

Научная статья

УДК 619:616.99:636.4

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-242-249>

Молекулярная диагностика представителей рода *Cryptosporidium* у свиней в условиях частных фермерских хозяйств Вологодской области Северо-Западного Федерального Округа РФ

Андрей Леонидович Кряжев¹, Артём Сергеевич Новиков²

^{1,2} ФГБОУ ВО Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени 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 зараженности и степени выделения ооцист с последующей идентификацией таксонов представителей рода *Cryptosporidium* у поросят различного возраста при помощи новейших молекулярно-генетических методик в условиях частных фермерских хозяйств Вологодской области Северо-Западного федерального округа РФ.

Материалы и методы. Данные исследования в Российской Федерации выполнены впервые. Исследования проводили в условиях частных фермерских хозяйств по выращиванию свиней, расположенных на территории Вологодской области Северо-Западного Федерального Округа РФ с января по сентябрь 2022 г. Фекалии брали от поросят различных возрастов, а именно поросят-сосунов в возрасте до 1 мес., отъемышей (1–3 мес.), поросят на откорме (от 4 мес. и старше), а также от подсосных свиноматок. Возрастные группы были сформированы с учетом технологических параметров содержания животных в хозяйствах. При помощи микроскопических методов исследования выявляли «положительные» пробы, в которых обнаружены ооцисты рода *Cryptosporidium*, и число ооцист. В дальнейшем пробы исследовали с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ». Идентификацию видов рода *Cryptosporidium* в пробах фекалий животных проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения nested (вложенной) ПЦР.

Результаты и обсуждение. Представители рода *Cryptosporidium* были выявлены в каждой исследуемой возрастной группе, причем как у животных с признаками расстройства пищеварения, так и у животных без клинических признаков болезни. Средняя инвазированность поголовья криптоспоридиями в частных фермерских хозяйствах составила 32,4%. Наиболее инвазированы ооцистами криптоспоридий поросята-откормочники в возрасте 4–6 мес. – 72%. 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 вида *Cryptosporidium scrofarum*.

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

Благодарность. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00002 (<https://rscf.ru/project/22-26-00002/>). Молекулярно-генетические исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ» (г. Пушкин, СПб.).

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.



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

Для цитирования: Кряжев А. Л., Новиков А. С. Молекулярная диагностика представителей рода *Cryptosporidium* у свиней в условиях частных фермерских хозяйств Вологодской области Северо-Западного Федерального Округа РФ // Российский паразитологический журнал. 2023. Т. 17. № 2. С. 242–249.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-242-249>

© Кряжев А. Л., Новиков А. С., 2023

Original article

Molecular diagnostics of *Cryptosporidium* species in pigs on private farms in the Vologda Region of the North-Western Federal District of the Russian Federation

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 infection rate and oocyst isolation degree followed by identification of taxa of *Cryptosporidium* species in piglets of different age groups using the latest molecular genetic methods, on private farms in the Vologda Region of the North-Western Federal District of the Russian Federation.

Materials and methods. These studies were performed in the Russian Federation for the first time. The research was performed on private pig farms located in the Vologda Region of the North-Western Federal District of the Russian Federation from January to September 2022. Feces were taken from piglets of different age groups, namely, sucklings under the age of 1 month, weaners (1–3 months), feeder pigs (4 months and older), as well as from milking sows. Age groups were formed taking into consideration technological parameters of keeping animals on farms. Using microscopic research methods, “positive” samples were detected in which *Cryptosporidium* oocysts were found, and the number of oocysts was determined. Subsequently, the samples were studied using the equipment of the resource center «Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology» of ARRIAM. *Cryptosporidium* species were identified in samples of animal feces using high-throughput sequencing of 18S rRNA gene fragment amplicon libraries as obtained by nested PCR.

Results and discussion. *Cryptosporidium* species were identified in each studied age group both in the animal’s presenting indigestion and the animals without any clinical sign of the disease. The average cryptosporidium infection rate was 32.4% in the animals on private farms. The most infected with cryptosporidium oocysts were feeder pigs aged 4–6 months (72%). As a result of sequencing of 18S rRNA gene fragment amplicon libraries obtained using selected primers and subsequent taxonomic analysis of the resulting nucleotide sequences, it was shown that only representatives of the *Cryptosporidium scrofarum* species were present in all the studied samples.

Keywords: cryptosporidiosis, *Cryptosporidium scrofarum*, oocysts, PCR, DNA, sequencing, 18S rRNA, piglets, Vologda Region, Russian Federation

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

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. Molecular diagnostics of *Cryptosporidium* species in pigs on private farms in the Vologda Region of the North-Western Federal District of the Russian Federation. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2023;17(2):242–249. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-2-242-249>

© Kryazhev A. L., Novikov A. S., 2023

Введение

Криптоспоридиоз – широко распространенный зооноз, вызываемый простейшими рода *Cryptosporidium*. В настоящее время данная болезнь является значимой проблемой в области медицины и ветеринарии [10, 17]. Криптоспоридии зарегистрированы у животных в различных странах мира [19]. В Российской Федерации в 1983 г. зарегистрировано первое сообщение о заражении телят криптоспоридиями [6]. В дальнейшем, их обнаруживали и у других видов животных, в том числе у поросят [1, 2]. Имеются сообщения о широком распространении криптоспоридиоза среди сельскохозяйственных животных в условиях северо-запада РФ [3–5, 7].

При помощи молекулярно-генетических методов диагностики было идентифицировано два вида криптоспоридий у поросят – *C. suis* и *C. scrofarum*. Этих возбудителей считали специфичными для данного вида хозяев [11]. Однако, в последующем начали поступать сообщения из разных стран об обнаружении у свиней *C. parvum*, а также о потенциально зоонозной опасности первых двух видов [12, 14, 15].

В Российской Федерации обнаружение криптоспоридий у поросят с использованием молекулярно-генетических методик ранее не проводили.

Целью наших исследований стало определение зараженности и степени выделения ооцист с последующей идентификацией таксонов представителей рода *Cryptosporidium* у поросят различного возраста при помощи молекулярно-генетических методик в условиях частных фермерских хозяйств Вологодской области Северо-Западного Федерального Округа РФ.

Материалы и методы

Данные исследования в Российской Федерации выполнены впервые.

Исследования проводили в условиях частных фермерских хозяйств по выращиванию свиней, расположенных на территории Вологодской области Северо-Западного Федерального Округа РФ в период с января по сентябрь 2022 г. Фекалии брали от поросят различных возрастов: поросят-сосунов в возрасте до 1 мес., отъемышей (1–3 мес.), поросят на откорме в возрасте 4–6 мес. и 6 мес. и старше, а также от подсосных свиноматок. Возрастные

группы были сформированы с учетом технологических параметров содержания животных в данных хозяйствах.

Пробы фекалий в свежем виде в специальном термоконтейнере доставляли в лабораторию. Для обнаружения ооцист криптоспоридий, идентификации их до рода, а также для определения интенсивности криптоспоридной инвазии поросят в условиях лаборатории на базе факультета ветеринарной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА готовили нативные фекальные мазки концентрированных препаратов ооцист при помощи флотационных и центрифужно-флотационных методик с окрашиванием микропрепаратов по Циль-Нильсену и последующим микроскопированием для выявления и подсчета ооцист криптоспоридий. Интенсивность выделения ооцист в фекалиях определяли с применением методики И. Павласека [13].

По числу выделенных ооцист с расчетом на 1 г фекалий определяли степень инвазированности животных: «+» (слабая) – 1–5 ооцист в поле зрения (50000–500000 в г/фекалий); «++» (средняя) – 6–10 ооцист (550000–1000000 в г/фекалий); «+++» (сильная) – более 10 ооцист (свыше 1000000 в г/фекалий) при микроскопии с увеличением в 400 раз.

Далее пробы сортировали, подвергали глубокой заморозке и транспортировали в г. Пушкин (Санкт-Петербург) для дальнейших исследований. Работу проводили с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ».

Идентификацию видов рода *Cryptosporidium* в пробах фекалий животных проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения nested (вложенной) полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали тотальную ДНК, выделенную из проб фекалий животных модифицированным СТАВ методом [16]. Разрушение микроорганизмов в пробах осуществляли с помощью шарикового гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) со скоростью 6000 встряхиваний в минуту два раза по 30 с. 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, содержащей 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, разработанные компанией Illumina (Illumina, США). Условия проведения ПЦР2 были аналогичны условиям проведения первого, 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 AMPure XP (Beckman Coulter, 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[®] Reagent Kit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2 × 300 п. о.).

Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО Illumina (тримминг и демультимплексирование) 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.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы STATISTICA 10.

Всего исследованы пробы от 250 животных (по 50 в каждой возрастной группе).

Результаты

Представители рода *Cryptosporidium* были обнаружены в каждой исследуемой возрастной группе, причем как у животных с признаками расстройства пищеварения, так и у животных без клинических признаков болезни. Общая инвазированность поголовья в част-

ных фермерских хозяйствах составила 32,4% (81/250). Поросята-сосуны были инвазированы криптоспоридиями в 24% случаев (12/50). Интенсивность криптоспоридиозной инвазии была преимущественно слабой (+), встречалась в 32% (16/50) случаев. Средняя (++) степень инвазированности животных составила 16% (8/50) случаев. В возрастной группе поросят-отъемышей в возрасте 1–3 мес. зараженность криптоспоридиями составила 42% (21/50); доминировала средняя (++) степень выделения ооцист – 70% (35/50) против 14% (7/50) слабой (+). Наиболее инвазированы ооцистами криптоспоридий поросята-откормочники в возрасте 4–6 мес., экстенсивность инвазированности данной группы составила 72% (36/50). Степень выделения ооцист была средней (++) – 42% (21/50) и слабой (+) – 30% (15/50). Животные старше 6 мес. были заражены криптоспоридиями в 10% (5/50) случаев. У них регистрировали слабую (+) – 4 (2/50) и среднюю (++) – 6% (3/50) степень инвазии. Свиноматки также были инвазированы криптоспоридиями. Их зараженность составила 14% (7/50), а степень криптоспоридиозной инвазии была слабой (+). Следует отметить, что ни в одной обследуемой группе поросят сильная степень криптоспоридиозной инвазии не была выявлена (табл.).

На основании литературных данных [9, 20] была создана система праймеров для nested (вложенного) ПЦР, амплифицирующих потенциально видоспецифичный участок гена 18S рРНК размером 393 н. о. и удовлетворяющего возможностям высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina. 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 *C. scrofarum*. Незначительный нуклеотидный полиморфизм, присутствующий во всех представленных последовательностях говорит либо о наличии аллельных вариаций, либо о существовании неизвестных очень близкородственных видов.

Таблица [Table]

Распространение криптоспориоза у поросят в условиях фермерских хозяйств Вологодской области
 [The spread of cryptosporidiosis in piglets in the conditions of farms in the Vologda region]

Возрастная группа животных [Age group of animals]	Обследовано животных [Animals examined]	Из них инвазированы <i>C. scrofarum</i> [Of these, <i>C. scrofarum</i> is infected]		Интенсивность выделения ооцист [Oocyst shedding rate]					
		число [number]	ЭИ, % [EI, %]	слабая [weak] +		средняя [average] ++		сильная [strong] +++	
				число [number]	%	число [number]	%		
До 1 мес. [Up to 1 month]	50	12	24	16	32	8	16	-	-
1–3 мес. [1–3 months]	50	21	42	7	14	35	70	-	-
4–6 мес. [4–6 months]	50	36	72	15	30	21	42	-	-
Старше 6 мес. [Older than 6 months]	50	5	10	2	4	3	6	-	-
Свиноматки [Sows]	50	7	14	7	14	-	-	-	-
Всего [Total]	250	81	32,4	47	18,8	67	26,8	-	-

Обсуждение

Установлено, что в условиях северо-запада РФ на примере Вологодской области, в частных фермерских хозяйствах поросят всех возрастных групп инвазированы *C. scrofarum*. Наиболее подвержены заражению животные, находящиеся на откорме в возрасте 4–6 мес. Однако, ряд зарубежных исследователей [8, 14] сообщают о наибольшей инвазированности криптоспоридиями поросят в возрасте 1–3 мес. По результатам наших исследований, все животные заражены одним видом криптоспоридий – *C. scrofarum*, что согласуется с данными китайских исследователей [18]. Другие ученые сообщали об обнаружении у поросят двух, а иногда трех видов криптоспоридий: *C. suis*, *C. scrofarum* и *C. parvum* [11, 12, 14, 15].

Установлен факт заражения поросят-сосунов *C. scrofarum*, что согласуется с сообщениями о зараженности поросят в возрасте до 5 недель [18, 19]. Однако, по другим данным этим видом криптоспоридий заражаются животные старших возрастных групп [12, 14]. Обнаруженные у свиноматок криптоспоридии идентифицированы как *C. scrofarum*, что позволяет сделать вывод о влиянии свиноматок на заражение молочных поросят, и рассматривать их как единственный источник криптоспоридиозной инвазии.

Заключение

Впервые в Российской Федерации в условиях северо-запада на примере Вологодской области в частных фермерских хозяйствах по выращиванию свиней с использованием молекулярно-генетических методик установлено паразитирование *C. scrofarum* у поросят всех возрастных групп. Наиболее подвержены инвазии животные в возрасте 4–6 мес.

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. Кражев 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. *Johnson J., Buddle R., Reid S., Armson A., Ryan U.* Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp. Parasitol.* 2008; 119 (3): 418-421. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.009>
 9. *Kaupke A., Gawor J., Rzeżutka A., Gromadka R.* Identification of pig-specific *Cryptosporidium* species in mixed infections using Illumina sequencing technology. *Exp. Parasitol.* 2017; 182. 22-25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.020>
 10. *Kotloff K. L., Nataro J. P., Blackwelder W. C. et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*. 2013; 382 (9888): 209-222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)
 11. *Kváč M., Kestránová M., Pinková M. et al.* *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 2013; 191 (3-4): 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.005>
 12. *Němejc K., Sak B., Květoňová D. et al.* Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 2013; 112 (3): 1143-1154. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3244-8>
 13. *Pavlásek I.* Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Klin. Mikrobiol.* 1999; 3: 290-301.
 14. *Pettersson E., Ahola H., Frössling J. et al.* Detection and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in Swedish pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2020; 62 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00537-z>
 15. *Qi M., Zhang Q., Xu C. et al.* Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Xinjiang, China. *Acta Tropica*. 2020; 209. 105551. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105551>
 16. *Rahimah A. B., Cheah S. C., Rajinder S.* Freezing of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA. *J. Oil Palm. Res.* 2006; 18. 296-304.
 17. *Striepen B.* Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature News*. 2013; 503 (7475): 189-191. <https://doi.org/10.1038/503189a>
 18. *Wang P., Li S., Zou Y. et al.* The infection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pigs in southern China. *Microbial Pathogenesis*. 2022; 165. 105459. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105459>
 19. *Wang R., Qiu S., Jian F. et al.* Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. *Parasitol. Res.* 2010; 107. 1489-1494. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2024-6>
 20. *Zheng S., Li D., Zhou C. et al.* Molecular identification and epidemiological comparison of *Cryptosporidium* spp. among different pig breeds in Tibet and Henan, China. *BMC Vet. Res.* 2019; 15 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1847-3>

Статья поступила в редакцию 12.02.2023; принята к публикации 10.04.2023

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

- Vasilyeva V. A. Cryptosporidiosis and esophagostomosis of pigs with monoinvasions and parasitocenosis: Extended abstract of Doctor's thesis. Moscow, 1998; 41. (In Russ.)
- Gorbov Yu. K., Machinsky A. P. The spread of associative diseases of livestock animals and the experience of their control in the Mordovian Autonomous Soviet Socialist Republic. *Parazitotsenozy i assotsiativnyye bolezni = Parasitocenosis and associative diseases*. Moscow, 1984; 235-252. (In Russ.)
- 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. Moscow, 2005; 152. (In Russ.)
- Kryazhev A. L., Lemekhov P. A. Cryptosporidiosis of calves on dairy farms in the North-West of Russia. Monograph. Vologda-Molochnoe: Research Center of the Vologda State Dairy Farming Academy named after N. V. Vereshchagin, 2010; 111. (In Russ.)
- Kryazhev A. L., Novikov A. S., Nikitin V. F. Epizootological situation on cryptosporidiosis in piglets in industrial pig farming of the Vologda Region. *Veterinariya = Veterinary Medicine*. 2020; 1: 30-34. (In Russ.) <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.1.30-34>
- Nikitin V. F., Pavlasek I. Association of helminths and coccidia in calves in livestock complexes. *II Vsesoyuznyy s'yezd parazitologov: tezisy dokladov (Kiyev, oktyabr' 1983) = II All-Union Congress of Parasitologists: abstracts (Kiev, October 1983)*. Kiev: Naukova Dumka, 1983; 235-246.
- Novikov A. S., Kryazhev A. L. Cryptosporidiosis of piglets in the northwestern Non-Black Earth Zone of the Russian Federation. Monograph. Vologda-Molochnoe: Vologda State Dairy Farming Academy named after N. V. Vereshchagin, 2022; 112. (In Russ.)
- Johnson J., Buddle R., Reid S., Armson A., Ryan U. Prevalence of Cryptosporidium genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp. Parasitol.* 2008; 119 (3): 418-421. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.009>
- Kaupke A., Gawor J., Rzeżutka A., Gromadka R. Identification of pig-specific Cryptosporidium species in mixed infections using Illumina sequencing technology. *Exp. Parasitol.* 2017; 182: 22-25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.020>
- Kotloff K. L., Nataro J. P., Blackwelder W. C. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*. 2013; 382 (9888): 209-222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M. et al. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 2013; 191 (3-4): 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.005>
- Němejc K., Sak B., Květoňová D. et al. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 2013; 112 (3): 1143-1154. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3244-8>
- Pavlásek I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Klin. Mikrobiol.* 1999; 3: 290-301.
- Pettersson E., Ahola H., Frössling J. et al. Detection and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in Swedish pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2020; 62 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00537-z>
- Qi M., Zhang Q., Xu C. et al. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Xinjiang, China. *Acta Tropica*.

- 2020; 209. 105551. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105551>
16. 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.
17. Striepen B. Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature News.* 2013; 503 (7475): 189-191. <https://doi.org/10.1038/503189a>
18. Wang P., Li S., Zou Y. et al. The infection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pigs in southern China. *Microbial Pathogenesis.* 2022; 165. 105459. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105459>
19. Wang R., Qiu S., Jian F. et al. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. *Parasitol. Res.* 2010; 107. 1489-1494. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2024-6>
20. Zheng S., Li D., Zhou C. et al. Molecular identification and epidemiological comparison of *Cryptosporidium* spp. among different pig breeds in Tibet and Henan, China. *BMC Vet. Res.* 2019; 15 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1847-3>

The article was submitted 12.02.2023; accepted for publication 10.04.2023

About the authors:

Kryazhev Andrey L., FSBEI HE Vologda State Dairy Farming Academy named after N.V. Vereshchagin (2 Schmidta st., Vologda, Molochnoe, 160555), Vologda, Russia, Doctor of Veterinary Sciences, ORCID ID: 0000-0001-7015-8063, kamarnett@mail.ru

Novikov Artem S., FSBEI HE Vologda State Dairy Farming Academy named after N.V. Vereshchagin (2 Schmidta st., Vologda, Molochnoe, 160555), Vologda, Russia, 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, sample collection, their preparation and research, critical analysis of the material and conclusions.

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

All authors have read and approved the final manuscript.