

УДК 619:616.99:636.4(470.2)
DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.60

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CRYPTOSPORIDIUM* В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО СВИНОВОДСТВА ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РФ

Кряжев А.Л. (ORCID 0000-0001-7015-8063) профессор кафедры эпизоотологии и микробиологии, д.в.н., доцент, ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА им. Н.В. Верещагина;
Новиков А.С. (ORCID 0000-0002-6919-8524) доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства, к.в.н., ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА им. Н.В. Верещагина

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

Key words: cryptosporidiosis, *Cryptosporidium scrofarum*, oocysts, PCR, DNA, sequencing, 18S rRNA, piglets, the Vologda region, the Russian Federation

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



РЕФЕРАТ

Криптоспоририоз – широко распространенная паразитарная болезнь многих видов домашних и диких животных, а также человека, являющееся значимой проблемой в области ветеринарии и медицины. Сельскохозяйственные животные, в частности поросята, наиболее часто подвержены данной болезни, однако видовой состав представителей рода *Cryptosporidium* у данного вида животных в РФ до настоящего дня оставался неизвестным. Впервые в Российской Федерации, в условиях северо-запада, на примере Вологодской области в свиноводческих хозяйствах с промышленной технологией содержания поросят при использовании новейших молекулярно-генетических методик, а именно с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения nested (вложенной) ПЦР, нами установлено паразитирование *C. scrofarum* во всех возрастных группах обследуемых животных. Общая инвазированность поголовья в условиях свинокомплексов составила 34% (51/150). Поросята-сосуны были инвазированы криптоспоридиями в 40% случаев (12/30), интенсивность криптоспоририозной инвазии была преимущественно сильной (+++), встречалась в 20% (6/30) случаев. Средняя (++) и слабая (+) степени инвазированности животных также имели место в 3% (10/30) случаев каждая. В возрастной группе поросят-отъемышей в возрасте 1-3 месяца инвазированность криптоспоридиями составила 33,3% (10/30), доминировала сильная (+++) степень выделения ооцист, она составила 26,7% (8/30) против 10 % (3/30) средней (++) и 3,3% (1/30) слабой (+). Наиболее инвазированы ооцистами криптоспоридий поросята-откормочники в возрасте 4-6 месяцев, экстенсивность инвазированности данной группы составила 60 % (18/30). Степень выделения ооцист была преимущественно средней (++) – 26,7% (8/30) и сильной – 23,3% (7/30). В 13,3% (4/30) случаев встречалась слабая (+) степень криптоспоририозной инва-

зии. Животные старше 6 месяцев были заражены криптоспоридиями в 20% (6/30) случаев. У них регистрировали также среднюю (++) – 13,3% (4/30) и сильную (+++) – 6,7% (2/30) степени инвазии, слабой (+) инвазированности в данной возрастной группе не обнаруживали. Свиноматки также были инвазированы криптоспоридиями. Их зараженность составила 16,7% (5/30), а степень криптоспоридиозной инвазии была слабой (+).

ВВЕДЕНИЕ

Криптоспоридиоз – широко распространенная паразитарная болезнь многих видов домашних и диких животных, а также человека, вызываемое простейшими подкласса *Cryptogregaria*, семейства *Cryptosporidiidae*, рода *Cryptosporidium*. Криптоспоридии ранее рассматривались как монотипное семейство *Cryptosporidiidae* в составе класса кокцидий. По современным данным, полученным в результате филогенетических исследований, выполненных на молекулярном уровне, паразиты образуют в системе споровиков самостоятельную группировку высокого ранга, ближайшими родственниками которой являются грегарины [1].

Криптоспоридиоз в настоящее время является значимой проблемой в области ветеринарии и медицины. Не так давно проведенные исследования доказали, что криптоспоридии занимают второе место после ротавируса в этиологии диарей и смертности детей [2, 3, 4]. Криптоспоридии обнаружены во многих странах мира [5]. На территории РФ они впервые были обнаружены у телят в 1983 году [6], а затем и у других видов животных, в том числе у поросят [7, 8]. Криптоспоридиоз широко распространен среди сельскохозяйственных животных в условиях северо-запада РФ [9–12].

Не так давно молекулярно-генетическими методами было идентифицировано 2 вида криптоспоридий поросят – *C. suis* и *C. scrofarum*, которые до недавнего времени считались строго специфичными для данного вида хозяев [13, 14]. Однако в различных странах начали появляться данные об обнаружении у свиней зоонозного опасного вида *C. parvum*, а также о потенциально зоонозной опасности первых двух видов [15–20].

В Российской Федерации обнаружение криптоспоридий у поросят с использованием молекулярно-генетических ме-

тодик ранее не проводилось.

Целью наших исследований было определение таксономической принадлежности криптоспоридий свиней в условиях промышленного свиноводства на территории Вологодской области СЗФО РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные исследования в Российской Федерации были выполнены впервые.

Исследования проводились в условиях промышленных свинокомплексов, расположенных на территории Вологодской области Северо-Западного федерального округа РФ в период с января по сентябрь 2022 г). Биологический материал (фекалии) был получен от поросят различных возрастов – поросят-сосунов в возрасте до 1 месяца, отъемышей (1-3 месяца), откормочников (4–6 месяцев) и (6 месяцев и старше), а также от свиноматок, находящихся на подсосе. Возрастные группы были сформированы с учетом технологических параметров содержания животных на свинокомплексах. Пробы фекалий в свежем виде в специальном термоконтейнере транспортировались в лабораторию, где проводились первичные их обследования. Для обнаружения ооцист криптоспоридий, идентификации их до рода *Cryptosporidium*, а также для определения интенсивности криптоспоридиозной инвазии поросят в условиях лаборатории на базе факультета ветеринарной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА производилось приготовление нативных фекальных мазков, концентрированных препаратов ооцист при помощи флотационных и центрифужно-флотационных методик с окрашиванием микропрепаратов по Циллю-Нильсену и последующим микроскопированием для выявления и подсчета ооцист криптоспоридий. Интенсивность выделения ооцист в фекалиях определяли с применением методики И. Павласека [21].

По численности выделения ооцист с расчетом на 1 г фекалий определяли степень инвазированности животных в крестах: «+» (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. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Идентификация видов рода *Cryptosporidium* в образцах фекалий сельскохозяйственных животных проводилась с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек фрагментов гена 18S рРНК, полученных в результате проведения *nested* (вложенной) ПЦР. В качестве матрицы использовали тотальную ДНК, выделенную из образцов фекалий животных, модифицированным СТАВ методом [22]. Разрушение микроорганизмов в образцах осуществляли с помощью шарикового гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) со скоростью 6000 встряхиваний в минуту два раза по 30 сек. 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, 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°C 1 мин., после чего следовало 40 циклов: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин. Финальная элонгация проводилась при 72°C 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 второго раунда ПЦР были аналогичны условиям проведения первого, но количество 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, подготовка библиотек и секвенирование проводились 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).

Обработка полученных результатов проводилась 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)). Таксономическая принадлежность последовательностей определялась с помощью *blastn* в базе данных GenBank.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием компьютерной программы STATISTICA 10. Всего исследованию подверглись пробы от 150 животных (по 30 в каждой возрастной группе).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представители рода *Cryptosporidium* были выявлены в каждой исследуемой возрастной группе, причем как у животных с признаками расстройства пищеварения, так и у поросят без проявления клинических признаков болезни. Общая инвазированность поголовья в условиях свинокомплексов составила 34% (51/150). Поросята-сосуны были инвазированы криптоспоридиями в 40% случаев (12/30),

Таблица 1

Распространение криптоспориديоза в свиноводческих хозяйствах промышленного типа в условиях Вологодской области

Возрастные группы обследованных животных	Обследовано поросят	Поросята, инвазированные <i>C. scrofarum</i>		Интенсивность выделения ооцист					
				слабая +		средняя ++		сильная +++	
		Кол-во	ЭИ %	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
До 1 месяца	30	12	40	3	10	3	10	6	20
1–3 месяца	30	10	33,3	1	3,3	3	10	8	26,7
4–6 месяцев	30	18	60	4	13,3	8	26,7	7	23,3
Старше 6 месяцев	30	6	20	–	–	4	13,3	2	6,7
Свиноматки	30	5	16,7	5	16,7	–	–	–	–
Всего (n)	150	51	34	13	8,7	18	12	23	15,3

интенсивность криптоспориозной инвазии была преимущественно сильной (+++), встречалась в 20% (6/30) случаев. Средняя (++) и слабая (+) степени инвазированности животных также имели место в 3% (10/30) случаев каждая. В возрастной группе поросят-отъемышей в возрасте 1-3 месяца инвазированность криптоспоридами составила 33,3% (10/30), доминировала сильная (+++) степень выделения ооцист, она составила 26,7% (8/30) против 10 % (3/30) средней (++) и 3,3% (1/30) слабой (+). Наиболее инвазированы ооцистами криптоспориций поросята-откормочники в возрасте 4-6 месяцев, экстенсивность инвазии данной группы составила 60 % (18/30). Степень выделения ооцист была преимущественно средней (++) – 26,7% (8/30) и сильной – 23,3% (7/30). В 13,3% (4/30) случаев встречалась слабая (+) степень криптоспориозной инвазии. Животные старше 6 месяцев были заражены криптоспоридами в 20% (6/30) случаев. У них регистрировали также среднюю (++) – 13,3% (4/30) и сильную (+++) – 6,7% (2/30) степени инвазии, слабой (+) инвазированности в данной возрастной группе не наблюдали. Свиноматки также были инва-

зированы криптоспоридами. Их зараженность составила 16,7% (5/30), а степень криптоспориозной инвазии была слабой (+) (табл 1.).

На основании литературных данных [23, 24] 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 неиз-

вестных очень близкородственных видов.

Таким образом, в результате наших исследований установлено, что в условиях северо-запада РФ на примере Вологодской области, при промышленной технологии содержания поросята всех возрастных групп инвазированы *C. scrofarum*. Наиболее подвержены заражению животные, находящиеся на откорме в возрасте 4–6 месяцев. В то время, как большинство зарубежных исследователей в Европе [25, 26, 19], Америке [27] и Австралии [28] сообщают о наибольшей инвазированности криптоспоридиями поросят в возрасте 1–3 месяца.

Также наши исследования показали, что все животные инвазированы лишь одним видом криптоспоридий – *Cryptosporidium scrofarum*. О подобном факте сообщает также группа китайских ученых [29]. В то время, как ряд исследователей пишут о присутствии у поросят двух, а иногда даже трех видов криптоспоридий, таких как *C. suis*, *C. scrofarum* и *C. parvum* [13–20].

Интересным представляется тот факт, что в наших исследованиях установлен факт заражения поросят-сосунов *C. scrofarum* в то время, как в основном сообщается, что данным видом криптоспоридий заражаются животные старших возрастных групп [15, 19, 30]. Однако есть сообщения, совпадающие с результатами наших исследований, когда данный вид возбудителя регистрировали у поросят в возрасте до 5 недель [5, 31, 32]. Помимо этого, обнаруженные у свиноматок криптоспоридии, идентифицированы как *C. scrofarum*, что позволяет делать выводы о влиянии свиноматок на заражение молочных поросят, в данном случае свиноматок нужно рассматривать, как практически единственный источник криптоспоридиозной инвазии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в Российской Федерации, в условиях северо-запада на примере Вологодской области в промышленных свиноводческих предприятиях с использованием новейших молекулярно-генетических методик была создана система праймеров

для nested (вложенного) ПЦР, амплифицирующих потенциально видоспецифичный участок гена 18S рРНК, применено высокопроизводительное секвенирование ампликонных библиотек с последующей идентификацией таксонов криптоспоридий. Установлено паразитирование *C. scrofarum* во всех возрастных группах поросят. Наиболее подвержены инвазии животные в возрасте 4–6 месяцев.

БЛАГОДАРНОСТИ

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.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF CRYPTOSPORIDIUM REPRESENTATIVES IN INDUSTRIAL PIG INDUSTRY IN THE VOLOGDA REGION NORTH-WESTERN FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION

Kryazhev A.L (ORCID 0000-0001-7015-8063) Professor, Department of Epizootology and Microbiology, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, FSBE Institution of Higher Education «Vologda State Dairy Farming Academy named after N.V. Vereshchagin»; A.S. Novikov (ORCID0000-0002-6919-8524) Associate Professor, Department of Internal Non-Contagious Diseases, Surgery and Obstetrics, Ph.D. FSBE Institution of Higher Education «Vologda State Dairy Farming Academy named after N.V. Vereshchagin»

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a widespread parasitic disease of many species of domestic and wild animals, as well as humans, which is a significant problem in the field of medicine and veterinary medicine. Farm animals, in particular piglets, are most often susceptible to this disease, but the species composition of representatives of the genus *Cryptosporidium* in this species of animals in the Russian Federation has remained unknown to date. For the first time in the Russian Federation,

in the conditions of the north-west, on the example of the Vologda region in pig farms with industrial technology for keeping piglets using the latest molecular genetic techniques, namely, using high-throughput sequencing of amplicon libraries of fragments of the 18S rRNA gene obtained as a result of nested PCR, we have established parasitism of *C. scrofarum* in all age groups of the animals examined. The total invasion of live-stock in pig farms was 34% (51/150). Pine piglets were invaded by *Cryptosporidium* in 40% of cases (12/30), the intensity of *Cryptosporidium* infection was predominantly strong (+ + +), occurred in 20% (6/30) of cases. The mean (+ +) and weak (+) degree of animal invasion also occurred in 3% (10/30) of cases each. In the age group of weaning piglets at the age of 1-3 months, *Cryptosporidium* infection was 33.3% (10/30), a strong (+ + +) degree of oocyst production dominated, it was 26.7% (8/30) versus 10% (3/30) of the average (+ +) and 3.3% (1/30) weak (+). The most invasive oocysts are *Cryptosporidium* of fattening piglets at the age of 4-6 months, the exten-sion of this group was 60% (18/30). The degree of oocyst release was predomi-nantly moderate (+ +) – 26.7% (8/30) and strong – 23.3% (7/30). In 13.3% (4/30) of cases, there was a weak (+) degree of *Cryptosporidium* infection. Animals older than 6 months were infected with *Cryptosporidium* in 20% (6/30) of cases. They also recorded an average (+ +) – 13.3% (4/30) and a strong (+ + +) – 6.7% (2/30) degree of invasion, weak (+) invasion in this age group was not detected. Sows have also been invaded by *Cryptosporidium*. Their infection rate was 16.7% (5/30), and the degree of cryptospor-idiosis was weak (+).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Adl, S.M. Revisions to the classifica-tion, nomenclature, and diversity of eukary-otes / S.M. Adl, D. Bass, C.E. Lane, J. Lukeš, C.L. Schoch, A. Smirnov,... & Q. Zhang // *Journal of Eukaryotic Microbiolo-gy*. – 2019. – Vol. 66(1). – P. 4-119. – DOI 10.1111/jeu.12691
2. Snelling, W. J. *Cryptosporidiosis in developing countries* / W. J. Snelling, L.

- Xiao, G. Ortega-Pierres, C. J. Lowery, J. E. Moore, J. R. Rao,... & J. S. Dooley // *The Journal of Infection in Developing Coun-tries*. – 2007. – Vol. 1(03). – P. 242-256. – DOI 10.3855/jidc.360
3. Striepen, B. Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis / B. Striepen // *Nature News*. – 2013. – Vol. 503(7475). – P. 189-191. – DOI 10.1038/503189a
4. Kotloff, K.L. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young chil-dren in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a pro-spective, case-control study / K.L. Kotloff, J.P. Nataro, W.C. Blackwelder, D. Nasrin, T.H. Farag, S. Panchalingam,... & M.M. Levine // *The Lancet*. – 2013. – Vol. 382 (9888). – P. 209-222. – DOI 10.1016/S0140-6736(13)60844-2
5. Wang, R. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. / R. Wang, S. Qiu, F. Jian, S. Zhang, Y. Shen, L. Zhang, C. Ning, J. Cao, M. Qi, L. Xiao // *Parasitol Res*. – 2010. – Vol. 107. – P. 1489-1494. – DOI 10.1007/s00436-010-2024-6
6. Никитин, В.Ф. Ассоциация гель-минтов и кокцидий у телят в животновод-ческих комплексах / В.Ф. Никитин, И. Павласек // II Всесоюзный съезд парази-тологов: тез. докл. (Киев, октябрь 1983). Киев: Наукова думка. – 1983. – С. 235-246.
7. Васильева, В.А. Криптоспоридиоз и эзофагостомоз свиней при моноинвази-ях и паразитоценозе: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Москва. – 1998. – 41 с.
8. Горбов, Ю.К. Распространение ассоциативных заболеваний с/х живот-ных и опыт борьбы с ними в Мордовской АССР / Ю.К. Горбов, А.П. Мачинский // *Паразитоценозы и ассоциативные болез-ни*. М., – 1984. – С. 235-252.
9. Кряжев, А.Л. Криптоспоридиоз телят в хозяйствах молочной специализа-ции Северо-Запада России (эпизоотология, клиническая картина, терапия и профилактика): дис. ... канд. вет. наук. М., – 2005. – 152 с.
10. Кряжев, А.Л. Криптоспоридиоз телят в хозяйствах молочной специализа-ции Северо-Западного региона России :

- Монография / А.Л. Кряжев, П.А. Лемехов // Вологда–Молочное: ИЦ ВГМХА. – 2010. – 111 с.
11. Кряжев, А.Л. Эпизоотологическая ситуация по криптоспоридиозу поросят в промышленном свиноводстве Вологодской области / А.Л. Кряжев, А.С. Новиков, В.Ф. Никитин. // Ветеринария. – 2020. – №1. – С. 30-34. – DOI 10.30896/0042-4846.2020.23.1.30-34
 12. Новиков, А.С. Криптоспоридиоз поросят в условиях северо-западного Нечерноземья РФ / А.С. Новиков, А.Л. Кряжев // Монография // Вологда–Молочное: Вологодская ГМХА. – 2022. – 112 с.
 13. Kváč, M. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*) / M. Kváč, M. Kestránová, M. Pinková, D. Květoňová, J. Kalinová, P. Wagnerová, ... & B. Sak // *Veterinary parasitology*. – 2013. – Vol. 191(3-4). – P. 218-227. – DOI 10.1016/j.vetpar.2012.09.005
 14. Ryan, U.M. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*) / U.M. Ryan, P. Monis, H.L. Enemark, I. Sulaiman, B. Samarasinghe, C. Read, ... & L. Xiao // *Journal of Parasitology*. – 2004. – Vol. 90(4). – P. 769-773. – DOI 10.1645/GE-202R1
 15. Němejc, K. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices / K. Němejc, B. Sak, D. Květoňová, N. Kernerová, M. Rost, V.A. Cama, M. Kváč // *Parasitology research*. – 2013. – Vol. 112(3). – P. 1143-1154. – DOI 10.1007/s00436-012-3244-8
 16. Petersen, H.H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Danish organic pig farms: seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes / H.H. Petersen, W. Jianmin, K.K. Katakam, H. Mejer, S.M. Thamsborg, A. Dalsgaard, ... & H.L. Enemark // *Veterinary parasitology*. – 2015. – Vol. 214(1-2). – P. 29-39. – DOI 10.1016/j.vetpar.2015.09.020
 17. Zintl, A. Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland / A. Zintl, D. Neville, D. Maguire, S. Fanning, G. Mulcahy, H.V. Smith, & T. DE, W. A. A. L. // *Parasitology*. – 2007. – Vol. 134(11). – P. 1575-1582. – DOI 10.1017/S0031182007002983
 18. Kváč, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic / M. Kváč, B. Sak, D. Hanzlíková, J. Kotilová, D. Květoňová // *Parasitology research*. – 2009. – Vol. 104(2). – P. 425-428. – DOI 10.1007/s00436-008-1215-x
 19. Pettersson, E. Detection and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in Swedish pigs / E. Pettersson, H. Ahola, J. Frössling, P. Wallgren, K. Troell // *Acta Veterinaria Scandinavica*. – 2020. – Vol. 62(1). – P. 1-7. – DOI 10.1186/s13028-020-00537-z
 20. Qi, M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Xinjiang, China / M. Qi, Q. Zhang, C. Xu, Y. Zhang, J. Xing, D. Tao, ... & L. Zhang // *Acta Tropica*. – 2020. – Vol. 209. – P. 105551. – DOI 10.1016/j.actatropica.2020.105551
 21. Pavlásek, I. *Cryptosporidia*: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment / I. Pavlásek // *Remedia Klin. Mikrobiol.* – 1999. – Vol. 3. – P. 290-301.
 22. Rahimah, A. B. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA / A.B. Rahimah, S.C. Cheah, S. Rajinder // *J. Oil Palm Res.* – 2006. – Vol. 18. – P. 296-304.
 23. Kaupke, A. Identification of pig-specific *Cryptosporidium* species in mixed infections using Illumina sequencing technology / A. Kaupke, J. Gawor, A. Rzeżutka, R. Gromadka // *Experimental parasitology*. – 2017. – Vol. 182. – P. 22-25. – DOI 10.1016/j.exppara.2017.09.020
 24. Zheng, S. Molecular identification and epidemiological comparison of *Cryptosporidium* spp. among different pig breeds in Tibet and Henan, China / S. Zheng, D. Li, C. Zhou, S. Zhang, Y. Wu, Y. Chang, ... & L. Zhang // *BMC veterinary research*. – 2019. – Vol. 15. – №. 1. – P. 1-8. – DOI 10.1186/s12917-019-1847-3
 25. Maddox-Hyttel, C. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Dan-

ish cattle and pigs-Occurrence and management associated risk factors / C. Maddox-Hyttel, R. Langkjær, H. Enemark, H. Vigré // *Vet Parasitol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 48-59. – DOI 10.1016/j.vetpar.2006.04.032

26. Hammes, I. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway / I. Hammes, B. Gjerde, T. Forberg, L. Robertson // *Vet Parasitol.* – 2007. – Vol. 144. – P. 222-33. – DOI 10.1016/j.vetpar.2006.10.011

27. Guselle, N. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market / N. Guselle, A. Appelbee, M. Olson // *Vet Parasitol.* – 2003. – Vol. 113(1). – P. 7-18. – DOI 10.1016/S0304-4017(03)00039-6

28. Johnson, J. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia / J. Johnson, R. Buddle, S. Reid, A. Armson, U. Ryan // *Exp Parasitol.* – 2008. – Vol. 119. – P. 418-421. – DOI 10.1016/j.exppara.2008.04.009

29. Zou, Y. Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* infection in farmed pigs in Zhejiang, Guangdong, and Yunnan provinces, China / Y. Zou, J.G. Ma, D.M. Yue, W.B. Zheng, X.X. Zhang, Q. Zhao, X.Q. Zhu // *Tropical animal health and production.* – 2017. – Vol. 49(3). – P. 653-657. – DOI 10.1007/s11250-017-1230-y

30. Kváč, M. Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection / M. Kváč, K. Němejc, M. Kestránová, D. Květoňová, P. Wagnerová, M. Kotková, M. Rost et al. // *Vet Parasitol.* – 2014. – Vol. 202(3-4). – P. 330-334. – DOI 10.1016/j.vetpar.2014.02.012

31. Zhang, W. Prevalence and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp in pre-weaned and post-weaned piglets in Heilongjiang Province, China / W. Zhang, F. Yang, A. Liu, R. Wang, L. Zhang, Y. Shen et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. e67564. – DOI 10.1371/journal.pone.0067564

32. Wang, P. The infection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pigs in southern China / P. Wang, S. Li, Y. Zou, Z.C. Du, D.P. Song, P. Wang, X.Q. Chen, // *Microbial Pathogenesis.* – 2022. – Vol. 165. – P. 105459. – DOI

10.1016/j.micpath.2022.105459

REFERENCES

- Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, Zhang Q. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2019;66(1): 4-119. doi:10.1111/jeu.12691
- Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, Dooley JS. Cryptosporidiosis in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 2007;1(03):242-256. doi:10.3855/jidc.360
- Striepen B. Parasitic infections: time to tackle cryptosporidiosis. *Nature News.* 2013;503(7475):189-191. doi:10.1038/503189a
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Levine MM. 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. doi:10.1016/S0140-6736(13)60844-2
- 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. doi:10.1007/s00436-010-2024-6
- Nikitin VF, Pavlasek I. Association of helminths and coccidia in calves in livestock complexes II All-Union Congress of Parasitologists: abstracts. Report. Kyiv: Science thought. - 1983 Oct.;235-246 [in Russ.]
- Vasilyeva VA. Cryptosporidiosis and esophagostomosis of pigs with monoinvasion and parasitocenosis: abstract of the thesis. dis. ... Dr. vet. Sciences. Moscow. 1998;41 [in Russ.]
- Gorbov YuK, Machinsky AP. The spread of associative diseases of agricultural animals and the experience of combating them in the Mordovian Autonomous Soviet Socialist Republic Parasitocenoses and associative diseases. M., 1984;235-252 [in Russ.]
- Kryazhev AL. Cryptosporidiosis of

- calves in dairy farms of the North-West of Russia (epizootology, clinical picture, therapy and prevention): dis. ... cand. vet. Sciences. M., 2005;152 [in Russ.]
10. Kryazhev AL, Lemekhov PA. Cryptosporidiosis of calves in dairy farms of the North-Western region of Russia: Monograph Vologda-Molochnoe: IC VGMHA. 2010;111 [in Russ.]
11. Kryazhev AL, Novikov AS, Nikitin VF. Epizootological situation on cryptosporidiosis of piglets in industrial pig breeding in the Vologda region. *Veterinary*. 2020; 1:30-34. doi:10.30896/0042-4846.2020.23.1.30-34 [in Russ.]
12. Novikov AS, Kryazhev AL. Cryptosporidiosis of piglets in the conditions of the northwestern Non-Chernozem region of the Russian Federation. Monograph Vologda-Molochnoe: Vologda GMHA. 2022;112. [in Russ.]
13. Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, Sak B. Cryptosporidium scrofarum n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary parasitology*. 2013; 191(3-4):218-227. doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.005
14. Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Xiao L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*. 2004; 90(4):769-773. doi:10.1645/GE-202R1
15. Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kernerová N, Rost M, Cama VA, 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. doi:10.1007/s00436-012-3244-8
16. Petersen HH, Jianmin W, Katakam KK, Mejer H, Thamsborg SM, Dalsgaard A, Enemark HL. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Danish organic pig farms: seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes. *Veterinary parasitology*. 2015;214(1-2):29-39. doi:10.1016/j.vetpar.2015.09.020
17. Zintl A, Neville D, Maguire D, Fan-ning S, Mulcahy G, Smith HV, T DE, W.A.A. L. Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology*. 2007;134(11):1575-1582. doi:10.1017/S0031182007002983
18. Kváč M, Sak B, Hanzlíková D, Kotilová J, Květoňová D. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitology research*. 2009;104(2):425-428. doi:10.1007/s00436-008-1215-x
19. 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. doi:10.1186/s13028-020-00537-z
20. Qi M, Zhang Q, Xu C, Zhang Y, Xing J, Tao D, Zhang L. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Xinjiang, China. *Acta Tropica*. 2020; 209: 105551. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105551
21. Pavlásek I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment *Remedia Klin. Mikrobiol*. 1999; 3: 290-301.
22. Rahimah AB, Cheah SC, 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.
23. 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. doi:10.1016/j.exppara.2017.09.020
24. 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. doi:10.1186/s12917-019-1847-3
25. Maddox-Hyttel C, Langkjær R, Enemark H, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-Occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol*.

- 2006;141:48-59. doi:10.1016/j.vetpar.2006.04.032
26. Hamnes I, Gjerde B, Forberg T, Robertson L. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet Parasitol.* 2007;144: 222-33. doi:10.1016/j.vetpar.2006.10.011
27. Guselle N, Appelbee A, Olson M. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet Parasitol.* 2003;113(1):7-18. doi:10.1016/S0304-4017(03)00039-6
28. 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: 418-421. doi:10.1016/j.exppara.2008.04.009
29. Zou Y, Ma JG, Yue DM, Zheng, WB, Zhang XX, Zhao Q, Zhu XQ. Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* infection in farmed pigs in Zhejiang, Guangdong, and Yunnan provinces, China. *Tropical animal health and production.* 2017; 49(3):653-657. doi:10.1007/s11250-017-1230-y
30. Kváč M, Němejc K, Kestránová M, Květoňová D, Wagnerová P, Kotková M, Rost M, et al. Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection. *Vet Parasitol.* 2014;202(3-4):330-334. doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.012
31. Zhang W, Yang F, Liu A, Wang R, Zhang L, Shen Y, et al. Prevalence and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp in pre-weaned and post-weaned piglets in Heilongjiang Province, China. *PLoS One.* 2013;8:e67564. doi:10.1371/journal.pone.0067564
32. Wang P, Li S, Zou Y, Du ZC, Song DP, Wang P, Chen XQ. The infection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pigs in southern China. *Microbial Pathogenesis.* 2022;165:105459. doi:10.1016/j.micpath.2022.105459