

Научная статья

УДК 619:576.893.1

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-1-58-65>

Анализ таксономической принадлежности ASV (Amplicon Sequence Variant) представителей *Cryptosporidium scrofarum* у свиней в условиях 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 – выделение, идентификация и анализ типов ASV (Amplicon Sequence Variant) криптоспоридий свиней в условиях Вологодской области РФ.

Материалы и методы. Исследования в Российской Федерации выполнены впервые. Исследования проводили в свиноводческих хозяйствах на территории Вологодской области Северо-Западного федерального округа РФ в период с января по октябрь 2023 г. Фекалии получали от поросят различных возрастов, а также от подсосных свиноматок. Пробы исследовали с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Идентификацию видов рода *Cryptosporidium* в пробах фекалий проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения nested (вложенной) ПЦП с последующим «деноизингом», объединением последовательностей, восстановления исходных флотипов (ASV, (Amplicon Sequence Variant)).

Результаты и обсуждение. Представители рода *Cryptosporidium* были выявлены в каждой исследуемой возрастной группе. В результате высокопроизводительного секвенирования библиотек по технологии Illumina для каждого образца было получено от 20 до 100 тыс. нуклеотидных последовательностей (прочтений), после обработки которых суммарно было выявлено 2372 ASV. Анализ таксономической принадлежности ASV, проведённый с помощью филогенетического анализа, дополненного анализом с использованием алгоритма blastn в базе данных GenBank, показал, что суммарно во всех исследованных образцах присутствуют только 10 ASV, имеющих высокое сходство с последовательностями, депонированными в GenBank как фрагменты гена 18S рРНК *Cryptosporidium scrofarum*. 8 типов ASV являются уникальными и не повторяются от хозяйства к хозяйству. Вероятно, эти последовательности принадлежат местным популяциям подвидов *C. scrofarum*. Интересным представляется обнаружение уникальной последовательности рода *Cryptosporidium* типа ASV8, сходство которого с ближайшим родственником рода составляет всего 91,47%, что может свидетельствовать о довольно удалённом таксономическом родстве. Данный тип нуклеотидной последовательности в дальнейшем может быть описан как новый вид. Все выявленные уникальные нуклеотидные последовательности ASV были депонированы в GenBank.

Ключевые слова: криптоспориоз, *Cryptosporidium scrofarum*, ооцисты, ПЦП, ДНК, секвенирование, 18S рРНК, ASV, Amplicon Sequence Variant, поросята, Вологодская область, Российская Федерация

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

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. Анализ таксономической принадлежности ASV (Amplicon Sequence Variant) представителей *Cryptosporidium scrofarum* у свиней в условиях Вологодской области Северо-Западного федерального округа РФ // Российский паразитологический журнал. 2024. Т. 18. № 1. С. 58–66.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-1-58-66>

© Кряжев А. Л., Новиков А. С., 2024

Original article

ASV (Amplicon Sequence Variant) taxonomic affiliation analysis of *Cryptosporidium scrofarum* species in pigs in the Vologda Region, the Northwestern 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

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

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

Abstract

The purpose of the research is isolation, identification, and analysis of ASV (Amplicon Sequence Variant) types of *Cryptosporidia* spp. in pigs in the Vologda Region of the Russian Federation.

Materials and methods. The research has been conducted in the Russian Federation for the first time. The research was conducted on pig farms in the Vologda Region of the Northwestern Federal District of the Russian Federation from January to October 2023. Feces were taken from piglets of various age groups, as well as milking sows. The samples were studied using the equipment of the resource center "Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology" of ARRIAM. Species of the genus *Cryptosporidia* were identified in fecal samples using high-throughput sequencing of 18S rRNA gene fragment amplicon libraries as obtained from nested PCR followed by "denoising", sequence combining, and restoring the original phylotypes (ASV, (Amplicon Sequence Variant)).

Results and discussion. *Cryptosporidia* spp. species were identified in each age group studied. As a result of high-throughput sequencing of the libraries using the Illumina technology, 20 to 100 thousand nucleotide sequences (reads) were obtained for each sample after processing of which a total of 2,372 ASVs were identified. The analysis of the ASV taxonomic affiliation performed with phylogenetic analysis supplemented by an analysis using the blastn algorithm in the GenBank database showed that, in total, 10 ASVs were only present in all studied samples that had high similarity to sequences deposited in the GenBank as 18S rRNA gene fragments of *Cryptosporidium scrofarum*. Eight ASV types were unique and did not repeat from farm to farm. Probably, these sequences belong to local populations of *C. scrofarum* subspecies. Of interest is the discovery of a unique *Cryptosporidium* sequence of ASV8 type which is only 91.47% similar to the closest relative of the genus, which may indicate a rather distant taxonomic relationship. This type of nucleotide sequence can be further described as a new species. All identified unique ASV nucleotide sequences were deposited in GenBank.

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

Acknowledgments. 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. ASV (Amplicon Sequence Variant) taxonomic affiliation analysis of *Cryptosporidium scrofarum* species in pigs in the Vologda Region, the Northwestern Federal District of the Russian Federation. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2024;18(1):58–66. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-1-58-66>

© Kryazhev A. L., Novikov A. S., 2024

Введение

Криптоспоридии – распространенные во всем мире протисты, вызывающие заболевание людей и животных [9, 15, 16].

Впервые сообщения о случаях криптоспоридиоза у свиней были зарегистрированы в 1977 г. [8], в России же – в 1984 г. [1].

В настоящее время при помощи новейших молекулярно-генетических методов идентифицировано 44 вида и 120 генотипов представителей рода *Cryptosporidium* [14]. У свиней было выделено тринадцать различных видов/генотипов *Cryptosporidium*, а именно *Cryptosporidium scrofarum* (ранее *Cryptosporidium*, генотип свиньи II), *C. suis* (ранее *Cryptosporidium*, генотип свиньи I), *C. muris*, *C. parvum*, *C. tyzzeri* (ранее генотип I мыши *Cryptosporidium*), *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. struthioni*, генотип *Cryptosporidium* крысы, *Cryptosporidium* sp. Генотип Eire w65.5 и неизвестный генотип *Cryptosporidium* из навозной жижи свиней [6, 10, 17, 18].

Более 90% случаев криптоспоридиоза у свиней вызывается видами *C. suis* и *C. scrofarum* [7]; также сообщается о потенциальной опасности заражения ими человека [10, 11].

В условиях Северо-Западного федерального округа РФ ранее нами были впервые обнаружены криптоспоридии у поросят [3, 4], а в дальнейшем при помощи молекулярно-генетических методик впервые в РФ установлен вид *C. scrofarum* [5].

Целью исследования было выделение, идентификация и анализ типов ASV криптоспоридий свиней в условиях Вологодской области СЗФО РФ.

Материалы и методы

Данные исследования в Российской Федерации проведены впервые.

Исследования проводили в условиях промышленных свинопунктов и частных фер-

мерских хозяйств по выращиванию свиней, расположенных на территории Вологодской области Северо-Западного федерального округа РФ, в период с января по октябрь 2023 г. Фекалии поросят различных возрастов исследовали путем микроскопии фекальных мазков, окрашенных по Циль-Нильсену. После чего замороженные пробы фекалий транспортировали в г. Пушкин и г. 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 по ранее разработанной нами методике [2] с помощью двух раундов высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения nested (вложенной) ПЦР с использованием специализированных методов [13, 19] с последующим демультимплексированием образцов, «деноизинга», объединения последовательностей (перекрытие минимум в 12 нуклеотидов), восстановления исходных флотипов (ASV, (Amplicon sequence variant)) и удаления химерных прочтений [5]. Таксономическую принадлежность последовательностей определяли с помощью blastn в базе данных GenBank.

В результате первичных исследований, сортировки и отбора исследованию подвергли 53 пробы фекалий.

Результаты исследований

Из 53 проб фекалий свиней, выращиваемых в удалённых друг от друга хозяйствах, была выделена тотальная ДНК, которая была использована для приготовления библиотек фрагментов гена 18S рРНК методом nested (вложенной) ПЦР со специфическими праймерами.

В результате высокопроизводительного секвенирования библиотек по технологии

Шумина для каждого образца было получено от 20 до 100 тыс. нуклеотидных последовательностей (прочтений), после обработки которых суммарно выявлено 2372 ASV.

Анализ таксономической принадлежности ASV, проведённый с помощью филогенетического анализа, дополненного анализом с использованием алгоритма blastn в базе данных GenBank, показал, что суммарно во всех исследованных образцах присутствуют только 10 ASV, имеющих высокое сходство с последовательностями, депонированными в GenBank как фрагменты гена 18S рРНК *C. scrofarum*. Эти 10 ASV, однако, составляют 40,6% от всех (944917) прочтений, полученных в результате анализа 53 проб.

В таблице 1 приведены идентификаторы всех обнаруженных ASV, а также процент их сходства с последовательностями гена 18SpРНК, ранее депонированными в GenBank. Только ASV1 и ASV2 полностью идентичны последовательностям, присутствующим в GenBank, остальные различаются в разной степени, что, учитывая высокую консервативность гена 18S рРНК, говорит о таксономических различиях между представителями рода *Cryptosporidium*, выявленных в пробах фекалий. Особенно это касается ASV8, сходство которого с ближайшим родственником рода *Cryptosporidium* составляет всего 91,47%, и может свидетельствовать о довольно удалённом таксономическом родстве, вплоть до нового вида.

Таблица 1 [Table 1]

Нуклеотидные последовательности ASV и их процентное сходство с референсными последовательностями в GenBank

[ASV nucleotide sequences and their percentage similarity to reference sequences in GenBank]

№	Названия последовательностей в сводной таблице ASV [Sequence names in ASV summary table]	Предполагаемый вид и присвоенный номер ASV [Intended species and assigned ASV number]	Процентное сходство с референсными последовательностями [Percentage similarity to reference sequences]
1	Seq1	<i>C. scrofarum</i> ASV1	100
2	Seq4	<i>C. scrofarum</i> ASV2	100
3	Seq92	<i>C. scrofarum</i> ASV3	99,74
4	Seq224	<i>C. scrofarum</i> ASV4	99,48
5	Seq467	<i>C. scrofarum</i> ASV5	99,48
6	Seq812	<i>C. scrofarum</i> ASV6	99,74
7	Seq888	<i>C. scrofarum</i> ASV7	99,74
8	Seq1230	<i>C. scrofarum</i> ASV8	91,47
9	Seq2159	<i>C. scrofarum</i> ASV9	98,17
10	Seq2269	<i>C. scrofarum</i> ASV10	98,17

Все идентифицированные ASV, а также несколько последовательностей гена 18S рРНК *C. scrofarum*, взятые из GenBank (Sequence ID: MT071828, ON14980, KF597533. MN243610, MN243595), были выравнены в программе MEGA с использованием алгоритма Muscle. Выявленные в результате выравнивания нуклеотидные замены для каждого ASV при-

ведены в таблице 2 и на рисунке 1. Хорошо заметно, что ASV8 имеет большое число нуклеотидных замен в последовательности амплифицированного участка гена 18S рРНК по сравнению с другими ASV, а также референсными последовательностями.

Обнаруженные нами нуклеотидные последовательности являются уникальными. Каж-

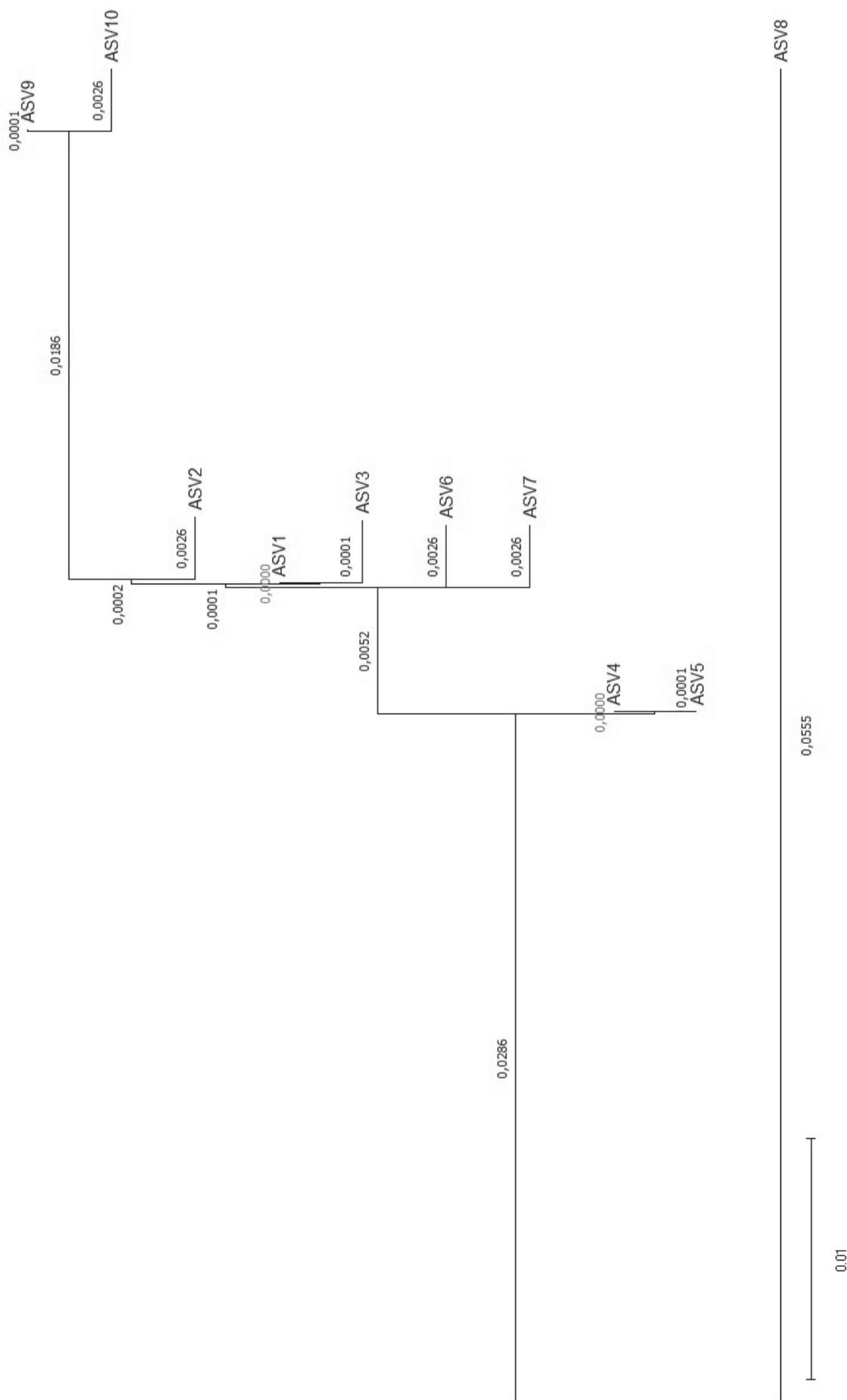


Рис. 1. Филогенетическое дерево обнаруженных изолятов ASV рода *Cryptosporidium*
 [Fig. 1. Phylogenetic tree of detected ASV isolates of the genus *Cryptosporidium*]

дая из них была депонирована в GenBank с присвоением идентификаторов (Sequence ID: OR649139, OR654022, OR654023, OR661243, OR661244, OR654051, OR654052, OR654083, OR654084, OR654106).

Обсуждение

В результате проведенных исследований в условиях СЗФО РФ на примере Вологодской области, установлено, что поросята всех возрастных групп инвазированы *C. scrofarum*. Типы ASV1 и ASV2, выявляемые в различных географических регионах мира от Португалии и Великобритании до Китая, Индии и Австралии, идентифицированы во всех обследуемых хозяйствах, хотя и в существенно различных количествах. Остальные ASV присутствуют в значительно меньшем количестве и не повторяются от хозяйства к хозяйству. Вероятно, эти последовательности принадлежат местным популяциям подвидов *C. scrofarum*.

Интересным представляется обнаружение уникальной последовательности рода *Cryptosporidium* типа ASV8, который в последствии может быть описан как новый вид.

Заключение

Впервые в Российской Федерации в условиях СЗФО на примере Вологодской области с использованием новейших молекулярно-генетических методик установлено паразитирование у свиней *C. scrofarum* у порослят всех возрастных групп. Определены местные типы ASV, а также появились предпосылки для последующего описания нового вида рода *Cryptosporidium*.

Список источников

1. 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.
2. Кряжев А. Л., Новиков А. С. Идентификация таксономической принадлежности криптоспоридий у порослят 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>
3. Кряжев А. Л., Новиков А. С., Никитин В. Ф. Эпизоотологическая ситуация по криптоспоридиозу

порослят в промышленном свиноводстве Вологодской области // Ветеринария. 2020. № 1. С. 30-34. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.1.30-34>

4. Новиков А. С., Кряжев А. Л. Криптоспоридиоз порослят в условиях северо-западного Нечерноземья РФ. Монография. Вологда-Молочное: Вологодская ГМХА, 2022. 112 с.
5. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., & Dada S. H. High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. 2016; 13: 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
6. Chen Y., Qin H., Wu Y., Xu H., Huang J., Li J., & Zhang L. Global prevalence of *Cryptosporidium* spp. in pigs: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology*. 2023; C. 1-38. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000276>
7. Feng Y., Ryan U. M., Xiao L. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. *Trends in parasitology*. 2018; 34 (11): 997-1011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.009>
8. Kennedy G. A., Kreitner G. L., Straffuss A. C. Cryptosporidiosis in three pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1977; 170 (3): 348-350.
9. 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)
10. Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kernerová N., Rost M., Cama V. A., & Kváč M. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitology research*. 2013; 112 (3): 1143-1154. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3244-8>
11. Pettersson E., Ahola H., Frössling J., Wallgren P., & Troell K. 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>
12. Qi M., Zhang Q., Xu C., Zhang Y., Xing J., Tao D., Li J., Zhang L. 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>
13. 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.
14. Ryan U. M., Feng Y., Fayer R., & Xiao L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50-year perspective (1971–2021).

- International Journal for Parasitology. 2021; 51 (13-14): 1099-1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007>
15. Striepen B. Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature News*. 2013; 503 (7475): 189-191. <https://doi.org/10.1038/503189a>
 16. 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>
 17. Wang W., Gong Q. L., Zeng A., Li M. H., Zhao Q., & Ni H. B. Prevalence of *Cryptosporidium* in pigs in China: A systematic review and meta-analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68 (3): 1400-1413. <https://doi.org/10.1111/tbed.13806>
 18. Wang P. Li, S., Zou Y., Du Z. C., Song D. P., Wang P., & Chen X. Q. 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. Zheng S., Li D., Zhou C., Zhang S., Wu Y., Chang Y., Chen Y., Huang J., Ning C., Zhang G., 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 13.10.2023; принята к публикации 12.02.2024

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. Gorbov Yu. K., Machinsky A.P. Spreading of associative diseases in livestock animals and control experience in the Mordovian Autonomous Soviet Socialist Republic. *Parasite cenosis and associative diseases*. M., 1984; 235-252. (In Russ.)
2. Kryazhev A. L., Novikov A. S. 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. *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>
3. Kryazhev A. L., Novikov A. S., Nikitin V. F. Epizootological situation on cryptosporidiosis in piglets in industrial pig farming 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>
4. Novikov A. S., Kryazhev A. L. Cryptosporidiosis of piglets in the northwestern Non-Black Earth Region of the Russian Federation. Monograph. Vologda: Molochnoye: Vologda State Dairy Farming Academy, 2022; 112. (In Russ.)
5. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., & Dada S. H. High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. 2016; 13: 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
6. Chen Y., Qin H., Wu Y., Xu H., Huang J., Li J., & Zhang L. Global prevalence of *Cryptosporidium* spp. in pigs: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology*. 2023; C. 1-38. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000276>
7. Feng Y., Ryan U. M., Xiao L. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. *Trends in parasitology*. 2018; 34 (11): 997-1011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.009>
8. Kennedy G. A., Kreitner G. L., Strafuss A. C. Cryptosporidiosis in three pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1977; 170 (3): 348-350.
9. 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)
10. Nĕmejc K., Sak B., Kvĕtoňová D., Kernerová N., Rost M., Cama V. A., & Kváč M. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitology research*. 2013; 112 (3): 1143-1154. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3244-8>
 11. Pettersson E., Ahola H., Frössling J., Wallgren P., & Troell K. 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>
 12. Qi M., Zhang Q., Xu C., Zhang Y., Xing J., Tao D., Li J., Zhang L. 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>
 13. 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.
 14. Ryan U. M., Feng Y., Fayer R., & Xiao L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50-year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology*. 2021; 51 (13-14): 1099-1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007>
 15. Striepen B. Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature News*. 2013; 503 (7475): 189-191. <https://doi.org/10.1038/503189a>
 16. 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>
 17. Wang W., Gong Q. L., Zeng A., Li M. H., Zhao Q., & Ni H. B. Prevalence of *Cryptosporidium* in pigs in China: A systematic review and meta-analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68 (3): 1400-1413. <https://doi.org/10.1111/tbed.13806>
 18. Wang P. Li, S., Zou Y., Du Z. C., Song D. P., Wang P., & Chen X. Q. 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. Zheng S., Li D., Zhou C., Zhang S., Wu Y., Chang Y., Chen Y., Huang J., Ning C., Zhang G., 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 13.10.2023; accepted for publication 12.02.2024

About the authors:

Kryazhev Andrey L., Vologda State Dairy Farming Academy (2 Shmidta Str., Molochnoye Village, Vologda, 160555), Vologda, Russia, Doctor of Veterinary Sciences, ORCID ID: 0000-0001-7015-8063, kamarnett@mail.ru

Novikov Artem S., Vologda State Dairy Farming Academy (2 Shmidta Str., Molochnoye Village, Vologda, 160555), Vologda, Russia, Candidate of Veterinary Sciences, ORCID ID: 0000-0002-6919-8524, vetnovikov@yandex.ru

Contribution of co-authors:

Kryazhev Andrey L. – literature source review on the issue, taking samples, their preparation and study, material critical analysis and conclusions.

Novikov Artem S. – taking samples, their preparation and study, literature source review on the issue, article correction.

All authors have read and approved the final manuscript.