight publications addressing protozoa found in human remains (Table II) were retrieved from the electronic databases, ranging from the year 1954–2012. The number of publications from the present century was equal to the number published from the 1950s–1990s. The first descriptions of enteric protozoa in archaeological remains were secondary to findings of larger parasites (Pizzi & Schenone 1954, Witenberg 1961, Faulkner et al. 1989). Subsequently and with the growing availability of commercial kits that enable parasite retrieval from coprolites, the number of studies on protozoa increased. For example, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum* and *Entamoeba* spp have been successfully identified in samples from both the New and the Old World, dating to between 5300 BP and the XIX century (Gonçalves et al. 2004, Le Bailly & Bouchet 2006).

Unlike enteric protozoa, blood protozoa have historically attracted the interest of more researchers, primarily because of their epidemiological importance in public health. The use of molecular techniques has enabled confirmation of Chagas disease in Andean mummies dating back to 9000 BP (Aufderheide et al. 2004) and falciparum malaria in ancient Egyptian mummies dating to 5200 BP (Miller et al. 1994, Cerutti et al. 1999, Rabino Massa et al. 2000, Nerlich et al. 2008).

Blood protozoa - Chagas disease in the pre-Columbian Americas - Trypanosoma cruzi, the causative agent of American trypanosomiasis, or Chagas disease, is transmitted through the faecal droppings of infected vectors from the subfamily Triatominae. *T. cruzi* is geographically restricted to the Americas and occurs primarily in Latin America, where it is endemic (Moncayo & Silveira 2009). Its paleodistribution was also constrained to the New World, comprising the Andean area, a small region in the Brazilian savannah and part of the Chihuahuan Desert in North America (Fig. 2, Table III).

Descriptions of cases of *T. cruzi* infections in the past are relatively abundant in the literature. The identification of amastigote nests in cardiac fibres from a Peruvian mummy (Fornaciari et al. 1992) and visceral lesions in Chilean mummies (Rothhammer et al. 1985) confirms the occurrence of both the infection and disease in pre-Columbian times. Humans were infected early in their history and were likely infected in various ways, depending on how they interacted with their environment. The existence of Chagas disease in pre-Columbian populations predates sedentism and domestication by several thousand years, suggesting other means of initial contagion. Some authors propose that accidental infection of humans occurred due to contact with natural *T. cruzi* foci (Guhl et al. 2000) and that human dwellings and domestication would have subsequently facilitated its establishment in domestic settings (Aufderheide et al. 2004). Various alternatives have been put forth regarding how this would have happened. The ingestion of raw infected meat was suggested as a potential route of infection by Neghme (1982), but archaeological evidence was not provided until almost 20 years later, when Reinhard et al. (2003) reported finding unburned bones and hair from woodrats in coprolites from an area where a case of Chagas disease was described and later molecularly confirmed (Dittmar et al. 2003). The occupation of caves and rock shelters, before dwellings were intro-

TABLE II
Publications on protozoa in ancient human remains

	Publications (n)		Total
	New World	Old World	
Enteric protozoa	10	5	15
Blood protozoa	16	17	33
Total	26	22	48



Fig. 2: paleodistribution of *Trypanosoma cruzi* studies in humans (white spots). Grey area approximately represents the current geographic extent of Chagas disease in Central and South America (adapted from Silveira 1999).

TABLE III
Summary of studies on *Trypanosoma cruzi* in ancient human remains

Origin (archaeological site)	Period	Methods	Results (positive/total analysed)	References
Tarapaca Gully (Chile)	2400-1600 BP 470 BC-600 AD	Paleopathology Paleopathology	11/22 12/22	Rothhammer et al. (1984) Rothhammer et al. (1985)
Inca mummy (Peru)	XV-XVI century AD	Immunohistochemistry and electron microscopy	1/1	Fornaciari et al. (1992)
Atacama mummies (Chile)	2000 BC-200 BP 4000 BP	DNA DNA	9/27 11/31	Guhl et al. (1997, 1999) Guhl et al. (2000)
Andean mummies	2000 BP-1400 AD	DNA	4/6	Ferreira et al. (2000)
Chihuahuan Desert (Texas, USA)	~4000 BP 1150 BP	DNA Paleopathology	25/27 fragments 1/1	Madden et al. (2001) Reinhard et al. (2003)
Northern Chile, southern Peru	~9000 BP-450 BP	DNA	1/1	Dittmar et al. (2003)
Pre-Columbian mummies (Bolivia)	3600-900 BP	DNA	115/283	Aufderheide et al. (2004)
Peruaçu Valley (Minas Gerais, Brazil)	7000-4500 BP 560 ± 40 BP	DNA DNA	11/29 1/1	Orellana (2008) Lima et al. (2008)
			7/7	Fernandes et al. (2008)

AD: Anno Domini; BC: before Christ; BP: before present.

duced, would also have increased the risk of infection by triatomine species adapted to live in rocks (Araújo et al. 1998, Ferreira et al. 2000). The *T. cruzi* infections described from the archaeological record were reviewed by Ferreira et al. (2011) regarding the origin and spread of Chagas disease.

Malaria - Human malaria is one of the most common infectious diseases in the world. It is transmitted by infected female mosquitoes of the genus *Anopheles*, which inject malaria parasites while feeding. There are five species known to infect humans, among which *Plasmodium falciparum* accounts for the death of more than one million people every year (Snow et al. 2005). This infection exhibits a widespread distribution in tropical and subtropical areas, with the highest transmission currently found in the Amazonas, Sub-Saharan Africa, India and parts of Oceania (CDC 2012).

Studies in ancient remains have provided evidence of endemic malaria in Egypt and Italy (Fig. 3, Table IV), where proximity to river valleys would have resulted in a high risk of acquiring malaria, as river flooding produces perfect breeding sites for mosquitoes. Despite the lack of treatments for malaria and references to disease symptoms in ancient Egyptian texts, some texts do note the presence of mosquitoes and the use of nets to avoid them (Strouhal 1992, Nunn 2001, Herodotus 2008). Symptoms including an enlarged spleen accompanied by fever are mentioned in the Papyrus Ebers (Ebbell 1937), but no clear description of malaria is given. In the vicinity of the Tiber, the discovery of a large Roman children's cemetery, dating to 430 BC (Soren et al. 1995), suggests that an epidemic outbreak of malaria occurred, as falciparum malaria is known to cause a high rate of premature deliveries in non-immune pregnant women.

It is worth noting that malaria antigen detection tests are not as sensitive as microscopy. Although some researchers have been able to recover *P. falciparum* histidine-rich protein 2 using the ParaSight™-F test (Miller et al. 1994, Cerutti et al. 1999), some of these results were not reproducible in further investigations (Taylor et al. 1997). Subsequently, studies on living patients showed cross-reaction of the monoclonal IgG antibody used in this test with the rheumatoid factor in blood, resulting in false positive tests for malaria (Iqbal et al. 2000, Moody 2002).

The occurrence of malaria in the Americas has been subject to great debate among historians (for a review, see Bruce-Chwatt 1965). Those defending its pre-Columbian presence argue that there is linguistic evidence indicating the symptoms of the disease (Guerra 1964, cited in Bruce-Chwatt 1965, p. 378) and botanical evidence of the therapeutic use of cinchona bark (Jaramillo-Arango 1950, cited in Bruce-Chwatt 1965, p. 379). Nevertheless, the historical evidence for and against a pre-Columbian existence of malaria is controversial; there are no known references to the disease nor to the cinchona plant in the available written records from the Incas, Mayas or Aztecs. Moreover, for one or two generations after the first arrival of the Spaniards, there were no reports of diseases that might be considered to be ma-

alaria, not even in localities that were later known to be associated with a high malaria burden (Ashburn 1947). Regarding the use of bark, it is believed that the native Indians of Peru would have transmitted their knowledge of its use to Jesuit missionaries after the Conquest, in 1527 (Bruce-Chwatt 1965). Recent phylogenetic analyses and Approximate Bayesian Computation methods suggest independent introductions of two clusters of *P. falciparum* from African origins in South America, favouring multiple introductions from Africa during the transatlantic slave trade (Yalcindag et al. 2012).

Leishmaniasis - Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. It is endemic in southern Europe, North Africa, the Middle East, Central and South America and India (Piscopo & Azzopardi 2007). Infections involving this parasite are regarded as cutaneous (CL), mucocutaneous (ML) or VL, which present different geographic distributions and clinical manifestations. More than 90% of all VL cases occur in India, Bangladesh, Nepal, Sudan, Ethiopia and Brazil, 90% of all CL is reported in Afghanistan, Algeria, Iran, Saudi Arabia, Syria, Brazil, Colombia, Peru and Bolivia and more than 90% of all cases of ML occur in Bolivia, Brazil, Ethiopia and Peru (WHO 2012).

The antiquity of leishmaniasis in the New World has been inferred from the existence of *huacos* with facial mutilations, references from chroniclers of the Conquest and Colonial Period and the persistence of some *quechua* words that make allusions to the disease (Altamirano-Enciso 2000). The evidence of *Leishmania* in the archaeological record is scarce. The presence of these parasites in the high-altitude Atacama Desert, where the disease is not normally found, suggests a pattern of mobility from endemic areas (Costa et al. 2009, Marsteller et al. 2011) dating to as early as 1000 BP (Fig. 4, Table V). An analogous situation was proposed for leishmaniasis in Egypt, where expeditions to Nubia (modern Sudan), currently a highly endemic country

for VL (Zink et al. 2006), would explain the high incidence of *Leishmania* DNA in the Middle Kingdom, as opposed to its absence in earlier or later periods. *Leishmania infantum* was recently identified in Eleanor of Toledo (1522-1562), a Spanish noble woman and wife of Cosimo I de' Medici and in mummies from the Brazilian Colonial Period, 1530-1815 (ongoing research), which is in accordance with studies confirming the recent importation of this parasite into the New World from southwest Europe (Kuhls et al. 2011).

Enteric protozoa - Paleoparasitological evidence of protozoans is scarce. Because their cysts and oocysts are fragile microstructures compared to helminth eggs, the identification of these organisms from archaeological remains via optical microscopy has been infrequent. The application of ELISA greatly improved the detection of protozoa infections in coprolites and latrine soils in the Americas and Europe (Table VI) and Gonçalves et al. (2002) concluded that the sensitivity of this technique was greater than that offered by microscopy for diagnosing *G. duodenalis*. *Cryptosporidium* spp and *G. duodenalis* have been identified based on immunofluorescence analysis in archaeological remains in Peru, dating to as early as 4300 BP (Ortega & Bonavia 2003), while in Europe, Le Bailly et al. (2008) identified *G. duodenalis* in samples from medieval times using immunofluorescence and ELISA. More recently, the detection of *G. duodenalis* and *Entamoeba histolytica* in archaeological samples from the Middle East has confirmed written evidence of the occurrence of infective diarrhoea in the Crusader period (Mitchell et al. 2008).

The case of *Toxoplasma gondii* - *T. gondii* is a widespread zoonotic protozoan that infects most species of mammals, birds, fish, amphibians and reptiles. To detect this parasite in ancient remains, one of the following scenarios must occur. In the first scenario, the infective stage of the parasite (oocysts) must be found in the co-



Fig. 3: paleodistribution of *Plasmodium falciparum* studies in humans (white spots). Grey area approximately represents the current geographic distribution of the disease (CDC 2012).

TABLE IV
Summary of studies on *Plasmodium falciparum* in ancient human remains

Origin (archaeological site)	Period	Methods	Results (positive/total analysed)	References
Arab-Persian Gulf	Hellenistic	Electronic microscopy	NI	Maat & Baig (1990)
Egyptian and Nubian mummies	5200-1450 BP	Immunoenzymatic assay	7/18	Miller et al. (1994)
Granville mummy (Kurna)	700 BC	DNA	0/1	Taylor et al. (1997)
Egyptian mummies (Assiut-Gebelein)	3200 BC	Immunoenzymatic assay	34/80	Cerutti et al. (1999), Rabino Massa et al. (2000)
Egyptian mummies	1800-1400 AD, 1500-500 BC	DNA	NI	Zink et al. (2001)
Lugnano, Teverina (Italy)	V century AD	DNA	1/5	Abbott (2001), Sallares & Gomzi (2001), Sallares et al. (2004)
Egyptian mummy (Gebelein)	2820-2630 BC	Immunoenzymatic assay	1/1	Bianucci et al. (2008)
Egyptian mummies (Abydos/Thebes)	3500-500 BC	DNA	2/91	Nerlich et al. (2008)
Francesco I of Medici (Italy)	1531-1587 AD	Immunoenzymatic assay	2/2	Fornaciari et al. (2010a)
Medici family (Italy)	XVI century AD	Immunoenzymatic assay	4/6	Fornaciari et al. (2010b)
Ancient Egyptian mummies	1550-1324 BC	DNA	4/16	Hawass et al. (2010)

AD: Anno Domini; BC: before Christ; BP: before present; NI: not informed.

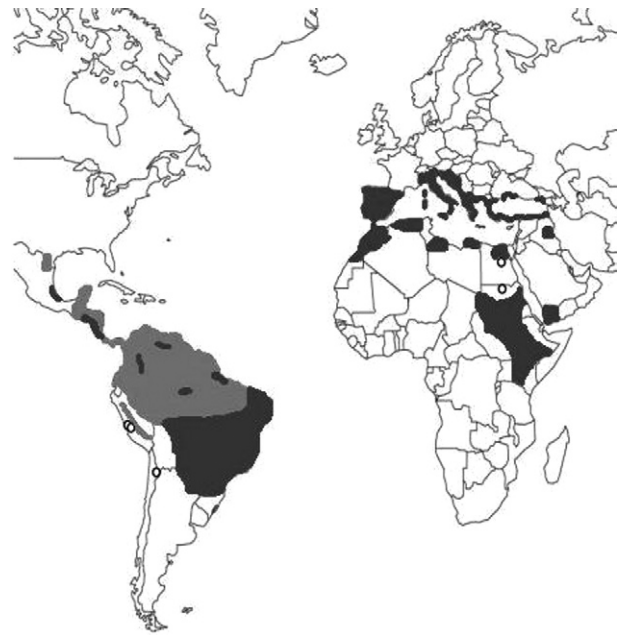


Fig. 4: paleodistribution of *Leishmania* spp studies in humans (white spots). Grey areas approximately represent the current distribution of visceral leishmaniasis (dark grey) and cutaneous-mucocutaneous (light grey) in the New World.

prolites of felids, as they are the only definitive host for *T. gondii*. In the second scenario, encysted forms of the parasite (bradyzoites) have to be retrieved from various tissues of the body, either from intermediary hosts (animals, including humans) or infected cats. The complex life cycle of *T. gondii* limits the potential for its identification in coprolites because, although its oocysts are shed in the faeces of adult cats in some cases, oocyst excretion usually occurs only in young felids, which are less immunocompetent (Dubey et al. 1977, Dubey 1995). *Toxoplasma* has not yet been detected in ancient remains, although successful recovery of its DNA has been accomplished from desiccated mouse tissue (Terra et al. 2004). Although methodological difficulties must be considered, the worldwide dispersion of the infection today suggests the possibility of finding the parasite through systematic examinations of mummies and archaeological remains.

The ecology of infectious diseases in humans entails more than the risk of acquiring an infection. It also involves the likelihood of exposure, the conditions of establishment and favourable circumstances that lead to successful transmission. While adapting to harsh environments, human populations have become part of various parasitic life cycles. For malaria, proximity to marshy areas favours the incidence of disease, as seen in the Nile Delta (Rabino Massa et al. 2000) and the fringes of the Tiber valley (Sallares & Gomzi 2001). Additionally, members of the Medici family are known to have hunted in areas of Tuscany endemic for malaria (Fornaciari et al. 2010a, b). Chagas disease is thought to have originated from a human intrusion into the *T. cruzi* syl-

TABLE V
Summary of studies on *Leishmania* spp in ancient human remains

Protozoan	Origin (archaeological site)	Period	Methods	Results (positive/total analysed)	References
<i>Leishmania</i> spp	Makat-tampu (Peru)	Inca	Paleopathology	5/241	Altamirano-Enciso (2000)
	Peru	800 BC	Immunohistology	NI	Guillen & Allison (2005)
	Coyo Oriente (Atacama)	1000-500 BP	Paleopathology	4/255	Costa et al. (2009)
<i>Leishmania donovani</i>	Egyptian mummies (Abydos/Thebes)	3500 BC-500 BC	DNA	3/4	Zink et al. (2006)
	Nubian mummies (Kulubnarti)	1500-550 AD	DNA	4/91	
<i>Leishmania infantum</i>	Eleonora from Toledo (Italy)	1522-1562 AD	NI	9/70	Nerlich et al. (2012)
			DNA	1/1	
			protein assay	1/1	

AD: Anno Domini; BC: before Christ; BP: before present; NI: not informed.

TABLE VI
Summary of studies on enteric protozoa in ancient human remains

Protozoan	Origin (archaeological site)	Period	Methods	Results (positive/total analysed)	References
<i>Giardia duodenalis</i>	Nahal-Mishmar (Israel)	160 AD	Microscopy	NI/2	Witenberg (1961)
	Big Bone Cave, Tennessee (USA)	2177 ± 145 BP	IFA	NI/8	Faulkner et al. (1989)
	Pre-Columbian mummies (Andes)	3000-500 BP	IFA	7/20	Allison et al. (1999)
			ELISA	2/7	
	Antelope House, Arizona (USA)	1200-1300 AD	ELISA	3/83	Gonçalves et al. (2002)
	Lübeck (Germany)	1500-1600 AD			
	Namur (Belgium)	XVIII century AD			
	Los Gavilanes (Peru)	2375-1525 BC	IFA	1/18	Ortega & Bonavia (2003)
	Manache (Peru)	500-900 AD		1/2	
	Chevennez (Switzerland)	VII-IX century AD	ELISA	5/5	Le Bailly (2005)
	La Mothe (France)	X-XI century AD	ELISA, IFA	1/9	Le Bailly et al. (2008)
	Acre (Israel)	XIII century AD	ELISA	1/8	Mitchell et al. (2008)



Protozoan	Origin (archaeological site)	Period	Methods	Results (positive/total analysed)	References
<i>Entamoeba</i> spp	El Plomo (Chile)	Pre-Columbian	Microscopy	1/1	Pizzi & Schenone (1954)
	Nahal-Mishmar (Israel)	160 AD	Microscopy	NI/2	Witenberg (1961)
	Huari (Peru)	Pre-Columbian	Microscopy, ELISA	2/7, 0/3	Fouant et al. (1982)
	Alto Ramírez (Chile)			2/11, 0/9	
	Atacama (Chile)			3/26, 0/21	
	Cabuza (Chile)			3/29, 0/20	
	Tihuanaco (Chile)			1/5, 0/5	
	Fortin Minana (Argentina)	XIX century AD	ELISA	9/11	Gonçalves et al. (2004)
	Namur (Belgium)	XIV-XVIII century AD	ELISA	2/12	
	Castillon-du-Gard (France)	III century AD	ELISA	2/14	
	Gresine (France)	2500 BP	ELISA	1/5	
	Arbon (Switzerland)	5300 BP	ELISA	3/5	
	Canyon De Chelly (USA)	800-700 BP	ELISA	3/17	
	Hornstaad-Hörnle I, Stockwiesen, Torwiesen II, Taschenwiese, Gründwiesen (Germany)	3900-2500 BC	ELISA	0/30	Le Bailly & Bouchet (2006)
	Arbon-Bleiche 3, Chevenez (Switzerland)	3400 BC-IX century AD	ELISA	5/11	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Chalain, Lattes, Pineuilh, Épinal (France)	3200 BC-XVII century AD	ELISA	4/23	
	Vilnius (Lithuania)	XIX century AD	ELISA	0/6	
	Kouphovouno (Greece)	5000-2000 BC	ELISA	5/5	
	Alexandria, Saqqarah (Egypt)	715 BC-VII century AD	ELISA	0/11	
	Sai (Nubia)	275 BC-350 AD	ELISA	0/3	
	Shillourokambos (Cyprus)	7500-7000 BC	ELISA	0/3	
	Qumram (Israel)	100 BC	ELISA	0/2	
	Meadowlark (USA)	XIX century AD	ELISA	3/5	Le Bailly & Bouchet (2006), Le Bailly et al. (2006)
	Acre (Israel)	XIII century AD	ELISA	6/8	Mitchell et al. (2008)
	Andes (Chile-Peru)	3000-500 BP	ELISA	8/15	Allison et al. (1999)
	PV35-4 (Peru)	770-830 AD	IFA	1/2	Ortega & Bonavia (2003)
	Acre (Israel)	XIII century AD	ELISA	0/8	Mitchell et al. (2008)
	La Mothe (France)	X-XI century AD	IFA	0/9	Le Bailly et al. (2008)
	Nahal-Mishmar (Israel)	160 AD	Microscopy	NI/2	Witenberg (1961)
	Andes (Chile-Peru)	3000-500 BP	IFA	16/20	Allison et al. (1999)
<i>Chilomastix mesnili</i>				2/20	
<i>Isoospora belli</i>				1/20	
<i>Cyclospora cayentanensis</i>					
<i>Sarcocystis hominis</i>					

AD: Anno Domini; BC: before Christ; BP: before present; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IFA: indirect fluorescent antibody test; NI: not informed.

vatic cycle, gradually transitioning into a domestic cycle (Aufderheide et al. 2004, Araújo et al. 2009, Ferreira et al. 2011) and leishmaniasis would have increased in the New World due to travel to endemic zones or migration from such areas (Costa et al. 2009).

The probability of detecting parasites is sometimes enhanced by the methodology applied. Studies on enteric protozoa have increased with the availability of commercial kits that facilitate the processing of a large number of samples simultaneously. Molecular biological techniques offer a more sensitive methods to retrieve information from archaeological contexts and even though limitations associated with ancient DNA must be considered (such as sample preservation, age and contamination), examination of enteric protozoa using these means would offer an interesting perspective on the zoonotic potential of *Giardia* spp and *Cryptosporidium* spp in the archaeological record, an emphasis that has not yet been explored in the literature.

REFERENCES

- Abbott A 2001. Earliest malaria DNA found in Roman baby graveyard. *Nature* 412: 847.
- Allison MJ, Bergman T, Gerszten E 1999. Further studies on parasites in antiquity. *Am J Clin Pathol* 112: 605-609.
- Altamirano-Enciso AJ 2000. *Comprometiendo la estructura osteofacial de las poblaciones humanas del antiguo Perú por la leishmaniasis tegumentaria de forma mucosa*, PhD Thesis, ENSP/Fiocruz, Rio de Janeiro, 213 pp.
- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 10: 853-882.
- Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF 2009. Paleoparasitology of Chagas disease - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 9-16.
- Araújo A, Reinhard K, Bastos OM, Costa LC, Pirmez C, Iñiguez AM, Vicente AC, Morel CM, Ferreira LF 1998. Paleoparasitology: perspectives with new techniques. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40: 371-376.
- Ashburn PM 1947. *The ranks of death. A medical history of the Conquest of America*, Frank D. Ashburn, New York, 298 pp.
- Aufderheide A 2003. *The scientific study of mummies*, Cambridge University Press, Cambridge, 496 pp.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M 2004. A 9,000-year record of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039.
- Bastos OM, Araújo A, Ferreira LF, Santoro A, Wincker P, Morel CM 1996. Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mouse tissue. *Paleopathol Newsl* 94: 5-8.
- Beltrame MO, Fugassa MH, Sardella NH 2010. First paleoparasitological results from late Holocene in Patagonian coprolites. *J Parasitol* 96: 648-651.
- Bianucci R, Mattutino G, Lallo R, Charlier PH, Jouin-Spriet H, Peluso A, Higham T, Torre C, Rabino Massa E 2008. Immunological evidence of *Plasmodium falciparum* infection in a child mummy from the Early Dynastic Period. *J Archaeol Sci* 35: 1880-1885.
- Bruce-Chwatt LJ 1965. Paleogenesis and paleo-epidemiology of primate malaria. *Bull World Health Organ* 32: 363-387.
- CDC - Centers for Diseases Control and Prevention 2012. Malaria. [updated 2012 April 17, cited 2012 June 12]. Available from: cdc.gov/malaria/.
- Cerutti N, Marin A, Massa ER, Savoia D 1999. Immunological investigation of malaria and new perspectives in paleopathological studies. *Boll Soc Ital Biol Sper* 75: 17-20.
- Cockburn A, Cockburn E, Reyman TA 1998. *Mummies, disease and ancient cultures*, Cambridge University Press, Cambridge, 428 pp.
- Costa MA, Matheson C, Iachetta L, Llagostera A, Appenzeller O 2009. Ancient leishmaniasis in a highland desert of northern Chile. *PLoS ONE* 4: e6983.
- Dittmar K, Jansen AM, Araújo A, Reinhard K 2003. Molecular diagnosis of prehistoric *T. cruzi* in the Texas-Coahuila border region. *Paleopathol Newsl* (Suppl.): 4.
- Dubey JP 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol* 81: 410-415.
- Dubey JP, Hoover EA, Walls KW 1977. Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. *J Eukaryot Microbiol* 24: 184-186.
- Ebbell 1937. *The Papyrus Ebers, the greatest Egyptian medical document*, Levin & Munksgaard, Copenhagen, 135 pp.
- Faulkner C, Patton S, Johnson S 1989. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *J Parasitol* 75: 461-463.
- Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Mendonça de Souza SMF, Ferreira LF, Vicente ACP, Jansen AM 2008. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 514-516.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Chame M, Ribeiro B 1992. *Eimeria* oocysts in deer coprolites dated from 9,000 years BP. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. I): 105-106.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop* 75: 79-84.
- Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A 2011. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc* 83: 1041-1044.
- Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Tognetti A, Bevilacqua G, Segura E 1992. Chagas disease in a Peruvian Inca mummy. *Lancet* 339: 128-129.
- Fornaciari G, Giuffra V, Ferroglio E, Gino S, Bianucci R 2010a. Malaria was the killer of Francesco I de Medici (1531-1587). *Am J Med* 123: 568-569.
- Fornaciari G, Giuffra V, Ferroglio E, Gino S, Bianucci R 2010b. *Plasmodium falciparum* immunodetection in bone remains of members of the Renaissance Medici family (Florence, Italy, sixteenth century). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 583-587.
- Fouant MM, Allison M, Gerszten E, Focacci G 1982. Parásitos intestinales entre los indígenas precolombinos. *Chungara* 9: 285-295.
- Fugassa MH 2007. Camélidos, parásitos y ocupaciones humanas: registros paleoparasitológicos en Cerro Casa de Piedra 7 (Parque Nacional Perito Moreno, Santa Cruz, Argentina). *Intersecciones antropol* 8: 265-269.
- Fugassa MH, Araújo A, Sardella N, Denegri GM 2007. New paleoparasitological finding in caves from Patagonia, Argentina. *Paleopathol Newsl* 137: 17-21.
- Fugassa MH, Barberena R 2006. Cuevas y zoonosis antiguas: paleoparasitología del sitio Orejas de Burro 1 (Santa Cruz, Argentina). *Magallania* (Punta Arenas) 34: 57-62.

- Fugassa MH, Beltrame MO, Bayer MS, Sardella NH 2009. Zoonotic parasites associated with felines from the Patagonian Holocene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1177-1180.
- Fugassa MH, Guichón RA 2006. Nuevos aportes a la paleoparasitología del sitio arqueológico "Nombre de Jesús" (S. XVI), Cabo Virgenes, Argentina. *Rev Arg Antrop Biol* 8: 73-83.
- Fugassa MH, Sardella NH, Taglioretti V, Reinhard KJ, Araújo A 2008. Eimeriid oocysts from archaeological samples in Patagonia, Argentina. *J Parasitol* 94: 1418-1420.
- Gonçalves MLC, Araújo A, Duarte R, Pereira da Silva J, Reinhard K, Bouchet F, Ferreira LF 2002. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 640-643.
- Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 103-118.
- Gonçalves MLC, Silva V, Andrade C, Rocha G, Le Bailly M, Bouchet F, Ferreira LF, Araújo A 2004. Amoebiasis distribution in the past: first steps in using an immunoassay technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 88-91.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, A-Arroyo FC, Aufderheide A 2000. Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 553-555.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, A-Arroyo FC, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC 1999. Isolation of *T. cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 108: 401-407.
- Guhl F, Jaramillo C, Yockteng R, Vallejo GA, A-Arroyo FC 1997. *T. cruzi* DNA in human mummies. *Lancet* 349: 1370.
- Guillen S, Allison M 2005. An early case of South American leishmaniasis in Peru, 1st PAMinSA, Rio de Janeiro, p. 61.
- Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, Ahmed A, Elleithy H, Ball M, Gaballah F, Wasef S, Fateen M, Amer H, Gostner P, Selim A, Zink A, Pusch CM 2010. Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. *JAMA* 303: 638-647.
- Herodotus 2008. *The histories*, Oxford University Press, Oxford, p. 840 pp.
- Iqbal J, Sher A, Rab A 2000. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factor. *J Clin Microbiol* 38: 1184-1186.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönián G 2011. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent world origin. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1155.
- Le Bailly M 2005. *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*, PhD Thesis, Université de Rims Champagne Ardenne, Reims, 291 pp.
- Le Bailly M, Bouchet F 2006. Paléoparasitologie et immunologie: l'exemple d'*Entamoeba histolytica*. *Archéosciences* 30: 129-135.
- Le Bailly M, Gonçalves MLC, Harter-Lailheugue S, Prodéo F, Araújo A, Bouchet F 2008. New finding of *Giardia intestinalis* (Eukaryote, Metamonad) in Old World archaeological site using immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 298-300.
- Le Bailly M, Gonçalves MLC, Lefèvre C, Roper DC, Pye JW, Araújo A, Bouchet F 2006. Parasitism in Kansas in the 1800s. A glimpse to the past through the analysis of grave sediments from Meadowlark cemetery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. II): 53-56.
- Leguía GP 1999. *Enfermedades parasitarias de camélidos sudamericanos*, De Mar, Lima, 190 pp.
- Leguía GP, Casas AE, Wheeler J 1995. Parasitismo en camélidos prehistóricos. *Parasitol dia* 19: 435.
- Lima VS, Iñiguez AM, Otsuki K, Fernando Ferreira L, Araújo A, Vicente AC, Jansen AM 2008. Chagas disease in ancient hunter-gatherer populations, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 1001-1002.
- Lynnerup N 2007. Mummies. *Yearb Phys Anthropol* 50: 162-190.
- Maat G, Baig M 1990. Scanning electron microscopy of fossilized sickle-cells. *Int J Anthropol* 5: 2716.
- Madden M, Salo WL, Streitz J, Aufderheide A, Fornaciari G, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Arriaza B, A-Arroyo FC, Guhl F 2001. Hybridization screening of very short PCR products for paleoepidemiological studies of Chagas disease. *Biotechniques* 30: 102-104.
- Marsteller SJ, Torres-Rouff C, Knudson KJ 2011. Pre-Columbian Andean sickness ideology and the social experience of leishmaniasis: a contextualized analysis of bioarchaeological and paleopathological data from San Pedro de Atacama, Chile. *Int J Paleopathol* 1: 24-34.
- Miller RL, Ikram S, Armelagos GJ, Walker R, Harer WB, Shiff CJ, Baggett D, Carrigan M, Maret SM 1994. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F Test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 31-32.
- Mitchell PD, Stern E, Tepper Y 2008. Dysentery in the crusader kingdom of Jerusalem: an ELISA analysis of two medieval latrines in the city of Acre (Israel). *J Archaeol Sci* 35: 1849-1853.
- Moncayo A, Silveira AC 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 17-30.
- Moody A 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 15: 66-78.
- Neghme A 1982. La tripanosomiasis en América. *Creces* 3: 23-28.
- Nerlich AG, Bianucci R, Trisciunglio A, Schönián G, Ball M, Giuffra V, Bachmeier B, Pusch CM, Ferroglio E, Fornaciari G 2012. Leishmaniasis during Italian Renaissance, 1522-1562. *Emerg Infect Dis* 18: 184-186.
- Nerlich AG, Schraut B, Dittrich S, Jelinek TH, Zink A 2008. *Plasmodium falciparum* in Ancient Egypt. *Emerg Infect Dis* 14: 1317-1318.
- Nunn JF 2001. *Oxford Encyclopedia of Ancient Egypt*, American University in Cairo Press, Cairo, 398 pp.
- Orellana NCH 2008. *Paleogenética de populações pré-colombianas da Bolívia: análise do mtDNA humano e infecção por Trypanosoma cruzi e vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV)*, MsD Thesis, Fiocruz, Rio de Janeiro, 85 pp.
- Ortega YR, Bonavia D 2003. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *J Parasitol* 83: 635-636.
- Piscopo TV, Azzopardi CM 2007. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 83: 649-657.
- Pizzi T, Schenone H 1954. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en el contenido intestinal de un cuerpo arqueológico arcaico Inca. *Bol Chil Parasitol* 9: 73-75.
- Poinar Jr G 2005a. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stereocoria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 72-81.

- Poinar Jr G 2005b. *Plasmodium dominicana* n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. *Syst Parasitol* 61: 47-52.
- Poinar Jr G 2007. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 635-637.
- Poinar Jr G 2009. Description of an early Cretaceous termite (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution. *Parasit Vectors* 2: 12.
- Poinar Jr G, Boucot AJ 2006. Evidence of intestinal parasites of dinosaurs. *Parasitology* 133: 245-249.
- Poinar Jr G, Poinar R 2004. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist* 155: 305-310.
- Rabino Massa E, Cerutti N, Savoia D 2000. Malaria in ancient Egypt: paleoimmunological investigations in predynastic mummified remains. *Chungara* 32: 7-9.
- Reinhard K, Fink TM, Skiles J 2003. A case of megacolon in Rio Grande Valley as a possible case of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1): 165-172.
- Rothhammer F, Standen V, Núñez L, Allison MJ, Arriaza B 1984. Origen y desarrollo de la tripanosomiasis en el área Centro-Sur Andina. *Chungara* 12: 155-160.
- Rothhammer F, Standen V, Núñez L, Allison MJ, Arriaza B 1985. Chagas disease in Pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol* 68: 495-498.
- Sallares R, Bouwman A, Anderung C 2004. The spread of malaria to southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med Hist* 48: 311-328.
- Sallares R, Gomzi S 2001. Biomolecular archaeology of malaria. *Anc Biomol* 3: 195-213.
- Schmidt GD, Duszynski DW, Martin PS 1992. Parasites of the extinct Shasta ground sloth, *Nothrotheriops shastensis*, in Rampart Cave, Arizona. *J Parasitol* 78: 811-816.
- Silveira AC 1999. Current situation with the control of vector borne Chagas disease transmission in the Americas. In *Atlas of Chagas disease vector in the Americas*, 1st ed., Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 1161-1181.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434: 214-217.
- Soren D, Fenton T, Birkby W 1995. The late Roman infant cemetery near Lugano in Teverina, Italy: some implications. *J Paleopathol* 7: 13-42.
- Strouhal E 1992. *Life of the ancient Egyptians*, American University in Cairo Press, Cairo, 280 pp.
- Taylor GM, Rutland P, Molleson T 1997. A sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Plasmodium* species DNA in ancient human remains. *Anc Biomol* 1: 193-203.
- Terra MABL, Bello AR, Bastos OM, Amendoeira MRR, Coelho JMCO, Ferreira LF, Araújo A 2004. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in experimentally desiccated tissues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 185-188.
- WHO - World Health Organization 2012. Leishmaniasis. [updated 2012; cited 2012 June 12]. Available from: who.int/topics/leishmaniasis/en/.
- Witenberg G 1961. Human parasites in archaeological findings. *Bull Israel Ex Soc* 25: 86.
- Wolff EDS, Salisbury SW, Horner JR, Varricchio DJ 2009. Common avian infection plagued the tyrant dinosaurs. *PLoS ONE* 4: e7288.
- Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson TJ, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau H, Carnevale P, D'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestre A, Mayxay M, Ménard D, Musset L, Newton PN, Nkoghé D, Noya O, Ollomo B, Rogier C, Veron V, Wide A, Zakeri S, Carme B, Legrand E, Chevillon C, Ayala FJ, Renaud F, Prugnolle F 2012. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 511-516.
- Zink A, Haas CJ, Herberth K, Nerlich AG 2001. PCR amplification of *Plasmodium* DNA in ancient human remains. *Anc Biomol* 3: 293.
- Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD 2006. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerg Infect Dis* 12: 1616-1617.