

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Zájmově chovaná zvířata jako zdroj zoonotických kryptosporidií

Ing. Veronika Zikmundová

**České Budějovice
2026**

Autoreferát disertační práce

Doktorand: **Ing. Veronika Zikmundová**
Studijní program: Obecná zootechnika
Studijní obor: Obecná zootechnika
Název práce: Zájmově chovaná zvířata jako zdroj zoonotických kryptosporidií
Školitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Oponenti: doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D.
 RNDr. Jana Ježková, PhD.
 doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Datum a místo konání obhajoby disertační práce bude upřesněno na úřední desce studijního oddělení Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

- GAJU 049/2023/Z – Ještěr hadovi hrozbou: diverzita, detekce a biologie kryptosporidií zodpovědných za úhyny v chovech plazů (2023; řešitelka: **Ing. Veronika Zikmundová**).
- GAJU 049/2024/Z – *Cryptosporidium* sp. lizard genotyp: kryptosporidie, která by neměla existovat (2024; řešitelka: **Ing. Veronika Zikmundová**).
- GAČR 21-23773S – Žaludeční kryptosporidie savců: Poodhalení tajemství jejich adaptace na hostitele a genové regulace během infekce. (2021–2024; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).
- GAJU 005/2022/Z – One Health: genetic, environmental and technological factors affecting animal production, food quality and safety, and animal and human health. (2022–2024; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

ANOTACE

Kryptosporidie jsou obligátní jednobuněční eukaryotičtí paraziti patřící do kmene Apicomplexa infikující gastrointestinální trakt a dýchací cesty hostitelů v rámci všech tříd obratlovců, včetně člověka. Během posledního desetiletí prospektivní studie v rozvojových zemích identifikovaly kryptosporidie jako hlavní příčinu průjemového onemocnění u lidí. V posledních 20 letech se naše znalosti o genetické rozmanitosti a biologii těchto parazitů značně rozšířily. V současné době je uznáno 48 platných druhů rodu *Cryptosporidium* a stovky genotypů, které byly popsány na základě genetické variability, zejména malé podjednotky rRNA (SSU). Zatímco kryptosporidii lidí a hospodářských zvířat byla věnována celá řada studií, výzkum na dalších obratlovcích zaostává. Znalosti o biologických vlastnostech jednotlivých druhů a genotypů jsou ve většině případů nedostatečné nebo zcela chybí. V posledních několika letech došlo k celosvětovému nárůstu počtu zájmově chovaných zvířat, zejména během pandemie COVID-19, kdy došlo k omezení sociálních kontaktů. Zároveň však blízký vztah mezi člověkem a zvířetem vede k nedodržování hygienických zásad. Chov tradičních i netradičních zvířat je tak spojen se zvýšením rizika expozice parazitárních onemocnění u lidí a je důležité, aby se tento fakt dostal do pozornosti veřejnosti. Tato disertační práce rozšiřuje znalosti o kryptosporidiích specifických pro plazy, činčily, holuby a kočky a zaměřuje se na jejich výskyt, diverzitu a hostitelskou a orgánovou specifitu, patogenitu a přenos.

ANOTATION

Cryptosporidia are obligate unicellular eukaryotic parasites belonging to the phylum Apicomplexa that infect the gastrointestinal tract and respiratory tract of hosts across all classes of vertebrates, including humans. Over the past decade, prospective studies in developing countries have identified cryptosporidia as a major cause of diarrheal disease in humans. Over the past 20 years, our knowledge of the genetic diversity and biology of these parasites has expanded considerably. There are currently 48 recognized species of the genus *Cryptosporidium*, and hundreds of genotypes have been discovered based on genetic diversity, particularly in the small subunit rRNA (SSU). While numerous studies have been devoted to cryptosporidia in humans and livestock, research in other vertebrates lags behind. Knowledge of the biological characteristics of individual species and genotypes is in most cases insufficient or completely absent. Over the past few decades, there has been a global increase in the number of pet animals, especially during the COVID-19 pandemic, when social contact was restricted. At the same time, the close relationship between humans and animals leads to poor hygiene practices. The breeding of both traditional and non-traditional animals is thus associated with an increased risk of exposure to parasitic diseases in humans and it is important that this fact is brought to the attention of the public. This dissertation expands the knowledge of cryptosporidia specific to reptiles, chinchillas, pigeons and cats and focuses on their occurrence, diversity and host and organ specificity, pathogenicity and transmission.

ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* představují skupinu kosmopolitně rozšířených jednobuněčných parazitů, kteří způsobují onemocnění u savců, ptáků, ryb, plazů a obojživelníků. Kryptosporidióza, onemocnění způsobené kryptosporidiiemi, představuje celosvětově významný problém, který má dopad na zdraví lidí i zvířat (Fayer 2004). Onemocnění se může pohybovat od asymptomatických infekcí až po těžký, přetrvávající vodnatý průjem bez krve, který často vede k dehydrataci a v některých případech k fatálním následkům (Chappell et Okhuysen 2002). Závažnost a průběh infekce závisí na druhu kryptosporidií a faktorech hostitele, jako je imunitní systém a věk infikovaného jedince (Kvác et al. 2016). V posledních 20 letech se naše znalosti o genetické rozmanitosti a biologii těchto parazitů značně rozšířily. V současné době je známo 48 platných druhů rodu *Cryptosporidium* (Zikmundová et al. 2025) a stovky genotypů byly objeveny na základě genetické divergence, zejména malé podjednotky rRNA (SSU) (Xiao et al. 1999; Jiang et al. 2005). S masivním rozvojem a dostupností technik a metod molekulární biologie došlo k velkému průlomu v oblasti diverzity kryptosporidií a s tím spojené hostitelské specifity. Dnes víme, že jen malé procento kryptosporidií má širokou hostitelskou specifitu a infikuje velké množství obratlovců napříč řády. Hlavními zástupci této skupiny jsou druhy *C. parvum* a *C. baileyi* (Holubová et al. 2020). Oproti tomu je pro většinu kryptosporidií typická úzká hostitelská specifita, která se dá ještě rozdělit do dvou podskupin. Kryptosporidie, u kterých je znám pouze jediný hostitel nebo hostitelé patřící do jednoho rodu (například *C. suis*), a druhy, které infikují širší spektrum hostitelů v rámci fylogeneticky příbuzných rodů (například *C. andersoni*) (Nakamura et Meireles 2015).

S ohledem na omezené nebo žádné znalosti o infektivitě, antigenní struktuře oocyst, odolnosti oocyst vůči dezinfekčním prostředkům nebo prepatentní a patentní periodě kryptosporidií vyskytujících se u zájmově chovaných zvířat, je pro chovatele obtížné realizovat karanténní a asanační opatření k zabránění zavlečení infekce do chovů a zvládnutí již propuknutých infekcí. Z důvodu přímého kontaktu s lidmi, je důležité sledovat kryptosporidiové infekce u zájmově chovaných zvířat, protože mohou představovat potenciální zdroj těchto parazitů pro člověka a jím chovaná zvířata.

CÍLE PRÁCE

Disertační práce si klade za cíl prozkoumat dosud často opomíjenou skupinu zvířat, která vzhledem ke způsobu chovu a blízkému kontaktu s člověkem může představovat skrytý zdroj infekčních agens. Stanoveného cíle bude dosaženo pomocí moderních metod molekulární biologie a systematického přístupu při sběru vzorků.

Dílčí cíle

- Nashromáždit reprezentativní množství vzorků trusu od různých druhů zájmově chovaných zvířat.
- Pomocí molekulárních a mikroskopických metod popsat diverzitu kryptosporidií.
- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií v závislosti na druhu hostitele.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů kryptosporidií a vytipovat rizikové druhy zvířat s ohledem na potenciální přenos infekce na člověka.
- V případě detekce izolátu bez známých biologických vlastností kryptosporidií se pokusit získat dostatečné množství materiálu pro následnou biologickou a genetickou charakteristiku.

KOMENTÁŘE K VÝSLEDKŮM

Veškeré získané výsledky (obrázky, grafy a tabulky), použitý materiál a metodiky je možné nalézt v příložených publikacích. Tyto výsledky však neobsahují údaje o prevalenci kryptosporidií u plazů.

Výskyt kryptosporidií u plazů

V této disertační práci byla charakterizována prevalence a genetická diverzita kryptosporidií u zájmově chovaných plazů řádu šupinatí (Squamata) chovaných jako zájmová zvířata na území České republiky. Studie byly zaměřeny na plazy chované jako zájmová zvířata a poskytly komplexní přehled výskytu těchto parazitů v různých typech chovů.

Celkem bylo analyzováno 1 219 vzorků trusu pocházejících od plazů ze 34 lokalit (9 obchodů se zvířaty a 24 soukromých chovů plazů), přičemž celková prevalence kryptosporidií dosáhla 12,9 % (n=157). Největší podíl vzorků byl odebrán od ještěřů (n=1 070), zatímco od hadů bylo získáno 149 vzorků (tabulka 4.1).

Zatímco mikroskopickým vyšetřením vzorků trusu barvených anilin-karbol-methyl violeti byly oocysty kryptosporidií detekovány pouze ve 31 vzorcích, což odpovídá 2,5 % ze všech analyzovaných vzorků, molekulárními metodami amplifikujícími část malé podjednotky rRNA (SSU) byla specifická DNA kryptosporidií detekována ve 157 vzorcích (12,9 %) (Tabulky 4.2 a 4.3).

Fylogenetické analýzy založené na sekvenci SSU získaných v této práci a sekvencích uložených v GenBank prokázaly přítomnost šesti druhů, *C. varanii* (n=94), *C. serpentis* (n=22), *C. geckonae* (dříve známo jako *Cryptosporidium* sp. lizard genotyp, nový druh popsán v rámci této práce – kapitola 4.2) (n=9), *C. tyzzeri* (n=7), *C. muris* (n=1), a tři nových genotypů, *Cryptosporidium* sp. YS-2017 (n=13), *Cryptosporidium* sp. kn732 (n=7), *Cryptosporidium* sp. CB2024 (n=4) (obrázek 4.1, tabulka 4.2).

Dominantním druhem kryptosporidií detekovaným v rámci této studie byl *C. varanii*, který byl prokázán v chovech plazů označených CZE/1–CZE/10 a představoval nejčastější nález napříč vyšetřovanými hostitelskými druhy. Tento druh byl identifikován jak u hadů, tak u ještěřů, včetně chameleonů, gekonů, agam a varanů.

Druhým nejčastěji detekovaným druhem bylo *C. serpentis*, které bylo zjištěno ve třech nezávislých chovech (CZE/1, CZE/3 a CZE/5), především u hadů rodu korálovka a užovka (*Lampropeltis* spp., *Pantherophis* spp.) a u gekonů rodu *Nephruroides*.

Nově popsáný druh *C. geckonae* byl rovněž zaznamenán ve třech různých chovech (CZE/1, CZE/6 a CZE/7) a byl detekován výhradně u ještěřů, zejména u gekonů a agam.

Savčí druhy kryptosporidií, konkrétně *C. muris* a *C. tyzzeri*, byly identifikovány ve čtyřech chovech (CZE/3, CZE/4, CZE/5 a CZE/13). Tyto nálezy jsou s vysokou pravděpodobností důsledkem pasáže oocyst trávicím traktem plazů po požití infikované savčí kořisti, zejména laboratorních myší, a nepředstavují primární infekci plazů.

Genotyp *Cryptosporidium* sp. YS-2017 byl detekován v šesti různých chovech (CZE/1, CZE/2, CZE/6, CZE/8, CZE/11 a CZE/12), přičemž všechny pozitivní nálezy pocházely výhradně od agam vousatých (*Pogona vitticeps*), což naznačuje možnou hostitelskou specifitu tohoto genotypu.

Dosud nepopsáný genotyp *Cryptosporidium* sp. CB2024 (n = 4) byl zachycen u hadů, konkrétně u korálovek (*Lampropeltis* spp.) a užovky červené (*Pantherophis guttatus*), ve dvou chovech (CZE/1 a CZE/3). Tento nález poukazuje na dosud neznámou genetickou diverzitu kryptosporidií u zájmově chovaných hadů.

V naší studii jsme detekovali prevalenci 12,9 %, která odpovídá dříve publikovaným studiím z Brazílie (Lobão et al. 2023; 13,2 %) a Itálie (Rinaldi et al. 2012; 12,0 % u ještěřů). Naopak námi zjištěná prevalence je výrazně vyšší než prevalence zjištěná v nedávném screeningu v České republice, kde Žahourek et Kvičerová (2025) detekovali *Cryptosporidium* spp. pouze u 3,2 % (10/308) plazů v zájmových chovech a zoo. Podobně nízké hodnoty uvádí i Sutthikornchai et al. (2026) z Thajska, kde byla prevalence u smíšené populace plazů pod 8 %. Naopak v problémových chovech s klinickými příznaky jsou čísla mnohem vyšší. Nipithakul et al. (2025) zaznamenali v chovu gekončků nočních se syndromem chřadnutí prevalenci 51,4 %. U hadů v Číně zjistili Zhang et al. (2024) prevalenci 20,2 % u skupiny asymptomatických jedinců, ale až 70,0 % u skupiny symptomatických zvířat. Vysokou prevalenci 41,9 % zaznamenali také Louro et al. (2025) ve Španělsku a Portugalsku, což bylo ovlivněno tím, že většina vzorků pocházela ze záchranného centra, kde se koncentrují zvířata v horším zdravotním stavu.

Náš nález dominantního druhu *C. varanii* potvrzuje, že jde o hlavní kryptosporidii plazů. Studie Nipithakul et al. (2025) identifikovala u gekončků nočních v Thajsku výhradně pouze *C. varanii* a statisticky prokázala jeho souvislost s hubnutím a chřadnutím zvířat. Náš nález koresponduje i se závěry Dellarupe et al. (2016), kteří tento druh označili za primární příčinu onemocnění u gekončků v Argentině. I u hadů je tento druh běžný; Zhang et al. (2024) uvádějí, že *C. varanii* byl významně spojen s průjmy u symptomatických hadů. Jako druhý nejvíce zastoupený druh byl *C. serpentis*, což odpovídá globálním trendům u hadů. Li et al. (2025)

označili *C. serpentis* za dominantní druh u hadů v jižní Číně (n=77), který způsobuje poškození žaludeční sliznice. Zajímavé je srovnání s Japonskem, kde Ootawa et al. (2023) potvrdili *C. serpentis* i u divokých gekonů (*Goniurosaurus* spp.), což podporuje naše zjištění, že tento druh není striktně omezen jen na hady. Li et al. (2025) a Louro et al. (2025) našli u zájmově chovaných hadů *C. tyzzeri*, *C. muris* a nově i *C. ditrichi* u hadů a ještěřů, přičemž tyto nálezy označují za důsledek pozření infikované kořisti. I česká studie Žahourek et Kvičarová (2025) potvrdila *C. tyzzeri* u hada krmeného hlodavci.

Druhové složení našich vzorků potvrzuje celosvětový trend dominance *C. varanii* a *C. serpentis*, ale naše práce je unikátní formálním popisem druhu *C. geckonae* a objevem nových genotypů.

Intenzita infekce

Intenzita infekce u 31 mikroskopicky pozitivních plazů se pohybovala v rozmezí 7 600 až 2 038 000 oocyst na gram trusu (OPG) (tabulka 4.3). Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorků pozitivních na druh *C. serpentis* (n=12). Jedinci rodu *Nephurus* vylučovali oocysty *C. serpentis* v rozmezí 11 400–2 038 000 OPG. Stejný počet mikroskopicky pozitivních vzorků (n=12) byl zaznamenán také u plazů infikovaných druhem *C. varanii*. Tyto vzorky pocházely ze čtyř různých chovů a intenzita infekce se u nich pohybovala v rozmezí 7 600–838 100 OPG. U jednoho vzorku trusu od užovky červené (*Pantherophis guttatus*) byla mikroskopicky detekována *C. muris* (n=1) s intenzitou infekce 15 200 OPG. Tato intenzita infekce ukazuje na krmení hada myši s vysokou intenzitou infekce *C. muris*. U tří druhů plazů byl detekován druh *C. geckonae* s intenzitou infekce 233 500–312 400 OPG. Další data popisující průběh a intenzitu infekce u přirozeně a experimentálně infikovaných jedinců jsou uvedeny v kapitole 4.2 (Příloha IV). Genotyp *Cryptosporidium* sp. YS-2017 byl detekován u agamy vousaté s intenzitou infekce 194 300 OPG. Poslední mikroskopicky pozitivní vzorky pocházely od dvou korálovek sedlatých (*Lampropeltis triangulum*) s intenzitou infekce v rozmezí 87 300–219 600 OPG, u kterých bylo detekováno *Cryptosporidium* sp. kn732. U všech mikroskopicky pozitivních vzorků bylo provedeno barvení oocyst (obrázek 4.2) a jejich morfometrické měření; naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Intenzity infekcí u ještěřů pozitivních na *C. varanii* jsou výrazně vyšší než průměry uváděné u hadů, což potvrzuje, že ještěři jsou pro tento druh primárními hostiteli. Zatímco Li et al. (2025) popsali u hadů infikovaných *C. varanii* relativně nízkou průměrnou intenzitu infekce $3,6 \pm 0,4 \log_{10}$ OPG (cca 4 000 OPG), naše hodnoty dosahovaly až 838 100 OPG u chameleona třírohého. Tento rozdíl koresponduje s faktem, že druh *C. varanii* je adaptován primárně

na ještěry (Dellarupe et al. 2016; Nipithakul et al. 2025), u nichž vyvolává masivní infekci a klinické příznaky, zatímco u hadů probíhá infekce často s nižší intenzitou nebo asymptomaticky (Yimming et al. 2016).

U ještěrů rodu *Nephurus* jsme zjistili extrémně vysokou intenzitu vylučování oocyst druhu *C. serpentis* v rozmezí 11 400 – 2 038 000 OPG. Naše maximální hodnoty odpovídají horní hranici, kterou ve své studii popsali Li et al. (2025), kde u hadů stanovili průměrnou intenzitu vylučování na $4,6 \pm 1,6 \log_{10}$ OPG (což odpovídá průměru cca 40 000 OPG). Nicméně jejich horní hranice rozptylu dosahovala až k hodnotám přes 1 000 000 OPG (log hodnota > 6), což je plně srovnatelné s našimi maximálními nálezy u gekonů. Naše data potvrzují, že u vnímavých hostitelů na druh *C. serpentis* dochází k vylučování oocyst ve vysokých hodnotách (Ootawa et al. 2023), což koresponduje s vysokou intenzitou infekce (až 10^6 OPG) popsanou u hadů (Li et al. 2025). U ještěrů je infekce *C. serpentis* často považovaná za asymptomatickou s intermitentním vylučováním oocyst do prostředí (Bogan et al. 2022; Egan et al. 2024) a infikovaní jedinci mohou sloužit jako dlouhodobí přenašeči i bez klinických příznaků (Bogan et al. 2024; Zhang et al. 2024).

Studie Li et al. (2025) u hadů popsala druh *C. muris* s velmi nízkou průměrnou intenzitou vylučování, pouze $2,1 \pm 1,7 \log_{10}$ OPG (což odpovídá cca 125 oocystám na gram). Nález 15 200 OPG u užovky červené je výrazně vyšší než tento průměr, což pravděpodobně potvrzuje hypotézu, že had pozřel hlodavce s masivní infekcí.

Intenzita infekce u sledovaných hadů byla pro genotypy *Cryptosporidium* sp. kn732 a YS-2017 poměrně vysoká, s odhadovaným počtem oocyst v trusu 87 300–219 600 OPG. Podle dostupné literatury nebyly oocysty těchto genotypů dosud zaznamenány v trusu u jiných plazů, což naznačuje, že jde o nové údaje o průběhu infekce u těchto genotypů.

Barvící vlastnosti oocyst plazích kryptosporidií odpovídají vlastnostem známých u savčích druhů rodu *Cryptosporidium* (obrázek 4.2). Tyto vlastnosti souvisejí především se strukturou stěny oocysty a nejsou závislé na hostitelském druhu.

Biologická a molekulární charakterizace *Cryptosporidium geckonae* (*Cryptosporidium* sp. lizard genotyp)

Genotyp označovaný jako *Cryptosporidium* sp. lizard genotyp byl poprvé detekován u gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) v České republice, kde byl popsán jako *Cryptosporidium* sp. 1655 (Xiao et al. 2002b). V následujících letech byl tento genotyp opakovaně zaznamenán u téhož hostitelského druhu a dále také u užovky červené

(*Pantherophis guttatus*) v Rakousku, u gekona zázračného (*Teratoscincus scincus*) v Japonsku a u gekončíka *Goniurosaurus kuroiwae sengkui* rovněž v Japonsku (Abe et Matsubara et al. 2015; Ootawa et al. 2023).

V některých z těchto studií byl *Cryptosporidium* sp. lizard genotyp označován jako *C. serpentis*, se kterým je fylogeneticky úzce příbuzný. Absence detailní biologické, morfologické a molekulární charakterizace však dlouhodobě znemožňovala jeho jednoznačné taxonomické zařazení. Teprve komplexní analýza kombinující multilokusovou molekulární determinaci, experimentální infekce a histologické vyšetření umožnila vymezení tohoto genotypu jako samostatného druhu, který je v této práci popsán pod názvem *C. geckonae*.

Morfologie a morfometrie oocyst

Přestože morfologie a morfometrie oocyst představují jednu ze základních charakteristik při popisu nového druhu kryptosporidií, samy o sobě nejsou spolehlivým diagnostickým znakem a pro jednoznačnou identifikaci druhu je vždy nezbytná molekulární charakterizace (Ryan et al. 2008; Kváč et al. 2014a). Velikost a tvar oocyst se mezi jednotlivými druhy kryptosporidií často překrývají a jejich praktické využití v rutinní diagnostice je omezené.

Oocysty *C. geckonae* izolované z přirozeně infikovaných gekonů (*Eublepharis macularius* a *Nephurus levis*) byly morfometricky shodné s oocystami získanými z experimentálně infikovaných gekonů. Sporulované oocysty měřily $5,47\text{--}6,20 \times 4,32\text{--}5,20 \mu\text{m}$ (průměr $5,86 \times 4,79 \mu\text{m}$) s indexem tvaru 1,07–1,28. Statistická analýza neprokázala významné rozdíly ve velikosti oocyst mezi jednotlivými izoláty pocházejícími z přirozených a experimentálních infekcí.

Oocysty *C. geckonae* jsou menší než oocysty *C. serpentis* a větší než oocysty *C. varanii* (Levine 1980; Pavlásek et Ryan 2008), avšak tyto rozdíly jsou příliš malé na to, aby umožňovaly spolehlivou diferenciaci jednotlivých druhů kryptosporidií pomocí světelné mikroskopie. Oocysty *C. geckonae* nelze morfometricky odlišit od oocyst jiných kryptosporidií parazitujících u plazů, a proto je molekulární genotypizace jediným spolehlivým nástrojem jejich identifikace (Kváč et al. 2014a; Holubová et al. 2020).

Molekulární determinace *Cryptosporidium geckonae*

Molekulární charakterizace představuje klíčový nástroj pro spolehlivou determinaci kryptosporidií, neboť morfologie oocyst vykazuje značný překryv mezi jednotlivými taxony (Xiao et al. 2004). V rámci této práce byla molekulární determinace *C. geckonae* provedena na

základě multilokusové analýzy zahrnující geny SSU rRNA, aktin, HSP70 a COWP, které jsou běžně používány pro taxonomii rodu *Cryptosporidium* (Kváč et al. 2014a; Zahedi et al. 2017).

Sekvenční analýzy prokázaly, že izoláty získané z přirozeně i experimentálně infikovaných gekonů tvoří geneticky homogenní linii. Fylogenetické analýzy jednoznačně potvrdily, že *C. geckonae* představuje samostatný taxon, fylogeneticky nejbližší druhu *C. serpentis*, avšak geneticky jasně odlišený od všech dosud popsáných druhů kryptosporidií.

Genetické vzdálenosti mezi *C. geckonae* a *C. serpentis* byly srovnatelné s rozdíly mezi jinými uznanými druhy rodu *Cryptosporidium*, což podporuje platnost *C. geckonae* jako samostatného druhu (Widmer et Lee 2010; Kváč et al. 2014a).

Hostitelská a tkáňová specifita *Cryptosporidium geckonae*

Studium hostitelské a tkáňové specifity představuje zásadní součást biologické charakterizace kryptosporidií, přesto však tyto údaje často u nově popisovaných druhů chybí (Ryan et al. 2003b; Kváč et al. 2018). Většina druhů rodu *Cryptosporidium* je charakterizována relativně úzkou hostitelskou i tkáňovou specifikitou, přičemž vývoj parazita je obvykle omezen na konkrétní predilekční místo v gastrointestinálním traktu (Lindsay et al. 2000; Čondlová et al. 2019).

Výsledky této studie prokázaly, že *C. geckonae* je hostitelsky specifický druh, jehož přirozenými hostiteli jsou gekoni. Přirozená infekce byla potvrzena u gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) a gekona knoflíkového (*Nephurus levis*). Experimentální infekce potvrdily přenositelnost parazita mezi jedinci téhož druhu, zatímco ostatní experimentálně inokulovaní hostitelé, včetně laboratorních myší, kuřat a hadů, nebyli k infekci vnímaví.

Na rozdíl od většiny dosud popsáných druhů kryptosporidií vykazuje *C. geckonae* mimořádně širokou tkáňovou distribuci. Vývojová stadia parazita byla prokázána nejen v žaludku, ale také v tenkém a tlustém střevě, kloace a plicní tkáni. *Cryptosporidium geckonae* tak představuje první známý druh kryptosporidie, u něhož bylo prokázáno překročení tradičního rozdělení na žaludeční a střevní kryptosporidie (Kváč et al. 2014a; Holubová et al. 2020).

Průběh infekce a věková specifita *Cryptosporidium geckonae*

Věková specifita kryptosporidií patří mezi méně studované biologické vlastnosti, zejména u druhů parazitujících u plazů (Kváč et al. 2014c). Na základě experimentálních infekcí bylo zjištěno, že *C. geckonae* je infekční pro gekončíky noční napříč sledovanými věkovými kategoriemi, přičemž nebyly zaznamenány výrazné rozdíly ve vnímavosti hostitelů v závislosti na věku.

Prepatentní perioda byla u experimentálně infikovaných jedinců konzistentní a první průkaz specifické DNA a oocyst ve vzorcích trusu byl zaznamenán mezi 6. a 8. dnem po infekci. Tento průběh odpovídá hodnotám popisovaným u dalších žaludečních kryptosporidií (Pavlásek 2001; Kváč et al. 2016).

Patentní perioda *C. geckonae* byla mimořádně dlouhá a vylučování oocyst bylo prokázáno po dobu delší než 200 dní. Intenzita infekce kolísala v průběhu času a byly pozorovány i přechodné fáze bez detekovatelného vylučování oocyst, což odpovídá průběhu chronických kryptosporidiových infekcí popsáných u jiných hostitelů (Jalovecká et al. 2010; Holubová et al. 2016).

Patogenita *Cryptosporidium geckonae*

Patogenita kryptosporidií infikujících plazy je značně variabilní a závisí na druhu parazita, hostitele a jeho imunitním stavu (Lindsay et Blagburn 1990; Bouzid et al. 2013). V průběhu této studie nebyly u přirozeně ani experimentálně infikovaných gekonů pozorovány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy.

Navzdory absenci klinických příznaků byla histologickým vyšetřením prokázána masivní kolonizace žaludeční sliznice vývojovými stadii parazita. Tyto nálezy naznačují, že *C. geckonae* je schopen vyvolat dlouhodobou subklinickou infekci s vysokou intenzitou parazitace, obdobně jako bylo popsáno u jiných druhů kryptosporidií (Kváč et al. 2016; Holubová et al. 2019).

Výskyt a diverzita kryptosporidií u činčil

Činčila (*Chinchilla lanigera*) je v současnosti celosvětově chovaná jako zájmové zvíře a zároveň je využívána v kožešinových chovech. Přestože u činčil byly popsány infekce řadou parazitárních protist, údaje o výskytu kryptosporidií byly do nedávné doby sporadické a nejednoznačné. Naše studie přinesla první systematická data o výskytu a biologii *Cryptosporidium* u činčil a umožnila přesnější posouzení jejich epidemiologického významu (Zikmundová et al. 2024).

Pro molekulární determinaci kryptosporidií byly využity částečné sekvence genu SSU a *gp60*, které jsou standardně používány pro druhovou identifikaci a subtypizaci rodu *Cryptosporidium* (Xiao 2010; Ryan et al. 2014). Z celkového počtu 149 zájmově chovaných činčil vlnatých (*Chinchilla lanigera*) z různých 24 chovů bylo 8,1 % pozitivních na *Cryptosporidium* spp.

Všechny pozitivní vzorky byly na základě sekvenční analýzy SSU přiřazeny k druhu *C. ubiquitum*, který je známý svou širokou hostitelskou specifitou a častým výskytem u savců, včetně člověka (Fayer et al. 2010; Li et al. 2014; Ryan et al. 2014; Blanco et al. 2016). Naopak nebyla zjištěna přítomnost dalších druhů kryptosporidií běžně detekovaných u hlodavců, jako jsou *C. parvum*, *C. muris* nebo *C. tyzzeri* (Kváč et al. 2013b). Tento výsledek naznačuje relativně nízkou druhovou diverzitu kryptosporidií u činčil a podporuje hypotézu, že činčila je spíše okrajovým, avšak stabilním hostitelem *C. ubiquitum*.

Následná subtypizace na základě genu *gp60* přiřadila všechny izoláty k podtypu XIIa. Jednotlivé subtypy jsou považovány za specifické pro hostitele (Li et al. 2014) a u lidí byly dosud detekovány subtypy XIIa–d (Molloy et al. 2011; Krumkamp et al. 2021; KP899828-nepublikováno), zatímco XIIg–h byly nalezeny pouze v odpadních vodách (jejich hostitelé nejsou známi) a XIII i u poletušky slovanské (*Pteromys volans*) (Chen et al. 2021). Subtypy XIIe–f druhu *C. ubiquitum* jsou neplatné a byly popsány jako rodiny XVII a XVIII patřící ke *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp I a II (Čondlová et al. 2019).

Fylogenetická analýza ukázala, že izoláty z činčil tvořily homogenní genetickou skupinu a jsou úzce příbuzné izolátům *C. ubiquitum* detekovaným u dalších savčích hostitelů. Zatímco všechny izoláty *C. ubiquitum* v této studii patří do subtypu XIIa, podobně jako v předchozí studii z České republiky (Kellnerová et al. 2017), ve studiích z Číny a Japonska byl prokázán dominantní subtyp XII d (Qi et al. 2015b; Kubota et al. 2019; Chen et al. 2021). Tyto výsledky potvrzují, že činčila nepředstavuje hostitele specifické linie kryptosporidií, ale zapadá do širšího epidemiologického cyklu *C. ubiquitum*.

Infekce *C. ubiquitum* u činčil byla charakterizována dlouhodobým, převážně subklinickým průběhem. Kvantitativní analýza vzorků trusu prokázala intermitentní vylučování oocyst s výraznými výkyvy v intenzitě infekce, která se pohybovala od 68 po 1 409 OPG. Dlouhodobé sledování jednotlivých jedinců ukázalo, že infekce může přetrvávat po dobu několika měsíců, aniž by byly pozorovány klinické příznaky kryptosporidiózy. Podobný průběh subklinické, chronické infekce byl popsán i u jiných savčích hostitelů infikovaných druhem *C. ubiquitum* (Fayer et al. 2010; Santín 2013).

Intermitentní charakter vylučování oocyst představuje významný faktor z hlediska diagnostiky, neboť jednorázové vyšetření může vést k podhodnocení skutečné prevalence infekce. Tyto výsledky zdůrazňují nutnost opakovaného odběru vzorků a použití citlivých molekulárních metod při monitoringu kryptosporidií u zájmově chovaných savců. Intermitentní uvolňování oocyst parazitů rodu *Cryptosporidium* není neobvyklé a bylo potvrzeno u řady

druhů parazitujících plazy, ptáky a savce (Ježková et al. 2016; Horčíčková et al. 2019; Holubová et al. 2020).

Cryptosporidium ubiquitum je považováno za významný zoonotický druh, jehož infekce byla opakovaně popsána u člověka, zejména u imunokompromitovaných jedinců (Li et al. 2014; Ryan et al. 2014). Detekce tohoto druhu u činčil, které jsou často chovány v úzkém kontaktu s člověkem, poukazuje na jejich potenciální roli jako rezervoáru infekce.

Absence klinických příznaků u infikovaných činčil zvyšuje riziko nepozorovaného šíření parazita v chovech i v domácím prostředí. Vzhledem k dlouhodobému vylučování oocyst a jejich vysoké rezistenci vůči běžným dezinfekčním prostředkům představují činčily potenciální zdroj environmentální kontaminace.

Výskyt a diverzita kryptosporidií u holubů

Holub domácí (*Columba livia* f. *domestica*) je jedním z nejdéle domestikovaných ptačích druhů a je v současnosti chován po celém světě především pro sportovní účely (poštovní a závodní holubi), zájmový chov a v menší míře také jako hospodářské zvíře. Díky dlouhodobé domestikaci a úzkému vztahu k člověku vznikly rozsáhlé chovy, z nichž část populace unikla a vytvořila stabilní ferální populace v městském i venkovském prostředí. Odhaduje se, že celkový počet holubů na světě dosahuje až 400 milionů jedinců, přičemž naprostou většinu tvoří holubi chovaní nebo ferální, zatímco čistě volně žijící populace jsou méně početné (Haro et al. 2005).

V rámci studie bylo analyzováno celkem 940 vzorků trusu volně žijících a chovaných holubů z České republiky, Slovenska a Polska, přičemž kryptosporidiální DNA byla detekována u 2,9 % jedinců (Holubová et al. 2024). Zjištěná prevalence odpovídá hodnotám uváděným ve většině předchozích studií srovnatelného rozsahu (Qi et al. 2011) a je výrazně nižší než prevalence popisované v menších studiích z Asie či Blízkého východu, kde mohly výsledky ovlivnit lokální podmínky nebo malý počet analyzovaných jedinců.

Molekulární determinace založená na analýze částečných sekvencí genu SSU odhalila přítomnost sedmi druhů kryptosporidií: *C. meleagridis* (n=10), *C. baileyi* (n=5), *C. parvum* (n=4), *C. muris* (n=2), *C. andersoni* (n=2), *C. galli* (n=2) a *C. ornithophilus* (n=2) (Holubová et al. 2024). Dominantními druhy byly *C. meleagridis* a *C. baileyi*, které jsou považovány za nejčastější kryptosporidie ptáků s relativně širokou hostitelskou specifitou (Nakamura a Meireles 2015). Tento nález je v souladu s dřívějšími studiemi u holubů i jiných ptačích hostitelů (Ryan 2010; Faraj 2014; Kabir et al. 2020). Naopak detekce savčích druhů

kryptosporidií, konkrétně *C. parvum*, *C. muris* a *C. andersoni*, pravděpodobně neodráží aktivní infekci holubů, ale spíše pasivní průchod oocyst trávicím traktem v důsledku environmentální kontaminace. Tyto druhy jsou běžně spojovány se skotem a hlodavci (Ryan et al. 2014) a jejich výskyt byl častější u chovaných holubů, kteří mohli přijít do kontaktu s kontaminovaným krmivem nebo prostředím (Jasim et Marhoon 2015; Oliveira et al. 2017; Liao et al. 2021).

Experimentální infekce potvrdily, že subtyp *C. meleagridis* IIII je infekční pro kuřata, avšak nikoli pro imunodeficientní myši, což naznačuje jeho omezený zoonotický potenciál (Holubová et al. 2024). Tento výsledek kontrastuje s jinými subtypy *C. meleagridis*, u nichž byla schopnost infikovat savčí hostitele popsána dříve (Huang et al. 2003).

Infekce kryptosporidiiemi u holubů probíhaly převážně subklinicky a mikroskopicky pozitivní jedinci vylučovali oocysty v řádu tisíců až desítek tisíc OPG (Holubová et al. 2024). Absence klinických příznaků, spolu s prokázanou schopností vylučovat oocysty, zvyšuje riziko nepozorovaného šíření parazita v populacích holubů i v prostředí.

Výskyt a diverzita kryptosporidií u koček

V rámci naší studie jsme se zaměřili na výskyt a genetickou diverzitu kryptosporidií u koček (*Felis catus*), které patří mezi nejčastěji chovaná zájmová zvířata a představují potenciální rozhraní mezi člověkem a prostředím. Kočky jsou primárně hostiteli hostitelsky specifického druhu *C. felis*, který je považován za parazita se zoonotickým potenciálem. Infekce *C. felis* byly opakovaně popsány u lidí, zejména u imunokompromitovaných jedinců nebo v oblastech s omezeným přístupem k hygieně, nicméně jejich prevalence je výrazně nižší než u dominantních zoonotických druhů *C. parvum* a *C. hominis* (Taghipour et al. 2021; World Population Review 2026).

Celkem bylo analyzováno 711 vzorků trusu (350 od domácích koček a 361 od toulavých koček) z České republiky, Slovenska a Polska. Všechny pozitivní vzorky byly identifikovány jako druh *C. felis* a prevalence v analyzovaných oblastech byla 4,5 % (32/711). Zjištěná prevalence odpovídá hodnotám uváděným v předchozích studiích z téhož regionu i z jiných evropských zemí (Kváč et al. 2017; Meng et al. 2021) a je výrazně nižší než prevalence popisované v některých mimoevropských studiích, kde mohly hrát roli rozdíly ve struktuře populace, věku zvířat nebo environmentální zátěži. Významným zjištěním z hlediska přenosové dynamiky byl výrazně vyšší výskyt infekce u toulavých koček (6,7 %) ve srovnání s kočkami domácími (2,3 %). Tento rozdíl lze vysvětlit rozdílným životním stylem, kdy toulavé kočky jsou častěji vystaveny kontaminovanému prostředí. Podobný trend byl opakovaně popsán

i v jiných studiích, které identifikovaly původ zvířete jako jeden z hlavních rizikových faktorů infekce kryptosporidii (Yang et al. 2015; Xu et al. 2016).

Přestože byla infekce prokázána molekulárně, oocysty *Cryptosporidium* spp. nebyly detekovány mikroskopicky v žádném ze vzorků. Tento nález odpovídá dřívějším pozorováním, že dospělé a imunokompetentní kočky vylučují pouze velmi nízké množství oocyst, často pod hranici detekce běžných barvicích metod (Yang et al. 2015; Taghipour et al. 2021). Z hlediska veřejného zdraví to naznačuje, že riziko přímého přenosu kryptosporidií z koček na člověka může být nízké, avšak zároveň upozorňuje na nutnost použití citlivých molekulárních metod při hodnocení skutečné prevalence infekce.

Pro subtypizaci byl použit gen *gp60*, který se často používá ke studiu vnitrodruhové variability. Analýza genu *gp60* identifikovala pět různých subtypů *C. felis*. Všechny detekované subtypy patřily do subtypové rodiny XIXa, která je celosvětově nejrozšířenější. Všechny pět subtypů tvořilo dobře podpořené fylogenetické klastry, přičemž žádný z těchto subtypů nebyl dříve celosvětově popsán. Zjištěné subtypy vykazovaly jasné geografické rozložení v regionu. Některé klastry byly nalezeny pouze v jedné zemi (např. klast. č. 3 pouze na Slovensku, klastry č. 4 a 5 pouze v České republice (příloha II).

Vyšší prevalence u toulavých koček zdůrazňuje roli životního stylu a expozice prostředí v přenosové dynamice. Studie poukazuje na možnou geografickou distribuci subtypů, ale význam této genetické variability, hostitelské specifity a zoonotický potenciál nově zjištěných subtypů rodiny XIXa zůstává nejasný a vyžaduje další výzkum. U žádných z pozitivních koček nebyly pozorovány klinické příznaky kryptosporidie.

Genom *Cryptosporidium serpentis*

Kvalita a strategie sestavení genomu *Cryptosporidium serpentis*

V této studii byl úspěšně sestaven referenční genom druhu *Cryptosporidium serpentis* pomocí kombinace krátkých (Illumina) a dlouhých (Oxford Nanopore) sekvenačních čtení a metagenomického přístupu k sestavení. Přestože analyzovaný vzorek obsahoval vysoký podíl necílové DNA, zejména bakteriálního původu, podařilo se získat vysoce kvalitní a téměř kompletní genom o velikosti 9,3 Mb, složený z pouhých 25 scaffoldů. Hodnota L50 dosahovala 770 kb, což představuje nejvyšší úroveň kontinuity dosud publikovanou pro žaludeční druhy rodu *Cryptosporidium*.

Výsledky jasně ukázaly, že předběžná filtrace čtení na základě taxonomické klasifikace byla příliš konzervativní a vedla ke ztrátě relevantních sekvencí. Naproti tomu strategie, kdy byly

nejprve sestaveny všechny sekvence a teprve následně byly vybrány scaffolds náležející k zástupcům kmene Apicomplexa, umožnila rekonstruovat genom očekávané velikosti a kvality. Klíčovým krokem bylo také využití nástroje quickmerge, který zkombinoval výhody hybridního a dlouhočteného sestavení a výrazně snížil fragmentaci genomu. Tyto výsledky potvrzují, že metagenomický přístup je životaschopnou alternativou v případech, kdy není k dispozici čistý nebo kultivovatelný parazitární materiál, jak bylo naznačeno i v jiných studiích využívajících metagenomické sestavování (García-Muñoz et Pino-Bodas 2025).

Porovnání s ostatními druhy rodu *Cryptosporidium*

Srovnání nově sestaveného genomu *C. serpentis* (izolát USDA_PG12) s dříve publikovanými genomy potvrdilo jeho mimořádnou kvalitu. Ve srovnání s genomem *C. serpentis* ze studie Wang et al. (2025), který je tvořen téměř 300 contigy, vykazuje nový genom výrazně vyšší kontinuitu při zachování srovnatelné úplnosti. Analýza BUSCO potvrdila velmi vysokou úplnost genomu (99,8 % pro databázi Apicomplexa a 98,9 % pro databázi *Cryptosporidium*), což je srovnatelné nebo lepší než u ostatních referenčních genomů tohoto rodu (Tegenfeldt et al. 2025).

Fylogenetická analýza a výpočet průměrné nukleotidové identity (ANI) ukázaly, že *C. serpentis* je geneticky nejbližší gastrickým druhům *C. muris* a *C. andersoni*, přičemž ANI mezi těmito druhy dosahovala přibližně 92 %. Naproti tomu střevní druhy, významné z hlediska humánních infekcí (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*), tvořily samostatnou větev kladogramu (Liu et al. 2016; Bellinzona et al. 2024). Tyto výsledky podporují hypotézu o výrazné genetické diferenciaci mezi žaludečními a střevními druhy *Cryptosporidium*, která pravděpodobně souvisí s jejich odlišnou lokalizací v hostiteli a mírou hostitelské specificity (Huang et al. 2024).

Genová výbava, syntenie a hostitelská specificita

Analýza ortologických skupin ukázala vysoký stupeň sdílených genů mezi analyzovanými druhy, přičemž více než 3 300 ortologických skupin bylo společných všem porovnávaným druhům. Přesto byly identifikovány rozdíly na úrovni linií i jednotlivých druhů. Žaludeční druhy sdílely specifické ortologické skupiny, které nebyly přítomny u střevních druhů, a naopak (Liu et al. 2016; Wang et al. 2025). U *C. serpentis* bylo identifikováno několik unikátních ortologických skupin, z nichž nejpočetnější zahrnovala geny kódující P-typ ATPázy podrodiny V. Tyto proteiny jsou obecně spojovány s transportem iontů a lipidů přes buněčné membrány, avšak jejich přesná funkce u *Cryptosporidium* zatím není známa (Bublitz et al. 2010).

Zajímavým zjištěním byl také rozdílný výskyt genových rodin, jako jsou insulinázy, MEDLE proteiny a SKSR proteiny. Tyto geny byly hojně zastoupeny u střevních druhů a jsou považovány za faktory virulence, invaze a adaptace na širší spektrum hostitelů (Audebert et al. 2020; He et al. 2025; Huang et al. 2025). Žaludeční druhy, včetně *C. serpentis*, vykazovaly redukovaný repertoár těchto genů, což podporuje hypotézu, že omezená genová výbava v těchto rodinách souvisí s vyšší hostitelskou specificitou (Liu et al. 2016; Wang et al. 2025).

Syntenická analýza mezi oběma dostupnými genomy *C. serpentis* prokázala velmi vysokou míru zachování genového uspořádání. Zjištěné rozdíly byly minimální a většinou malé, což potvrzuje správnost sestavení nového genomu a jeho využitelnost jako referenční sekvence.

Variabilita mezi izoláty a význam genomových dat

Porovnání genomů izolátů *C. serpentis* z České republiky a Číny odhalilo více než 2 000 jednonukleotidových polymorfismů a téměř 900 inzercí a delecí (Wang et al. 2025). Většina variant v kódujících oblastech vedla ke změně aminokyseliny, což naznačuje potenciální funkční dopad. Tato zjištění potvrzují existenci kmenové variability v rámci druhu a poukazují na význam celogenomových dat pro studium populační struktury, evoluce a možných rozdílů v patogenitě (Baptista et al. 2022; Troell et al. 2025).

Celkově výsledky této studie ukazují, že kombinace hybridního sekvenování a metagenomického sestavení představuje účinný nástroj pro získávání vysoce kvalitních genomů i z materiálů s vysokou mírou kontaminace. Rozšíření dostupných genomových dat o další druhy, genotypy a izoláty *Cryptosporidium* je klíčové pro hlubší pochopení hostitelské specificity, přenosu a patogenity těchto významných parazitů (Nader et al. 2019; Bellinzona et al. 2024).

ZÁVĚRY

Předložené dosavadní výsledky disertační práce přináší nové poznatky o výskytu, genetické diverzitě a biologii kryptosporidií u zájmově chovaných i volně žijících zvířat ve střední Evropě. Následující část shrnuje hlavní zjištění:

- Rozsáhlý screening šupinatých plazů (Squamata) v zájmových chovech a obchodech se zvířaty v České republice odhalil poměrně vysokou míru zamoření, když molekulární analýza 1 219 vzorků trusu z 34 lokalit prokázala celkovou prevalenci kryptosporidií 12,9 %.
- Byla detailně popsána biologie a genetická odlišnost nového druhu *Cryptosporidium geckonae* n. sp. izolovaného z gekonů, čímž byla rozšířena znalost diverzity těchto parazitů u plazů.
- V rámci studie bylo analyzováno celkem 940 vzorků trusu volně žijících a chovaných holubů z České republiky, Slovenska a Polska, přičemž kryptosporidiální DNA byla detekována u 2,9 % jedinců.
- Z celkového počtu 149 zájmově chovaných činchil vlnatých (*Chinchilla lanigera*) z různých 24 chovů bylo 8,1 % pozitivních na *Cryptosporidium* spp.
- Bylo prokázáno, že hybridní a metagenomické sekvenování umožnilo získání vysoce kvalitního genomu *Cryptosporidium serpentis*, díky němuž byly získány zásadní poznatky o evoluci, hostitelské specifitě a genetické variabilitě tohoto parazita.

Získané výsledky ukázaly, že plazi, holubi, činchily a kočky mohou fungovat jako významní hostitelé různých druhů rodu *Cryptosporidium*, včetně těch s potvrzeným zoonotickým potenciálem, a představují tak možné riziko přenosu na člověka. Naše studie dokládají, že kryptosporidie se vyznačují vysokou adaptabilitou k různým hostitelům i prostředím, což podtrhuje jejich význam nejen v oblasti veterinární parazitologie, ale také v epidemiologii a ochraně veřejného zdraví. Popsané studie zároveň ukazují na nutnost pravidelného monitoringu zájmově chovaných zvířat, neboť infekce často probíhají asymptomaticky, a přesto dochází k vylučování infekčních stadií do prostředí.