VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY, TIMIȘOARA

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT XIII – INFECTIOUS DISEASES

DISCIPLINE OF PARASITOLOGY

DĂRĂBUȘ RODICA GEORGIANA



ABSTRACT

PhD THESIS

Scientific coordinator

PROF. UNIV. DR. OLARIU TUDOR OVIDIU RAREȘ

Timișoara

2026

VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY, TIMIȘOARA

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT XIII – INFECTIOUS DISEASES

DISCIPLINE OF PARASITOLOGY

DĂRĂBUȘ RODICA GEORGIANA

ABSTRACT

PhD THESIS

DESCRIPTIVE AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES IN HUMAN CRYPTOSPORIDIOSIS

Scientific coordinator

PROF. UNIV. DR. OLARIU TUDOR OVIDIU RAREȘ

Timișoara

2026

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

"DESCRIPTIVE AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES IN HUMAN CRYPTOSPORIDIOSIS"

TABLE OF CONTENTS

List of Published Scientific Papers.....VI

List of Abbreviations and Symbols VIII

List of Tables and Figures IX

Acknowledgments XII

INTRODUCTION 1

GENERAL PART 5

CHAPTER 1. HISTORICAL OVERVIEW 5

CHAPTER 2. LIFE CYCLE OF THE PROTOZOAN.....8

CHAPTER 3. EPIDEMIOLOGY.....15

3.1. PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM* INFECTIONS 15

3.2. RISK FACTORS IN CRYPTOSPORIDIOSIS 20

3.2.1. INTRINSIC FACTORS.....20

3.2.2. EXTRINSIC FACTORS.....22

CHAPTER 4. DIAGNOSTIC APPROACHES IN CRYPTOSPORIDIOSIS.....31

4.1. CLINICAL DIAGNOSIS.....31

4.2. LABORATORY DIAGNOSIS.....31

4.2.1. COPROLOGICAL DIAGNOSIS.....31

4.2.1.1. Coproscopical diagnosis.....31

4.2.1.2. Imunological diagnosis.....34

4.2.1.3. Molecular Methods.....36

SPECIAL PART 38

CHAPTER 5. MOTIVATION AND PURPOSE OF THE RESEARCH.....38

5.1. RESEARCH OBJECTIVES 39

CHAPTER 6. PREVALENCE OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN WESTERN ROMANIA

.....41

6.1. AIM OF THE STUDY.....41

6.2. MATERIALS AND METHODS 41

6.3. RESULTS 43

6.4. DISCUSSION 51

6.5. CONCLUSIONS 56
CHAPTER 7. ASSESSMENT OF RISK FACTORS FOR HUMAN .CRYPTOSPORIDIOSIS.....59
7.1. AIM OF THE STUDY…… ……..59
7.2. MATERIALS AND METHODS……59
7.3. RESULTS ……..……..……..……..……62
7.4. DISCUSSION 73
7.5. CONCLUSIONS 79
CHAPTER 8. MOLECULAR IDENTIFICATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPECIES/GENOTYPES IN HUMANS FROM WESTERN ROMANIA……..83
8.1. AIM OF THE STUDY……..……..83
8.2. MATERIALS AND METHODS 83
8.3. RESULTS ……..89
8.4. DISCUSSION 99
8.5. CONCLUSIONS 102

CHAPTER 9. EXPERIMENTAL INFECTION IN MICE WITH *CRYPTOSPORIDIUM* ISOLATES FROM HUMANS……104
9.1. AIM OF THE STUDY……..104
9.2. MATERIALS AND METHODS 104
9.3. RESULTS ……..……107
9.4. DISCUSSION 112
9.5. CONCLUSIONS 115
GENERAL CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS 118
BIBLIOGRAPHY 123
ANNEX I: INFORMED CONSENT I
ANNEX II: CRYPTOSPORIDIOSIS EPIDEMIOLOGICAL QUESTIONNAIRE.....II
ANNEX III : GenBank.....III
ANNEX IV :FULL-TEXT SCIENTIFIC ARTICLES VII

Cryptosporidiosis is a globally distributed protozoan disease affecting both humans and animals, regardless of climate or socioeconomic conditions. It presents with variable clinical severity, ranging from asymptomatic infection to severe diarrhea, and may cause epidemic outbreaks. Its epidemiological significance stems from its opportunistic, zoonotic, and anthroponotic nature. Cryptosporidiosis was included in the Neglected Diseases initiative of the World Health Organization (WHO), emphasizing the need for intensified research in this field.

The global prevalence is estimated at approximately 7–8%, with higher values in developing regions. Although prevalence varies according to population groups, the disease remains particularly significant in vulnerable individuals, such as children and immunocompromised patients. Worldwide morbidity is estimated at around 13 million cases annually.

Cryptosporidium species are validated based on morphological, genetic, and host-specific criteria, with 44 species and over 120 genotypes currently recognized. Nineteen species infect humans, among which *C. hominis* and *C. parvum* account for more than 95% of cases. Numerous animal species harbor *Cryptosporidium* with zoonotic potential, illustrating the complex human–animal transmission dynamics.

Transmission to humans occurs mainly through contaminated water and food or through contact with domestic or wild animals. Oocysts have been detected in drinking water, rivers, swimming pools, and wastewater, with contamination sources traced to humans, livestock, and wildlife.

The choice of this research topic was motivated by the major impact of cryptosporidiosis on public health, as well as by the complexity of the epidemiological relationships among hosts, pathogens, and the environment. In Romania, data on human cryptosporidiosis are limited, most studies having been conducted in the past and on small population samples. This lack of information constituted an additional argument for addressing this topic within a doctoral research framework.

This thesis is structured into three parts: the general part, the special part and conclusions.

The **GENERAL PART** includes a brief historical overview, the life cycle of the protozoan, epidemiology, and diagnostic methods in cryptosporidiosis.

The **SPECIAL PART** comprises four distinct studies addressing different aspects of the research topic. These include an investigation of the prevalence of cryptosporidiosis in Western Romania, an evaluation of the risk factors associated with human infection, and the molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes identified in human

subjects from this region. Additionally, the work involves experimental infections carried out in mice using *Cryptosporidium* isolates obtained from human cases.

The conclusions include the most relevant results of the studies, recommendations for future research and the original contributions.

Research objectives:

I. Determination of the prevalence of human cryptosporidiosis in Western Romania.

II. Identification of potential risk factors in human cryptosporidiosis.

III. Molecular identification of *Cryptosporidium* species/genotypes infecting humans in Romania.

IV. Investigation of human–animal epidemiological relationships through experimental infections in laboratory animals.

PREVALENCE OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN WESTERN ROMANIA

The aim of this research was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* infection among different population groups in Western Romania.

Between February 2024 and October 2025, a total of 584 fecal samples were collected from various population groups: hospital patients, schoolchildren from peri-urban and rural schools, staff and relatives from a veterinary clinic, and individuals from a dairy cattle farm.

The study included population groups from both urban and rural environments, of both sexes, with ages ranging from two months to 90 years. For the identification of *Cryptosporidium* spp. infection, three diagnostic methods were used: direct fecal smear examination, the modified Ziehl–Neelsen staining method described by Henriksen, and a rapid qualitative chromatographic test.

Infection with *Cryptosporidium* spp. was identified exclusively among patients hospitalized at “Victor Babeș” Infectious Diseases Hospital in Timișoara. Using the modified Ziehl–Neelsen method and the rapid qualitative chromatographic test, 18 positive samples were detected, whereas only 16 positive samples were identified by direct smear examination.

The overall prevalence was 3.1%. In the two departments of the infectious diseases hospital, the prevalence rates were 3.4% and 7.6%, respectively. Although differences were observed, they were not statistically significant. When analyzed by age group, positive cases

were more frequent among children aged 1–5 years; however, the small number of cases resulted in a lack of statistical significance.

Differences in prevalence between sexes were also statistically insignificant. Although the prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection was more than twice as high in urban areas (4.4%) compared with rural areas (2.1%), these differences were likewise considered statistically insignificant due to the relatively small number of positive cases in each category.

This study provides an updated evaluation of cryptosporidiosis prevalence in Western Romania and highlights the influence of diagnostic methods and clinical context on infection detection. Although the overall prevalence was low, all positive cases were identified among hospitalized patients, supporting the opportunistic nature of *Cryptosporidium* spp. infection.

Modified Ziehl–Neelsen staining and the CerTest Crypto assay showed higher detection rates than direct microscopy, emphasizing the importance of combined diagnostic approaches. Children aged 1–5 years were the most affected group, while no significant differences were observed according to sex or residence.

Overall, the results suggest that cryptosporidiosis prevalence in Western Romania is influenced mainly by diagnostic sensitivity and clinical status rather than demographic factors, underlining the need for accurate diagnostic methods and continued epidemiological surveillance.

ASSESSMENT OF RISK FACTORS FOR HUMAN CRYPTOSPORIDIOSIS

This study aimed to assess the risk factors for cryptosporidiosis among hospitalized patients in Western Romania.

Between February and April 2024, a total of 312 fresh fecal samples were collected from patients hospitalized at “Victor Babeș” Infectious Diseases Hospital in Timișoara. The patients were diagnosed with various pathologies that could represent potential risk factors for *Cryptosporidium* infection. All participants included in the study underwent both a clinical examination and a questionnaire-based interview and signed an informed consent form. Each patient received treatment for the primary condition for which they were hospitalized.

The study population included both male and female patients, aged between two months and 90 years. Hospitalized patients originated from both urban and rural areas of Western Romania.

The diagnosis of human cryptosporidiosis was performed using rapid diagnostic tests and the modified Ziehl–Neelsen staining method described by Henriksen.

To assess potential risk factors, participants completed a comprehensive questionnaire. The questionnaire was developed through the collaborative effort of a multidisciplinary team of specialists and was guided by recommendations and documents issued by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) regarding cryptosporidiosis. The questionnaire collected a wide range of information, including area of residence, sex, reported gastrointestinal symptoms, animal ownership, frequency and nature of animal contact, handwashing practices after animal contact, source and potability of drinking water, habits related to washing fruits and vegetables prior to consumption, attendance at swimming pools and children's playgrounds, use of public transportation, frequency of international travel, and prior knowledge of the disease.

The parasite was identified in all age groups except those aged 11–17 years, with the highest prevalence observed in children aged 1–5 years (2.62%), although no statistically significant differences were detected between age groups. Infection was detected in individuals aged between 10 months and 81 years, and all infected patients presented with diarrhea; prevalence did not differ significantly by sex.

The infection rate was higher among participants from urban areas and this difference was statistically significant. Although prevalence was higher among individuals living in apartments and those with recent episodes of diarrhea, these differences were not statistically significant. Most patients reported consuming potable water, including some of those infected with *Cryptosporidium*.

The majority of respondents stated that they wash fruits before consumption, do not attend swimming pools, rarely use public transportation, and have not traveled abroad; nevertheless, *Cryptosporidium* infection was identified both among these individuals and among those reporting different behaviors. A higher prevalence was observed among individuals who frequented children's playgrounds, and very few participants had heard of cryptosporidiosis, none of whom were infected.

The prevalence of *Cryptosporidium* infection was higher among patients who reported contact with animals, however, the differences were not statistically significant. Similar results were noted when comparing animal owners with non-owners, with infection being more frequently observed among those who owned animals.

Most participants reported washing their hands after animal contact; however, *Cryptosporidium* infection was identified both in this group and more frequently among those who acknowledged poor hand hygiene, without statistically significant differences.

Cryptosporidium infections were identified in both patients with diarrhea and those without diarrhea.

This study confirms the usefulness of combining classical parasitological methods with rapid immunochromatographic assays for diagnosing *Cryptosporidium* infection in

hospitalized patients. Infection was identified in all age groups, with higher prevalence in children aged 1–5 years and adults aged 40–59 years, but without significant associations with age or sex.

A significantly higher prevalence was observed in urban residents, suggesting that cryptosporidiosis also represents an important urban public health concern. Although factors such as animal contact, hygiene practices, water consumption, travel, and lifestyle habits influenced prevalence rates, none were identified as independent risk factors.

Most infected individuals had no prior knowledge of cryptosporidiosis, highlighting the importance of health education and awareness programs. In addition, positive cases were detected both in symptomatic and asymptomatic patients, emphasizing the need for improved surveillance and routine diagnostic screening in high-risk hospital settings.

Overall, the findings indicate that cryptosporidiosis is a multifactorial infection with complex transmission pathways, supporting the need for comprehensive diagnostic strategies, continued epidemiological surveillance, and strengthened public health education.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPECIES/GENOTYPES IN HUMANS FROM WESTERN ROMANIA

The aim of this study was to identify the zoonotic species of *Cryptosporidium* in hospitalized patients from Western Romania.

For this purpose, a total of 312 stool samples were collected from patients hospitalized at Victor Babeș Infectious Diseases Hospital in Timișoara.

Samples were examined using a rapid chromatographic test (CerTest Crypto) and the modified Ziehl–Neelsen staining method described by Henriksen and Pohlenz. Seven of the positive samples identified by both methods were subjected to genetic analysis. PCR amplification was performed according to the techniques described by Xiao et al. (1999, 2001) and Fayer and Xiao (2008), with minor modifications. Conventional PCR was used to generate multiple copies of an approximately 850 bp fragment of the SSU rRNA gene.

To confirm species identity, the PCR products were sequenced and compared with sequences available in the GenBank database using BLAST alignment (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Zhang et al., 2000).

Eighteen samples were positive for *Cryptosporidium*, of which seven were submitted for sequencing. Following sequence analysis, three *Cryptosporidium* species were identified: *C. parvum, C. canis*, and *C. ryanae* (formerly known as the deer-like genotype). The sequences obtained for *C. parvum* were deposited in the GenBank database accession

numbers: PP979614 and PQ047137. The sequences obtained for *C. canis* were deposited in the GenBank database accession numbers: PP979613 and PP979610.1.

A phylogenetic tree was constructed based on the *C. parvum* and *C. canis* isolates; *C. ryanae* isolates were not included, as they were not deposited in GenBank.

The epidemiological characteristics of the seven PCR-positive cases infected with different *Cryptosporidium* species are described. Cases positive for *C. canis* and *C. parvum* included individuals from both rural and urban environments. Infection with *C. ryanae* was identified in three individuals from an urban setting belonging to the same family. Most epidemiological characteristics varied considerably and were difficult to incriminate as clear risk factors, with differences not being statistically significant. All positive patients reported consuming water from safe sources; nevertheless, they contracted the infection. However, a potential important risk factor may be the fact that none of the patients had ever heard of *Cryptosporidium* infection.

This study highlights the importance of molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* infections in hospitalized patients. PCR and sequencing identified three species—*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium canis*, and *Cryptosporidium ryanae*—demonstrating the etiological diversity of human cryptosporidiosis.

This research reports for the first time in Romania the presence of *C. canis* and *C. ryanae* in humans, contributing valuable epidemiological and molecular data. Phylogenetic analysis supported the zoonotic potential of *C. canis* and confirmed the evolutionary distinction of *C. parvum* isolates.

No clear dominant risk factor was identified, as infections occurred in both urban and rural settings. However, the detection of *C. ryanae* within the same family suggests possible intrafamilial transmission or common exposure. The lack of awareness about cryptosporidiosis among all patients further emphasizes the need for public health education.

Overall, the findings suggest that cryptosporidiosis is likely underdiagnosed in Romania and support the integration of molecular diagnostic methods, enhanced epidemiological surveillance, and improved prevention strategies.

EXPERIMENTAL INFECTION IN MICE WITH *CRYPTOSPORIDIUM* ISOLATES FROM HUMANS

This study aimed to assess the potential of rodents to serve as a source of *Cryptosporidium* infection for humans.

To achieve this objective, separate inocula were prepared for three *Cryptosporidium* species—*C. parvum, C. canis*, and *C. ryanae*—according to an in-house protocol.

The research included three experimental groups: Group I consisted of 9 pups, Group II of 10 pups, and Group III of 11 pups. Mice in each group were orally inoculated with 0.05 mL of the corresponding suspension: *C. parvum* for Group I, *C. ryanae* for Group II, and *C. canis* for Group III.

Fecal samples were collected individually from each mouse at 3, 4, 7, and 10 days post-infection (p.i.). Each fecal sample was subjected to direct coproparasitological examination. The number of oocysts per microscopic field was estimated based on the mean value obtained from ten examined fields.

Starting on day 14 p.i., due to dietary changes and alterations in fecal consistency, fecal testing was continued using a rapid diagnostic test. Individual fecal samples were collected and examined using the CerTest Crypto rapid chromatographic test on days 14, 17, 23, 31, and 40 p.i. In addition, the three adult female mice were tested using the same CerTest Crypto test on the day of pup infection and subsequently on days 3, 4, 17, 23, 31, and 40 post-infection, in order to monitor potential infection and oocyst shedding.

At 4 days post-infection, all infected mice, regardless of the *Cryptosporidium* species involved, shed oocysts in their feces. The number of oocysts was low (<1 oocyst per microscopic field), with a single exception—one mouse infected with *C. parvum*, in which more than one oocyst per microscopic field was observed.

Gradually, by day 10 post-infection, the number of oocysts decreased, most likely due to the increased difficulty of identifying them in native smears, as food residues could obscure the microscopic field once the diet was no longer exclusively milk-based.

Subsequently, using rapid immunochromatographic tests, it was observed that at two weeks post-infection all mice included in the experiment, irrespective of the *Cryptosporidium* species involved, tested positive for *Cryptosporidium* infection. Moreover, at 17 days post-infection, *Cryptosporidium* was also detected in the adult females (the mothers of the infected pups) using the same rapid test. At 40 days post-infection, both the pups and their mothers remained positive when examined using the immunochromatographic test.

No clinical alterations were observed throughout the study. During the experimental period, the general condition, appetite, and fecal consistency of all mice remained normal. No mortality was recorded.

The present study demonstrates that human-derived Cryptosporidium species (C. canis, C. ryanae, and C. parvum) can successfully infect immunocompetent conventional mice, without the need for immunosuppression. Oocyst shedding was detected early after infection and persisted for up to 40 days, confirming the ability of the parasite to establish prolonged subclinical infections.

The detection of infection in both experimentally infected pups and their dams provides evidence of horizontal transmission and supports the potential role of mice as

reservoirs of infection. Despite persistent infection, no clinical signs were observed, highlighting the asymptomatic nature of murine cryptosporidiosis and the epidemiological importance of subclinical carriers.

These findings demonstrate the suitability of the murine model for studying Cryptosporidium persistence and transmission and support the hypothesis of interspecific transmission of human-derived isolates. The study contributes with new epidemiological data, highlighting the need for further research based on the One Health concept regarding the zoonotic potential and transmission dynamics of Cryptosporidium species.

GENERAL CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS

The present doctoral thesis provides a comprehensive and integrated investigation of cryptosporidiosis in Western Romania, combining epidemiological, clinical, molecular, and experimental approaches.

The results indicate that the overall prevalence of *Cryptosporidium* infection in the investigated population was relatively low, falling within the range previously reported in Romania and other Eastern European countries. The fact that positive cases were identified exclusively among patients hospitalized in infectious diseases wards highlights the importance of the clinical context in both the occurrence and detection of infection.

Comparative analysis of the diagnostic methods revealed the significant impact of diagnostic sensitivity on prevalence estimates. The findings support the use of combined diagnostic strategies in both clinical practice and epidemiological studies in order to avoid underdiagnosis and underestimation of cryptosporidiosis prevalence.

From a demographic perspective, cryptosporidiosis was identified across all age categories, except those aged 11–17 years, with no statistically significant differences between sexes. Children aged 1–5 years represented the most frequently affected group, highlighting increased vulnerability during early childhood.

Analysis of the residential environment showed a higher prevalence of infection in urban areas compared with rural settings, contrary to traditional assumptions that primarily associate cryptosporidiosis with rural environments and direct animal contact. The variability of results across studies further emphasizes the context-dependent nature of cryptosporidiosis and the need to interpret epidemiological data in relation to local socio-environmental conditions.

Risk factor analysis did not identify significant independent predictors. Variables such as type of housing, water source, food hygiene practices, swimming pool attendance, use of public transportation, exposure in playgrounds, international travel, and contact with animals showed no statistically significant associations with infection.

From a clinical standpoint, an important observation was the identification of *Cryptosporidium* infection in both symptomatic patients with diarrhea and asymptomatic individuals without recent gastrointestinal manifestations. Asymptomatic carriers represent a major epidemiological concern, given their potential role in the unnoticed transmission of infection.

A major original contribution of this thesis is the molecular characterization of *Cryptosporidium* species involved in human infections. The identification of *C. parvum, C. canis*, and *C. ryanae* demonstrates considerable etiological heterogeneity and expands the spectrum of species implicated in human cryptosporidiosis. The first documented report in Romania of human infections with *C. canis* and *C. ryanae* constitutes a significant contribution to national epidemiological data and suggests the existence of zoonotic transmission cycles that have been insufficiently explored.

The experimental findings complement the epidemiological data by demonstrating the ability of human-derived *Cryptosporidium* isolates to infect and persist in immunocompetent mice. Persistence of infection, confirmed by immunological methods in the absence of clinical signs, highlights the subclinical nature of infection and the parasite's capacity to persist in apparently healthy hosts. Transmission observed between infected pups and adult females under cohabitation conditions demonstrates horizontal transmission and maintenance of infection in dense host populations.

Future approaches should be interdisciplinary and aligned with the "One Health" concept, recognizing the interdependence of human, animal, and environmental health.

Personal Contributions. This doctoral thesis provides original and significant contributions to the fields of epidemiology, diagnostics, and experimental biology of *Cryptosporidium* infections, including:

1. An updated epidemiological assessment of cryptosporidiosis in Western Romania using a large and diverse study population and multiple diagnostic approaches.

2. Demonstrating the influence of diagnostic methodology on prevalence estimation and highlighting the limitations of direct coproparasitological examination.
3. Identifying by molecular methods the *Cryptosporidium* species responsible for human infections, providing robust data on etiological diversity.
4. Reporting for the first time in Romania human infections with *Cryptosporidium canis* and *Cryptosporidium ryanae*, with important zoonotic implications.
5. Depositing newly characterized molecular sequences in GenBank, contributing to international genetic databases and enabling global phylogenetic comparisons.
6. Performing phylogenetic analyses that elucidate evolutionary relationships and zoonotic potential of the identified species.
7. Developing and applying an immunocompetent murine model of cryptosporidiosis, demonstrating that infection can be established without artificial immunosuppression.
8. Providing experimental evidence of inter-individual transmission and long-term subclinical persistence of infection.
9. Highlighting the role of subclinical infections and asymptomatic carriers in the maintenance and dissemination of the parasite, with important epidemiological and clinical implications.
10. Integrating epidemiological, molecular, and experimental data to offer a unified perspective on cryptosporidiosis at the national level.
11. Formulating practical recommendations for clinical practice and public health, including molecular diagnostic integration, targeted screening in high-risk hospital settings, and enhanced health education initiatives.

Through these contributions, the thesis significantly advances the understanding of cryptosporidiosis in Romania and provides a solid foundation for future research and the development of effective strategies for controlling this parasitic disease.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ”
DIN TIMIȘOARA**

FACULTATEA DE MEDICINĂ

DEPARTAMENTUL XIII – BOLI INFECȚIOASE

DISCIPLINA DE PARAZITOLOGIE

DĂRĂBUȘ RODICA GEORGIANA



REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. OLARIU TUDOR OVIDIU RAREȘ

Timișoara

2026

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ”
DIN TIMIȘOARA**

FACULTATEA DE MEDICINĂ

DEPARTAMENTUL XIII – BOLI INFECȚIOASE

DISCIPLINA DE PARAZITOLOGIE

DĂRĂBUȘ RODICA GEORGIANA

REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI DE EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVĂ ȘI MOLECULARĂ ÎN CRIPTOSPORIDIOZA UMANĂ

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. OLARIU TUDOR OVIDIU RAREȘ

Timișoara

2026

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

„CERCETĂRI DE EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVĂ ȘI MOLECULARĂ ÎN CRIPTOSPORIDIOZA UMANĂ”

CUPRINS

Lista cu lucrările științifice publicate.....VI

Lista cu abrevieri și simboluri.....VIII

Lista tabelelor și a figurilor IX

Mulțumiri.....XII

INTRODUCEREA 1

PARTEA GENERALĂ.....5

CAPITOLUL 1. ISTORIC 5

CAPITOLUL 2. CICLUL BIOLOGIC AL PROTOZOARULUI.....8

CAPITOLUL 3. EPIDEMIOLOGIE.....15

3.1. PREVALENȚA INFECTIEI CU *CRYPTOSPORIDIUM* 15

3.2. FACTORII DE RISC ÎN CRIPTOSPORIDIOZĂ.....20

3.2.1. FACTORI INTRINSECI.....20

3.2.2. FACTORI EXTRINSECI.....22

CAPITOLUL 4. ABORDĂRI DIAGNOSTICE ÎN CRIPTOSPORIDIOZĂ

.....31

4.1. DIAGNOSTICUL CLINIC 31

4.2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR.....31

4.2.1. DIAGNOSTIC COPROLOGIC..... 31

4.2.1.1. Diagnostic coproscopic.....31

4.2.1.2. Diagnostic imunologic..... 34

4.2.1.3. Metode moleculare.....36

PARTEA SPECIALĂ 38

CAPITOLUL 5. MOTIVAȚIA ȘI SCOPUL CERCETĂRII 38

5.1. OBIECTIVELE CERCETĂRII 39

CAPITOLUL 6. PREVALENȚA CRIPTOSPORIDIOZEI ÎN VESTUL ROMÂNIEI

.....41

6.1. SCOPUL STUDIULUI.....41

6.2. MATERIALE ȘI METODE 41

6.3. REZULTATE 43

6.4. DISCUȚII 51
6.5. CONCLUZII 56
CAPITOLUL 7. EVALUAREA FACTORILOR DE RISC ÎN CRIPTOSPORIDIOZA UMANĂ......59
7.1. SCOPUL STUDIULUI ……59
7.2. MATERIALE ȘI METODE……..59
7.3. REZULTATE ……..……..……..……. 62
7.4. DISCUȚII 73
7.5. CONCLUZII 79
CAPITOLUL 8. IDENTIFICAREA MOLECULARĂ A SPECIEI/GENOTIPULUI *CRYPTOSPORIDIUM* LA OAMENII DIN VESTUL ROMÂNIEI……83
8.1. SCOPUL STUDIULUI ……..……..……..83
8.2. MATERIALE ȘI METODE.....83
8.3. REZULTATE ……..……..89
8.4. DISCUȚII 99
8.5. CONCLUZII 102

CAPITOLUL 9. INFECȚIA EXPERIMENTALĂ LA ȘOARECI CU *CRYPTOSPORIDIUM* IZOLAT DE LA OAMENI ……104
9.1. SCOPUL STUDIULUI ……..……..104
9.2. MATERIALE ȘI METODE 104
9.3. REZULTATE ……..……107
9.4. DISCUȚII 112
9.5. CONCLUZII 115
CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE 118
BIBLIOGRAFIE 123
ANEXA I: CONSIMȚĂMÂNT INFORMAT I
ANEXA II: CHESTIONAR EPIDEMIOLOGIC PENTRU CRIPTOSPORIDIOZA …….II
ANEXA III : Banca de Gene.....III
ANEXA IV : ARTICOLE ȘTIINȚIFICE ÎN TEXT INTEGRAL.....VII

Cryptosporidioza este o protozoonoză răspândită la nivel global, afectând oameni și animale indiferent de climat sau condiții socioeconomice. Boala se manifestă clinic variabil, de la forme inaparente la diaree severă, și poate determina focare epidemice. Importanța sa epidemiologică derivă din caracterul oportunist, zoonotic și antroponotic. Criptosporidioza a fost inclusă în inițiativa privind bolile neglijate a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), subliniind necesitatea intensificării cercetărilor în acest domeniu.

Prevalența globală este estimată la circa 7–8%, cu rate mai mari în regiuni în curs de dezvoltare. Deși valorile variază în funcție de populațiile investigate, infecția rămâne semnificativă în grupurile vulnerabile, precum copiii și pacienții HIV-pozitivi. Morbiditatea anuală la nivel mondial se apropie de 13 milioane de cazuri.

Validarea speciilor de *Cryptosporidium* se bazează pe criterii morfologice, genetice și de specificitate de gazdă, fiind recunoscute în prezent 44 de specii și peste 120 de genotipuri. La om au fost identificate 19 specii, dintre care *C. hominis* și *C. parvum* provoacă peste 95% din infecții. Numeroase specii animale au potențial zoonotic, reflectând complexitatea relației om–animal.

Transmiterea se realizează în principal prin apă și alimente contaminate sau prin contact cu animale domestice și sălbatice. Prezența oochisturilor a fost documentată în apă potabilă, râuri, piscine și ape reziduale, cu surse de contaminare de origine umană și animală.

Alegerea acestei teme de cercetare a fost motivată de impactul major al criptosporidiozei asupra sănătății publice, precum și de complexitatea relațiilor epidemiologice dintre gazde, agenți patogeni și mediu. În România, datele privind criptosporidioza umană sunt limitate, majoritatea studiilor fiind realizate în trecut și pe eșantioane populaționale reduse. Această lipsă de informații a constituit un argument suplimentar pentru abordarea acestei teme în cadrul unei cercetări doctorale.

Această teză este structurată în trei părți: partea generală, partea specială și concluziile.

PARTEA GENERALĂ include o scurtă prezentare istorică, ciclul biologic al protozoarului, epidemiologia și metodele de diagnostic în criptosporidioză.

PARTEA SPECIALĂ cuprinde patru studii distincte care abordează diferite aspecte ale temei de cercetare. Acestea includ investigarea prevalenței criptosporidiozei în vestul României, evaluarea factorilor de risc asociați infecției umane și caracterizarea moleculară a speciilor și genotipurilor de *Cryptosporidium* identificate la subiecți umani din această

regiune. În plus, lucrarea include infecții experimentale realizate la șoareci utilizând izolate de *Cryptosporidium* provenite din cazuri umane.

Concluziile includ cele mai relevante rezultate ale studiilor, recomandări pentru cercetări viitoare și contribuțiile originale.

Obiectivele cercetării:

I. Determinarea prevalenței criptosporidiozei umane în vestul României.

II. Identificarea potențialilor factori de risc în criptosporidioza umană.

III. Identificarea moleculară a speciilor/genotipurilor de *Cryptosporidium* care infectează oamenii în România.

IV. Investigarea relațiilor epidemiologice om–animal prin infecții experimentale la animale de laborator.

PREVALENȚA CRIPTOSPORIDIOZEI ÎN VESTUL ROMÂNIEI

Scopul acestei cercetări a fost determinarea prevalenței infecției cu *Cryptosporidium* în diferite grupuri populaționale din vestul României.

Între februarie 2024 și octombrie 2025, au fost colectate un total de 584 de probe fecale provenite din diferite grupuri populaționale: pacienți spitalizați, elevi din școli periurbane și rurale, personal și aparținători ai unei clinici veterinare, precum și persoane dintr-o fermă de bovine pentru lapte.

La investigație au participat grupuri populaționale din mediul urban și rural, de sex masculin și feminin, cu vârste cuprinse între două luni și 90 de ani. Pentru identificarea infecției cu *Cryptosporidium* spp. s-au utilizat trei metode: examenul direct al fecalelor, metoda Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen și un test calitativ cromatografic rapid.

Infecția cu *Cryptosporidium* spp. a fost identificată doar la pacienții din spitalul de boli infecțioase. Prin metoda Ziehl-Neelsen modificată de Henriksen și un test calitativ cromatografic rapid s-au identificat 18 probe pozitive iar prin examenul direct pe lamă doar 16 probe.

Prevalența globală a fost de 3,1%. În cele două secții ale spitalului de boli infecțioase, ratele prevalenței au fost de 3,4%, respectiv 7,6%. Deși au fost observate diferențe, acestea nu au fost semnificative statistic. Luată pe categorii de vârstă, cazuistica pozitivă este mai mare la copiii în vârstă de 1-5 ani. Cu toate acestea, numarul mic de cazuri studiate face ca diferențele să nu fie semnificative statistic.

Diferențele de prevalență între sexe au fost nesemnificative statistic. Cu toate că prevalența parazitismului cu *Cryptosporidium* spp. a fost mai mult decât dublă în mediul urban (4,4%) față de rural (2,1%), diferențele sunt considerate nesemnificative din cauza numărului, totuși, redus de cazuri pozitive pentru fiecare categorie.

Studiul oferă o evaluare actualizată a prevalenței criptosporidiozei în vestul României și evidențiază influența metodelor diagnostice și a contextului clinic asupra detectării infecției. Deși prevalența globală a fost scăzută, toate cazurile pozitive au fost identificate în rândul pacienților spitalizați, susținând caracterul oportunist al infecției cu *Cryptosporidium* spp.

Colorarea Ziehl–Neelsen modificată și testul CerTest Crypto au prezentat rate de detecție mai ridicate comparativ cu microscopia directă, subliniind importanța utilizării unor abordări diagnostice combinate. Copiii cu vârsta între 1 și 5 ani au reprezentat grupa cea mai afectată, în timp ce nu au fost observate diferențe semnificative în funcție de sex sau mediul de rezidență.

În ansamblu, rezultatele sugerează că prevalența criptosporidiozei în vestul României este influențată în principal de sensibilitatea metodelor diagnostice și de statusul clinic, mai degrabă decât de factorii demografici, subliniind necesitatea utilizării unor metode diagnostice precise și a continuării supravegherii epidemiologice.

EVALUAREA FACTORILOR DE RISC PENTRU CRIPTOSPORIDIOZA UMANĂ

Acest studiu a avut ca scop evaluarea factorilor de risc pentru criptosporidioză în rândul pacienților spitalizați din vestul României.

Între februarie și aprilie 2024, au fost colectate un total de 312 probe de materii fecale proaspete de la pacienți internați la Spitalul de Boli Infecțioase „Victor Babeș” din Timișoara. Pacienții au fost diagnosticați cu diverse patologii care ar putea reprezenta factori de risc potențiali pentru infecția cu *Cryptosporidium*. Toți participanții incluși în studiu au fost supuși atât unui examen clinic, cât și unui interviu bazat pe chestionar și au semnat un „Consimțământ informat”. Fiecare pacient a primit tratament pentru afecțiunea principală pentru care a fost internat.

Populația studiată a inclus atât pacienți de sex masculin, cât și feminin, cu vârste cuprinse între două luni și 90 de ani. Pacienții internați au provenit atât din mediul urban, cât și din mediul rural din vestul României.

Diagnosticul criptosporidiozei umane a fost realizat utilizând teste diagnostice rapide și metoda de colorare Ziehl–Neelsen modificată, descrisă de Henriksen.

Pentru evaluarea potențialilor factori de risc, au completat un chestionar cuprinzător. Chestionarul a fost elaborat prin efortul colaborativ al unei echipe multidisciplinare de specialiști, fiind ghidați de recomandările și documentele emise de Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (ECDC) privind criptosporidioza. Chestionarul a colectat o gamă largă de informații, inclusiv zona de rezidență, sexul, simptomele gastrointestinale raportate, deținerea de animale, frecvența și natura contactului cu animalele, practicile de spălare a mâinilor după contactul cu animalele, sursa și potabilitatea apei de băut,

obiceiurile legate de spălarea fructelor și legumelor înainte de consum, frecventarea piscinelor și a locurilor de joacă pentru copii, utilizarea transportului public, frecvența călătoriilor internaționale și cunoștințele anterioare despre boală.

Parazitul a fost identificat în toate grupele de vârstă, cu excepția celei de 11–17 ani, iar cea mai mare prevalență a fost la copiii de 1–5 ani (2,62%), fără diferențe semnificative statistic între grupe. Infecția a fost detectată la vârste cuprinse între 10 luni și 81 de ani, toți pacienții prezentând diaree, iar prevalența nu a diferit semnificativ nici în funcție de sex.

Rata infecției a fost mai mare în rândul participanților din mediul urban, iar această diferență a fost semnificativă statistic. Deși prevalența a fost mai ridicată la persoanele care locuiau în apartamente și la cele cu episoade recente de diaree, aceste diferențe nu au fost semnificative statistic. Majoritatea pacienților consumau apă potabilă, inclusiv unii dintre cei infectați cu *Cryptosporidium*.

Majoritatea respondenților au declarat că spală fructele înainte de consum, nu frecventează piscinele, folosesc rar transportul public și nu au călătorit în străinătate, însă infecția cu *Cryptosporidium* a fost identificată atât în rândul acestora, cât și al celor cu comportamente diferite. O prevalență mai mare a fost observată la persoanele care frecventau locurile de joacă pentru copii, iar foarte puțini participanți auziseră de criptosporidioză, niciunul dintre aceștia nefiind infectat.

Prevalența infecției cu Cryptosporidium a fost mai mare în rândul pacienților care au raportat contact cu animale, însă diferențele nu au fost semnificative statistic. Rezultate similare au fost observate la compararea proprietarilor de animale cu persoanele care nu dețineau animale, infecția fiind mai frecvent întâlnită la cei care aveau animale.

Majoritatea participanților au declarat că se spală pe mâini după contactul cu animalele, însă infecția cu *Cryptosporidium* a fost identificată atât în acest grup, cât și mai frecvent la cei care au recunoscut că nu respectă igiena mâinilor, fără diferențe semnificative statistic.

Infecțiile cu *Cryptosporidium* au fost identificate atât la pacienți cu diaree, cât și la pacienți fără diaree.

Studiul confirmă utilitatea combinării metodelor parazitologice clasice cu testele imunocromatografice rapide pentru diagnosticul infecției cu *Cryptosporidium* la pacienții spitalizați. Infecția a fost identificată în toate grupele de vârstă, cu o prevalență mai mare la copiii cu vârsta între 1 și 5 ani și la adulții cu vârsta între 40 și 59 de ani, însă fără asocieri semnificative cu vârsta sau sexul.

O prevalență semnificativ mai mare a fost observată la persoanele din mediul urban, sugerând că criptosporidioza reprezintă și o importantă problemă de sănătate publică urbană. Deși factori precum contactul cu animalele, practicile de igienă, consumul de apă,

călătoriile și obiceiurile de viață au influențat ratele de prevalență, niciunul nu a fost identificat ca factor de risc independent.

Majoritatea persoanelor infectate nu aveau cunoștințe anterioare despre criptosporidioză, evidențiind importanța programelor de educație și conștientizare în domeniul sănătății. În plus, cazuri pozitive au fost detectate atât la pacienți simptomatici, cât și asimptomatici, subliniind necesitatea îmbunătățirii supravegherii și a screeningului diagnostic de rutină în mediile spitalicești cu risc crescut.

În ansamblu, rezultatele indică faptul că criptosporidioza este o infecție multifactorială, cu căi complexe de transmitere, susținând necesitatea unor strategii diagnostice comprehensive, a continuării supravegherii epidemiologice și a consolidării educației pentru sănătate publică.

IDENTIFICAREA MOLECULARĂ A SPECIILOR/GENOTIPURILOR DE *CRYPTOSPORIDIUM* LA OAMENI DIN VESTUL ROMÂNIEI

Scopul acestui studiu a fost identificarea speciilor zoonotice de *Cryptosporidium* la pacienții spitalizați din vestul României.

În acest scop, au fost colectate un total de 312 probe de materii fecale de la pacienți internați la Spitalul de Boli Infecțioase „Victor Babeș” din Timișoara.

Probele au fost examinate cu un test cromatografic rapid - CerTest Crypto și prin metoda de colorare Ziehl–Neelsen modificată de Henriksen and Pohlenz. Șapte dintre probele pozitive identificate prin ambele metode au fost supuse analizei genetice. Reacția PCR a fost realizată conform tehnicii descrise de Xiao et al. (1999, 2001) și Fayer și Xiao (2008), cu modificări minore. Amplificarea propriu-zisă a fost efectuată prin PCR convențional și a vizat obținerea mai multor copii ale unui fragment de 850 pb al genei SSU rRNA.

Pentru confirmarea identității speciilor, produsele PCR au fost secvențiate și comparate cu cele disponibile în baza de date GenBank utilizând alinierea BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Zhang et al., 2000).

Din totalul probelor investigate, 18 au fost identificate ca pozitive pentru infecția cu *Cryptosporidium*, iar dintre acestea șapte au fost trimise la secvențiere. Urmare a secvențierii probelor, s-au identificat trei specii de *Cryptosporidium*: *C. parvum, C. canis* și *C. ryanae* (anterior cunoscut ca genotip de tip „deer-like”). Secvențele obținute pentru *C. parvum* au fost depuse în baza de date GenBank, numere de acces: PP979614 și PQ047137. Secvențele obținute pentru *C. canis* au fost depuse în baza de date GenBank, numere de acces: PP979613 și PP979610.1.

Pe baza izolatelor de *C. parvum* și *C. canis* a fost construit un arbore filogenetic; izolatele de *C. ryanae* nu au fost incluse, deoarece nu au fost depuse în GenBank.

Sunt descrise caracteristicile epidemiologice ale celor șapte cazuri pozitive infectate cu diferite specii de *Cryptosporidium* și testate prin PCR. Cazurile pozitive pentru *C. canis* și *C. parvum* au inclus persoane provenite atât din mediul rural, cât și din mediul urban. Infecția cu *C. ryanae* a fost identificată la trei persoane din mediul urban, aparținând aceleiași familii. Majoritatea caracteristicilor epidemiologice au variat considerabil și sunt dificil de incriminat drept factori de risc clari, diferențele nefiind semnificative statistic. Toți pacienții pozitivi au raportat consumul de apă din surse sigure, cu toate acestea au contractat infecția. Totuși, un potențial factor de risc important poate fi faptul că niciunul dintre pacienți nu auzise vreodată de infecția cu *Cryptosporidium*.

Studiul evidențiază importanța metodelor moleculare pentru diagnosticul și caracterizarea infecțiilor cu *Cryptosporidium* la pacienții spitalizați. PCR-ul și secvențierea au identificat trei specii — *Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium canis* și *Cryptosporidium ryanae* — demonstrând diversitatea etiologică a criptosporidiozei umane.

Această cercetare raportează pentru prima dată în România prezența *C. canis* și *C. ryanae* la om, contribuind cu date epidemiologice și moleculare valoroase. Analiza filogenetică a susținut potențialul zoonotic al *C. canis* și a confirmat distinctivitatea evolutivă a izolatelor de *C. parvum*.

Nu a fost identificat niciun factor de risc dominant clar, deoarece infecțiile au fost întâlnite atât în mediul urban, cât și în cel rural. Totuși, detectarea *C. ryanae* în cadrul aceleiași familii sugerează o posibilă transmitere intrafamilială sau o expunere comună. Lipsa cunoștințelor despre criptosporidioză la toți pacienții subliniază suplimentar necesitatea educației pentru sănătate publică.

În ansamblu, rezultatele sugerează că criptosporidioza este probabil subdiagnosticată în România și susțin integrarea metodelor moleculare de diagnostic, intensificarea supravegherii epidemiologice și îmbunătățirea strategiilor de prevenție.

INFECȚIA EXPERIMENTALĂ LA ȘOARECI CU IZOLATE DE CRYPTOSPORIDIUM PROVENITE DE LA OAMENI

Acest studiu a avut ca scop evaluarea potențialului rozătoarelor de a reprezenta o sursă de infecție cu *Cryptosporidium* pentru oameni.

Pentru realizarea acestui deziderat, s-a preparat separat câte un inocul din trei specii de *Cryptosporidium: C. parvum, C. canis* și *C. ryanae*, pe baza unui protocol propriu.

Studiul a inclus trei grupuri experimentale: grupul I a fost format din 9 pui, grupul II din 10 pui, iar grupul III din 11 pui. Șoarecii din fiecare grup au fost inoculați oral cu 0,05 ml din suspensia corespunzătoare: *C. parvum* pentru grupul I, *C. ryanae* pentru grupul II și *C. canis* pentru grupul III.

Probele fecale au fost colectate individual de la fiecare șoarece la 3, 4, 7 și 10 zile post-infecție (p.i.). Fiecare probă fecală a fost supusă unui examen coproparazitologic direct. Numărul de oochisturi pe câmp a fost estimat pe baza valorii medii obținute din aceste zece câmpuri.

Începând cu ziua 14 p.i., din cauza modificărilor dietetice și a modificării consistenței fecalelor, testarea materiilor fecale a fost continuată utilizând un test diagnostic rapid. Probele fecale individuale au fost colectate și examinate prin testul cromatografic rapid CerTest Crypto în zilele 14, 17, 23, 31 și 40 p.i. În plus, cele trei femele adulte de șoarece au fost testate utilizând același test CerTest Crypto în ziua infectării șoriceilor și ulterior în zilele 3, 4, 17, 23, 31 și 40 post-infecție, pentru a monitoriza o eventuală infecție și eliminarea oochisturilor.

La 4 zile post-infecție, toți șoarecii infectați, indiferent de specia de *Cryptosporidium* implicată, au eliminat oochisturi în materiile fecale. Numărul de oochisturi a fost redus (<1 oochist per câmp microscopic), cu o singură excepție — un șoarece infectat cu *C. parvum*, la care s-au observat mai mult de un oochist per câmp microscopic.

Treptat, până în ziua a 10-a post-infecție, numărul de oochisturi a scăzut, cel mai probabil din cauza dificultății crescute de identificare a acestora în frotiurile native, întrucât resturile alimentare puteau masca câmpul microscopic, odată ce dieta nu a mai fost exclusiv lactată.

Ulterior, utilizând teste rapide imunocromatografice, s-a observat că la două săptămâni post-infecție toți șoarecii incluși în experiment, indiferent de specia de *Cryptosporidium* implicată, au fost pozitivi pentru infecția cu *Cryptosporidium*. Mai mult, la 17 zile post-infecție, *Cryptosporidium* a fost detectat și la femelele adulte (mamele puilor infectați) prin intermediul aceluiași test rapid. La 40 de zile post-infecție, atât puii, cât și mamele acestora au rămas pozitivi la examinarea prin testul imunocromatografic.

Pe parcursul studiului nu au fost observate modificări clinice. Pe durata perioadei experimentale, starea generală, apetitul și consistența fecalelor tuturor șoarecilor au rămas normale. Nu s-a înregistrat nicio mortalitate.

Prezentul studiu demonstrează că speciile de *Cryptosporidium* provenite de la om (*C. canis, C. ryanae* și *C. parvum*) pot infecta cu succes șoareci convenționali imunocompetenți, fără necesitatea imunosupresiei. Eliminarea oochisturilor a fost detectată precoce după infecție și a persistat până la 40 de zile, confirmând capacitatea parazitului de a produce infecții subclinice prelungite.

Detectarea infecției atât la puii infectați experimental, cât și la femelele-mamă oferă dovezi ale transmiterii orizontale și susține potențialul șoarecilor de a acționa ca rezervoare de infecție. În ciuda persistenței infecției, nu au fost observate semne clinice, evidențiind

caracterul asimptomatic al criptosporidiozei murine și importanța epidemiologică a purtătorilor subclinici.

Aceste rezultate demonstrează adecvarea modelului murin pentru studierea persistenței și transmiterii *Cryptosporidium* și susțin ipoteza transmiterii interspecifice a izolatelor provenite de la om. Studiul contribuie cu noi date epidemiologice, subliniind necesitatea unor cercetări suplimentare orientate pe conceptul One Health privind potențialul zoonotic și dinamica transmiterii speciilor de *Cryptosporidium*.

CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Prezenta teză de doctorat oferă o investigație amplă și integrată a criptosporidiozei în vestul României, combinând abordări epidemiologice, clinice, moleculare și experimentale.

Rezultatele indică faptul că prevalența globală a infecției cu *Cryptosporidium* în populația investigată a fost relativ scăzută, situându-se în intervalul raportat anterior în România și în alte țări din Europa de Est. Cazurile pozitive fiind identificate exclusiv în rândul pacienților internați în secțiile de boli infecțioase evidențiază importanța contextului clinic atât în apariția, cât și în detectarea infecției.

Analiza comparativă a metodelor de diagnostic utilizate a relevat influența semnificativă a sensibilității diagnostice asupra estimării prevalenței. Rezultatele obținute susțin utilizarea strategiilor diagnostice combinate atât în practica clinică, cât și în studiile epidemiologice, pentru a evita subdiagnosticarea și subestimarea prevalenței criptosporidiozei.

Din punct de vedere demografic, criptosporidioza a fost identificată la toate categoriile de vârstă, cu excepția grupului de 11–17 ani, fără diferențe semnificative statistic între sexe. Copiii cu vârste cuprinse între 1 și 5 ani au reprezentat grupul cel mai frecvent afectat, rezultat care evidențiază vulnerabilitatea crescută în copilăria timpurie.

Analiza mediului de rezidență a arătat o prevalență mai mare a infecției în mediul urban comparativ cu cel rural, contrar presupunerilor tradiționale care asociază criptosporidioza în principal cu mediul rural și contactul direct cu animalele. Variabilitatea rezultatelor între studii subliniază suplimentar caracterul dependent de context al criptosporidiozei și necesitatea interpretării datelor epidemiologice în raport cu condițiile socio-ambientale locale.

Analiza factorilor de risc nu a identificat predictori independenți semnificativi. Variabile precum tipul locuinței, sursa de apă, igiena alimentară, frecventarea piscinelor, utilizarea transportului public, expunerea în locuri de joacă, călătoriile internaționale și contactul cu animalele nu au prezentat asocieri semnificative.

Din punct de vedere clinic, o observație importantă a fost identificarea infecției cu *Cryptosporidium* atât la pacienți simptomatici cu diaree, cât și la indivizi asimptomatici fără manifestări gastrointestinale recente. Purtătorii asimptomatici reprezintă o preocupare epidemiologică majoră, având un potențial important în transmiterea neobservată a infecției.

O contribuție originală majoră a acestei teze este caracterizarea moleculară a speciilor de *Cryptosporidium* implicate în infecțiile umane. Identificarea speciilor *C. parvum, C. canis* și *C. ryanae* demonstrează o heterogenitate etiologică considerabilă și extinde spectrul speciilor implicate în criptosporidioza umană. Prima raportare documentată în România a infecțiilor umane cu *C. canis* și *C. ryanae* reprezintă o contribuție semnificativă la datele epidemiologice naționale și sugerează existența unor cicluri zoonotice de transmitere insuficient explorate.

Rezultatele experimentale completează datele epidemiologice prin demonstrarea capacității izolatelor de *Cryptosporidium* de origine umană de a infecta și persista la șoareci imunocompetenți. Persistența infecției, confirmată prin metode imunologice în absența semnelor clinice, evidențiază caracterul subclinic al infecției și capacitatea parazitului de a persista la gazde aparent sănătoase. Transmiterea observată între puii infectați și femelele adulte în condiții de coabitare demonstrează transmiterea orizontală și menținerea infecției în populații dense de gazde.

Abordările viitoare ar trebui să fie interdisciplinare și aliniate conceptului „One Health”, recunoscând interdependența dintre sănătatea umană, animală și cea a mediului.

Contribuții personale. Această teză de doctorat aduce contribuții originale și semnificative în domeniile epidemiologiei, diagnosticului și biologiei experimentale ale infecțiilor cu *Cryptosporidium*, incluzând:

1. Evaluare epidemiologică actualizată a criptosporidiozei în vestul României, utilizând o populație de studiu numeroasă și diversă, precum și multiple abordări diagnostice.
2. Demonstrarea influenței metodologiei diagnostice asupra estimării prevalenței și evidențierea limitărilor examinării coproparazitologice directe.

3. Identificarea prin metode moleculare a speciilor de *Cryptosporidium* responsabile de infecțiile umane, furnizând date solide privind diversitatea etiologică.
4. Raportarea pentru prima dată în România a infecțiilor umane cu *Cryptosporidium canis* și *Cryptosporidium ryanae*, cu implicații zoonotice importante.
5. Depunerea noilor secvențe moleculare caracterizate în GenBank, contribuind la bazele de date genetice internaționale și facilitând comparațiile filogenetice globale.
6. Realizarea de analize filogenetice care elucidează relațiile evolutive și potențialul zoonotic al speciilor identificate.
7. Dezvoltarea și aplicarea unui model murin imunocompetent de criptosporidioză, demonstrând că infecția poate fi stabilită fără imunosupresie artificială.
8. Furnizarea de dovezi experimentale privind transmiterea interindividuală și persistența subclinică pe termen lung a infecției.
9. Evidențierea rolului infecțiilor subclinice și a purtătorilor asimptomatici în menținerea și diseminarea parazitului, cu implicații epidemiologice și clinice importante.
10. Integrarea datelor epidemiologice, moleculare și experimentale pentru a oferi o perspectivă unificată asupra criptosporidiozei la nivel național.
11. Formularea unor recomandări practice pentru activitatea clinică și sănătatea publică, incluzând integrarea diagnosticului molecular, screening țintit în mediile spitalicești cu risc crescut și intensificarea programelor de educație pentru sănătate.

Prin aceste contribuții, teza avansează în mod semnificativ înțelegerea criptosporidiozei în România și oferă o bază solidă pentru cercetări viitoare și pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de control al acestei boli parazitare.