

Научная статья

УДК 619:616.9

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-1-84-90>

Идентификация таксономической принадлежности криптоспоридий у поросят в условиях северо-запада РФ при помощи молекулярно-генетических методов

Андрей Леонидович Кряжев¹, Артём Сергеевич Новиков²

^{1,2} ФГБОУ ВО Вологодская Государственная молочноехозяйственная академия им. Н. В. Верещагина, Вологда, Россия

¹ kamarnett@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7015-8063>

² vetnovikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6919-8524>

Аннотация

Цель исследований – определение таксонов представителей рода *Cryptosporidium* у поросят при помощи молекулярно-генетических методик в условиях северо-запада РФ.

Материалы и методы. Пробы фекалий брали у поросят разного возраста в хозяйствах различных форм собственности, отличающихся климатогеографической зоной и технологией содержания животных на территории Вологодской области. При помощи микроскопических методов исследования выявляли «положительные» пробы, в которых присутствовали представители рода *Cryptosporidium*, сортировали их и подвергали глубокой заморозке. Затем пробы исследовали с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ». Идентификацию видов рода *Cryptosporidium* в пробах фекалий сельскохозяйственных животных проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты и обсуждение. Была создана система праймеров для вложенной ПЦР, амплифицирующих потенциально видоспецифичный участок гена 18S рРНК размером 393 н.о. Последовательность праймера ILL_R2_Zheng была модифицирована с внесением вырожденных позиций с целью сделать праймер более универсальным. В результате секвенирования библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных с использованием выбранных праймеров, и последующего таксономического анализа полученных нуклеотидных последовательностей, было показано, что во всех исследованных образцах присутствуют представители только одного вида *Cryptosporidium scrofarum*.

Ключевые слова: криптоспоридиоз, *Cryptosporidium scrofarum*, ооцисты, таксономия, ПЦР, ДНК, секвенирование, 18S рРНК, поросята, Вологодская область

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00002 (<https://rscf.ru/project/22-26-00002/>).

Прозрачность финансовой деятельности: в представленных материалах или методах авторы не имеют финансовой заинтересованности.

Конфликт интересов отсутствует.

Для цитирования: Кряжев А. Л., Новиков А. С. Идентификация таксономической принадлежности криптоспоридий у поросят в условиях северо-запада РФ при помощи молекулярно-генетических методов // Российский паразитологический журнал. 2023. Т. 17. № 1. С. 84–90.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-1-84-90>

© Кряжев А. Л., Новиков А. С., 2023



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Original article

Identification of the taxonomic affiliation of *Cryptosporidium* spp. in piglets in the conditions of the north-west of the Russian Federation using molecular genetic methods

Andrey L. Kryazhev¹, Artem S. Novikov²

^{1,2} FSBEI HE Vologda State Dairy Farming Academy named after N. V. Vereshchagin, Vologda, Russia

¹ kamarnett@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7015-8063>

² vetnovikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6919-8524>

Abstract

The purpose of the research is to determine taxa of the genus *Cryptosporidium* species in pigs using molecular genetic methods in the north-west of the Russian Federation.

Materials and methods. Fecal samples were taken from pigs of different age groups on farms of different types of incorporation that differ in climatic and geographical zones and animal keeping technologies in the Vologda Region. Microscopic research methods identified "positive" samples in which *Cryptosporidium* species were present; they were sorted out and deep-frozen. Then the samples were examined using the equipment of the resource center «Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology» of ARRIAM. The *Cryptosporidium* species in the fecal samples from farm animals were identified using high-throughput sequencing of 18S rRNA gene amplicon libraries obtained by a nested polymerase chain reaction (PCR) assay.

Results and discussion. A primer system was designed for the nested PCR to amplify a potentially species-specific 393 bp fragment of the 18S rRNA gene. The sequence of the ILL_R2_Zheng primer was modified with included degenerated positions to make the primer more versatile. As a result of sequencing of the libraries of 18S rRNA gene fragments obtained with the selected primers and subsequent taxonomic analysis of the nucleotide sequences, it was shown that all the studied samples included representatives of only one species, *Cryptosporidium scrofarum*.

Keywords: cryptosporidiosis, *Cryptosporidium scrofarum*, oocysts, taxonomy, PCR, DNA, sequencing, 18S rRNA, pigs, Vologda Region

Acknowledgements. The study was carried out using the equipment of the resource center «Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology» of ARRIAM. The study was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 22-26-00002 (<https://rscf.ru/project/22-26-00002/>).

Financial transparency: none of the authors has financial interest in the submitted materials or methods.

There is no conflict of interests.

For citation: Kryazhev A. L., Novikov A. S. Identification of the *Cryptosporidium* taxonomic affiliation in pigs in the north-west of the Russian Federation using molecular genetic methods. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2023;17(1):84–90. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-1-84-90>

© Kryazhev A. L., Novikov A. S., 2023

Введение

Криптоспоридии – паразитические простейшие, обнаруженные у животных в различных странах мира [11]. В России они впервые были выявлены у телят в 1983 г. [6], а в дальнейшем и у других видов животных, в

том числе, у поросят [1, 2]. Криптоспоридиоз широко распространен среди сельскохозяйственных животных в условиях северо-запада РФ [3-5, 7].

В РФ исследования по изучению криптоспоридиоза у животных практически не про-

водятся, а имеющиеся данные, основанные лишь на результатах микроскопических методов, с учетом новейших знаний, не являются актуальными.

Для видовой идентификации простейших рода *Cryptosporidium* в настоящее время используют анализ нуклеотидной последовательности (секвенирование) фрагментов гена малой субъединицы эукариотической рибосомы (18S рРНК). Криптоспоридии присутствуют в фекалиях в очень незначительном количестве, в связи с чем получение фрагментов гена 18S рРНК в достаточном для секвенирования количестве достигается благодаря использованию так называемого nested (вложенной) ПЦР – двух последовательных раундов ПЦР с двумя различными парами праймеров.

Впервые об использовании молекулярных методов для видовой идентификации криптоспоридий сообщали китайские исследователи [12, 13], которые подобрали ПЦР-праймеры к участкам гена 18S рРНК, родоспецифичных для *Cryptosporidium*, фланкирующих видоспецифичные последовательности этого гена. В качестве матрицы была использована ДНК, выделенная из очищенных ооцист. Размер конечного амплифицированного ДНК-фрагмента составлял 820 п.н.

Секвенирование фрагментов проводили по методу Сэнджера [10]. Использование этого метода, однако, требует высокой однородности амплифицированных фрагментов, что трудно достижимо при видовой идентификации криптоспоридий в фекалиях животных. ДНК, выделенная из таких образцов, представляет собой смесь геномов, принадлежащих различным эукариотическим организмам. Поскольку ген 18S рРНК эволюционно консервативен, то с большой вероятностью в результате ПЦР с праймерами, специфичными к этому гену, будет получен гетерогенный амплификат, что сделает секвенирование по методу Сэнджера невозможным без трудоёмкой процедуры клонирования ампликонов. Та же проблема возникнет, если в фекалиях присутствует несколько видов рода *Cryptosporidium*.

В последнее время для идентификации криптоспоридий всё чаще стали использовать метод высокопроизводительного секвенирования, разработанный компанией Illumina, позволяющий прочитывать нуклеотидные по-

следовательности миллионов индивидуальных ДНК-фрагментов, одновременно не разделяя их после амплификации, что снимает проблему гетерогенности матрицы [8]. Но, этот метод не позволяет секвенировать ДНК-фрагменты длиной свыше 500 нуклеотидов, в связи с чем требует особой тщательности в выборе праймеров для таксономического анализа.

Целью наших исследований было определение таксонов представителей рода *Cryptosporidium* у поросят при помощи молекулярно-генетических методик в условиях северо-запада РФ.

Материалы и методы

Данные исследования в Российской Федерации были выполнены впервые.

Взятие фекалий для исследований проводили в промышленных свинокомплексах и частных фермерских хозяйствах по выращиванию свиней в условиях Вологодской области.

Для обнаружения криптоспоридий, а также для определения интенсивности криптоспоридиозной инвазии поросят пробы с соблюдением температурных условий в стерильных термokonтейнерах доставляли в лабораторию на базе факультета ветеринарной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА. Готовили нативные мазки, концентрированные препараты ооцист при помощи флотационных и центрифужно-флотационных методик с окрашиванием микропрепаратов по Циль-Нильсену и последующим микроскопированием и идентификацией до рода *Cryptosporidium*. Далее, «положительные» пробы сортировали, подвергали замораживанию и доставляли в лабораторию. Всего исследовано 400 проб фекалий от разных животных.

Работу проводили с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИ-ИСХМ.

Идентификацию видов рода *Cryptosporidium* в пробах фекалий сельскохозяйственных животных осуществляли с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате nested (вложенной) ПЦР. В качестве матрицы использовали тотальную ДНК, выделенную из проб фекалий модифицированным СТАВ методом [9]. Разрушение микроорганизмов в пробах прово-

дили с помощью шарикового гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) со скоростью 6000 встряхиваний в минуту два раза по 30 с. Для получения библиотек фрагментов гена 18S рРНК использовали nested ПЦР. Первый раунд ПЦР (ПЦР1) проводили с парой праймеров F1_Zheng/R1_Zheng, амплифицирующих фрагмент ДНК размером приблизительно 1325 п.о. В 15 мкл реакционной смеси содержалось 0,5–1 единиц активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 1–10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (LifeTechnologies). Смесь денатурировали при 94 °С 1 мин., после чего следовало 40 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин. Финальную элонгацию проводили при 72 °С 3 мин. Затем, полученный амплификат разводили в 20 раз и 1 мкл использовали в качестве матрицы для проведения второго раунда ПЦР (ПЦР2) с праймерами ILL_400F/ILL_R2_Zheng, к которым были присоединены адаптеры (Illumina, США). Условия проведения второго раунда ПЦР были аналогичны первому, но число циклов было уменьшено до 35. Размер амплификата составил 440 п.о. ПЦР продукты очищали по рекомендованной компанией Illumina методике с использованием магнитных частиц AM Pure XP (BeckmanCoulter, США).

Индексирование ампликонов, подготовку библиотек и секвенирование проводили в соответствии с рекомендациями производителя для работы на приборе «Illumina MiSeq» (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2*300 н).

Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО Illumina (тримминг и демультиплексирование) и пакета dada2 в программной среде R (фильтрация по качеству, дупликация данных, денойзинг, объединение последовательностей и идентификация ASV (amplicon sequence variant)). Таксономическую принадлежность последовательностей определяли с помощью blastn в базе данных GenBank.

Результаты и обсуждение

На основании литературных данных [8, 14], была создана система праймеров (табл.) для nested (вложенной) ПЦР, амплифицирующих потенциально видоспецифичный участок гена 18S рРНК размером 393 н.о. и удовлетворяющая возможностям высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina. Последовательность праймера ILL_R2_Zheng была модифицирована с внесением вырожденных позиций с целью сделать праймер более универсальным.

Таблица [Table]

Система праймеров, используемых для секвенирования
[Primer system used for sequencing]

№ п/п	Праймер [Primer]	Последовательность праймера [Primer sequence] (5'-3')	Размер ампликона, п.о. [Amplicon size, b.p.]	Ссылка [Link]
ПЦР 1				
1	F1_Zheng	TTCTAGAGCTAATACATGCG	1325	S. Zheng et al., 2019
2	R1_Zheng	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA		S. Zheng et al., 2019
ПЦР 2				
3	ILL_400F	tctcgccagcgtcagatgtgtataagagacag* GTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG	507 (393 без адаптеров) [(393 without adapters)]	A. Kaupke et al., 2017
4	ILL_R2_Zheng	tctcggtggctcggagatgtgtataagagacag* AARGAGTAAGSGAACCACTCCA		S. Zheng et al., 2019

Примечание [Note]. * Строчными буквами обозначены адаптеры Illumina [Lowercase letters denote Illumina adapters]

Для выяснения возможности дифференциации видов криптоспоридий на основании нуклеотидных последовательностей данного участка из базы данных GenBank были извлечены гомологичные последовательности, принадлежащие к различным видам рода

Cryptosporidium; проведено выравнивание этих последовательностей.

Анализ нуклеотидного полиморфизма и его распределения в последовательностях показал, что все виды криптоспоридий демонстрируют довольно высокую специфичность

и могут быть с большой вероятностью идентифицированы. Однако, следует отметить, что нуклеотидный полиморфизм внутри видов также имеет место. Интересно, что, по всей видимости, полиморфизм инделей несколько более специфичен, чем полиморфизм нуклеотидных замен. Более того, не исключено, что создание диагностикума, использующего особенности распределения инделей, может оказаться довольно удобным орудием для криптоспоридий.

В результате секвенирования библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных с использованием выбранных праймеров и последующего таксономического анализа полученных нуклеотидных последовательностей, было показано, что во всех исследованных образцах присутствуют представители только одного вида *Cryptosporidium scrofarum*. Незначительный нуклеотидный полиморфизм, присутствующий во всех представленных последовательностях, свидетельствует о наличии аллельных вариаций или о существовании неизвестных, очень близкородственных, видов.

Из приведенных результатов видно, что выбранная система праймеров очень специфична к последовательностям гена 18S рРНК рода *Cryptosporidium*. Однако, в ряде случаев процент нуклеотидных последовательностей, не относящихся к криптоспоридиям, превышает 50%, что говорит о верности выбранного метода для идентификации микроорганизмов. Метод секвенирования по Сэнджеру в этих случаях не позволил бы получить какого-либо положительного результата.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что в свиноводческих хозяйствах Вологодской области таксономический состав криптоспоридий представлен видом *Cryptosporidium scrofarum*. В Российской Федерации данный вид криптоспоридий выявлен впервые.

Для дальнейших исследований, несомненно, требуется широкий анализ генетического разнообразия криптоспоридий, так как в соответствии с приведенными данными их реальный полиморфизм может оказаться гораздо выше, чем это ранее предполагалось. Здесь могут быть использованы как подходы, связанные с высокопроизводительным секве-

нированием (расширение спектра исходных образцов от различных животных, связанных как филогенетическим родством (кабаны, мини-пиги и пр.), так и трофическими связями или общностью обитания, так и подходы, связанные с расширением репертуара используемых праймеров, сконструированных с учетом всех выявленных в базах данных полиморфизмов.

Список источников

1. Васильева В. А. Криптоспоридиоз и эзофагостомоз свиней при моноинвазиях и паразитоценозе: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М., 1998. 41 с.
2. Горбов Ю. К., Мачинский А. П. Распространение ассоциативных заболеваний сельскохозяйственных животных и опыт борьбы с ними в Мордовской АССР // Паразитоценозы и ассоциативные болезни. М., 1984. С. 235–252.
3. Кряжев А. Л. Криптоспоридиоз телят в хозяйствах молочной специализации Северо-Запада России (эпизоотология, клиническая картина, терапия и профилактика): дис. ... канд. вет. наук. М., 2005. 152 с.
4. Кряжев А. Л., Лемехов П. А. Криптоспоридиоз телят в хозяйствах молочной специализации Северо-Западного региона России. Монография. Вологда-Молочное: ИЦ ВГМХА, 2010. 111 с.
5. Кряжев А. Л., Новиков А. С., Никитин В. Ф. Эпизоотологическая ситуация по криптоспоридиозу поросят в промышленном свиноводстве Вологодской области // Ветеринария. 2020. № 1. С. 30–34. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.1.30-34>
6. Никитин В. Ф., Павласек И. Ассоциация гельминтов и кокцидий у телят в животноводческих комплексах // II Всесоюзный съезд паразитологов: тезисы докладов (Киев, октябрь 1983). Киев: Наукова думка, 1983. С. 235–246.
7. Новиков А. С., Кряжев А. Л. Криптоспоридиоз поросят в условиях северо-западного Нечерноземья РФ. Монография. Вологда-Молочное: Вологодская ГМХА, 2022. 112 с.
8. Kaupke A., Gawor J., Rzeżutka A., Gromadka R. Identification of pig-specific *Cryptosporidium* species in mixed infections using Illumina sequencing technology. *Experimental parasitology*. 2017; 182. 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.020>
9. Rahimah A. B., Cheah S. C., Rajinder S. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA. *J. Oil Palm Res.* 2006; 18. 296–304.

10. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1977; 74 (12): 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
11. Wang R., Qiu S., Jian F., Zhang S., Shen Y., Zhang L., Ning C., Cao J., Qi M., Xiao L. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. *Parasitol. Res.* 2010; 107: 1489–1494. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2024-6>
12. Xiao L., Morgan U. M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Lal A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and environmental microbiology*. 1999; 65 (8): 3386-3391. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3386-3391.1999>
13. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 2010; 124: 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
14. Zheng S., Li D., Zhou C., Zhang S., Wu Y., Chang Y., Zhang L. Molecular identification and epidemiological comparison of *Cryptosporidium* spp. among different pig breeds in Tibet and Henan, China. *BMC veterinary research*. 2019; 15 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1847-3>

Статья поступила в редакцию 12.10.2022; принята к публикации 10.02.2023

Об авторах:

Кряжев Андрей Леонидович, ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА (160555, г. Вологда, п. Молочное, ул. Шмидта, 2), г. Вологда, Россия, доктор ветеринарных наук, ORCID ID: 0000-0001-7015-8063, kamarnett@mail.ru

Новиков Артём Сергеевич, ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА (160555, г. Вологда, п. Молочное, ул. Шмидта, 2), г. Вологда, Россия, кандидат ветеринарных наук, ORCID ID: 0000-0002-6919-8524, vetnovikov@yandex.ru

Вклад соавторов:

Кряжев Андрей Леонидович – обзор литературных источников по проблеме, отбор проб, их подготовка и исследование, критический анализ материала и формирование выводов.

Новиков Артём Сергеевич – отбор проб, их подготовка и исследование, обзор литературных источников по проблеме, корректировка статьи.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

References

1. Vasilyeva V. A. Cryptosporidiosis and esophagostomosis of pigs with monoinfections and parasitocenosis: autoref. dis. ... *Dr. Vet. Sci. M.*, 1998; 41. (In Russ.)
2. Gorbov Yu. K., Machinsky A. P. The spread of associated diseases in livestock animals and best practices of their control in the Mordovian Autonomous Soviet Socialist Republic. *Parasitocenosis and associated diseases*. M., 1984; 235–252. (In Russ.)
3. Kryazhev A. L. Cryptosporidiosis of calves on dairy farms in the north-west of Russia (epizootology, clinical picture, therapy and prevention): autoref. dis. ... *Cand. Vet. Sci. M.*, 2005; 152. (In Russ.)
4. Kryazhev A. L., Lemekhov P. A. Cryptosporidiosis of calves on dairy farms of the north-west of Russia. *Monograph*. Vologda-Molochnoe: Information Center of the Vologda State Dairy Farming Academy, 2010; 111. (In Russ.)
5. Kryazhev A. L., Novikov A. S., Nikitin V. F. Epizootological situation on cryptosporidiosis in pigs in the industrial pig breeding in the Vologda Region. *Veterinariya = Veterinary Medicine*. 2020; 1: 30–34. (In Russ.) <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.1.30-34>
6. Nikitin V. F., Pavlasek I. Helminth and coccidia association in calves in livestock complexes. II All-Union Congress of Parasitologists: Abstracts (Kiev, October 1983). Kiev: Naukova Dumka, 1983; 235–246. (In Russ.)
7. Novikov A. S., Kryazhev A. L. Cryptosporidiosis of pigs in the northwestern Non-Black Earth Zone of the Russian Federation. *Monograph*. Vologda-Molochnoe: Vologda State Dairy Farming Academy, 2022; 112. (In Russ.)
8. Kaupke A., Gawor J., Rzeżutka A., Gromadka R. Identification of pig-specific *Cryptosporidium* species in mixed infections using Illumina sequencing technology. *Experimental parasitology*. 2017; 182: 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.020>
9. Rahimah A. B., Cheah S. C., Rajinder S. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA. *J. Oil Palm Res.* 2006; 18: 296-304.

10. Sanger F, Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1977; 74 (12): 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
11. Wang R., Qiu S., Jian F., Zhang S., Shen Y., Zhang L., Ning C., Cao J., Qi M., Xiao L. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. *Parasitol. Res.* 2010; 107. 1489–1494. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2024-6>
12. Xiao L., Morgan U. M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Lal A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and environmental microbiology*. 1999; 65 (8): 3386-3391. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3386-3391.1999>
13. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 2010; 124. 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
14. Zheng S., Li D., Zhou C., Zhang S., Wu Y., Chang Y., Zhang L. Molecular identification and epidemiological comparison of *Cryptosporidium* spp. among different pig breeds in Tibet and Henan, China. *BMC veterinary research*. 2019; 15 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1847-3>

The article was submitted 12.10.2022; accepted for publication 10.02.2023

About the authors:

Kryazhev Andrey L., FSBEI HE Vologda State Dairy Farming Academy (2 Schmidta St., Molochnoe, Vologda, 160555), Vologda, Russian Federation, Doctor of Veterinary Sciences, ORCID ID: 0000-0001-7015-8063, kamarnett@mail.ru

Novikov Artem S., FSBEI HE Vologda State Dairy Farming Academy (2 Schmidta St., Molochnoe, Vologda, 160555), Vologda, Russian Federation, Candidate of Veterinary Sciences, ORCID ID: 0000-0002-6919-8524, vetnovikov@yandex.ru

Contribution of co-authors:

Kryazhev Andrey L. – review of literary sources on the issue, sampling, their preparation and research, critical analysis of the material and conclusions.

Novikov Artem S. – sampling, their preparation and research, review of literary sources on the issue, article correction.

All authors have read and approved the final manuscript.