

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska

Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu – przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych

Pig lymph nodes as a source of bacteria endangering public health –
presumptions for expanded post-slaughter examinations

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonywana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Krzysztofa Anusza

w Katedrze Higieny Żywności

i Ochrony Zdrowia Publicznego

Promotor pomocniczy

Dr Anna Didkowska

Warszawa, 2024

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. Nr 90 poz. 631 z późn. zm.).

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną. Przyjmuję do wiadomości, że praca doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data

Podpis autora pracy

*Składam serdeczne podziękowania
za pomoc w realizacji pracy,
przekazaną wiedzę i ogrom życzliwości :*

Prof. dr hab. Krzysztofowi Anuszowi,

dr Annie Didkowskiej,

dr Ewelinie Kwiecień

dr hab. Magdalenie Rzewuskiej, prof. SGGW.

oraz dr Ilonie Stefańskiej.

Podziękowania składam również współautorom publikacji naukowych:

Prof. dr hab. Ewie Augustynowicz – Kopeć, dr Sylwii Brzezińskiej,

dr Danielowi Klichowi, dr hab. Izabeli Dolce oraz mgr Piotrowi Kociubie.

Streszczenie

Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu – przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych

Streptococcus dysgalactiae, *Rhodococcus equi* i *Staphylococcus aureus* wg danych literaturowych są bakteriami ropotwórczymi najczęściej izolowanymi z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian. Występowanie bakterii o potencjale zoonotycznym, takich jak te trzy gatunki, w węzłach chłonnych świń bez zmian chorobowych, szczególnie zagraża zdrowiu publicznemu, ponieważ w takich wypadkach, gdy nie ma podejrzenia obecności patogenów podczas badania poubojowego, konsekwencją jest niepobieranie materiału do badań bakteriologicznych. Dodatkowo ustawodawstwo Unii Europejskiej kładzie nacisk jedynie na ocenę wizualną tusz i narządów, co utrudnia wykrywanie węzłów chłonnych ze zmianami. Badania określające wartości MIC chemioterapeutyków przy użyciu metody dyfuzyjno-paskowej wykazały, że niektóre szczepy bakterii ropotwórczych izolowanych z węzłów chłonnych świń są odporne na chemioterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe; te wyniki oraz wykrycie metodą PCR genów oporności *tetM* i *tetO* na tetracykliny oraz genu oporności *ermB* na erytromycynę w szczepach *Streptococcus dysgalactiae* wskazują, że surowa wieprzowina może być rezerwuarem genów oporności na antybiotyki. Obecność takiej populacji bakterii w tuszach wieprzowych może umożliwić horyzontalny transfer genów ze szczepów obecnych w wieprzowinie do bakterii obecnych w organizmie człowieka. Wyizolowane bakterie ropotwórcze charakteryzowały się w większości wysokim stopniem polimorfizmu wewnątrzgatunkowego. Wskazane jest ich monitorowanie w stadach świń, z uwzględnieniem oceny pokrewieństwa genetycznego np. metodą elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Oprócz bakterii ropotwórczych, w węzłach chłonnych świń mogą występować inne bakterie zoonotyczne, wśród których istotne znaczenie ma *Mycobacterium avium*. Wykazano, że zarówno liczba zmian, jak i procent powierzchni przekroju węzłów chłonnych świń objętych zmianami gruźliczopodobnymi (badanie fotogrametryczne), pozytywnie korelują z obecnością *M. avium* - jednego z najczęściej izolowanych gatunków atypowych prątków. Wobec stosunkowo wysokiego prawdopodobieństwa obecności prątków *M. avium* w węzłach chłonnych bez zmian, węzły takie powinny być kwalifikowane jako „prawdopodobnie wolne”, a nie jako wolne. Jakościowe nasilenie zmian, płeć zwierząt oraz wielkość stada nie miały wpływu na obecność *M. avium* w badanych węzłach chłonnych. Kryterium liczby zmian oraz procent powierzchni przekroju

węzłów chłonnych świń objętych zmianami gruźliczopodobnymi wydają się być miarodajne i powinny być wykorzystywane w badaniach przesiewowych. Ocena tych wskaźników pozwala na wybór materiału o wysokim prawdopodobieństwie obecności prątków do badań bakteriologicznych oraz molekularnych mikrobiologicznych.

Słowa kluczowe: badanie poubojowe świń, bakterie ropotwórcze, koncepcja „One Health”, lekooporność, *Mycobacterium avium*, polimorfizm bakterii, węzły chłonne świń, zmiany ropne i gruźliczopodobne

Abstract

Pig lymph nodes as a source of bacteria endangering public health – presumptions for expanded post-slaughter examinations

Streptococcus dysgalactiae, *Rhodococcus equi* and *Staphylococcus aureus* are, according to the literature, the abscessogenic bacteria, most commonly isolated from lymph nodes of pigs with and without purulent lesions. The occurrence of bacteria with zoonotic potential, such as these three species, in porcine lymph nodes without lesions is a particular danger to public health. In cases when there is no suspicion of pathogens at post-slaughter examination, the consequence is that material for bacteriological examination is not collected. In addition, the insistence of European Union legislation only on visual assessment of carcasses and organs makes the detection of lymph nodes with lesions difficult. Studies determining the MIC values of chemotherapeutics using the gradient diffusion-strip method have shown that some strains of abscessogenic bacteria isolated from pig lymph nodes are resistant to antimicrobial chemotherapy; this finding and the detection by PCR of the *tetM* and *tetO* resistance genes to tetracyclines and the *ermB* resistance gene to erythromycin in strains of *Streptococcus dysgalactiae* indicate that raw pork may be a reservoir of antibiotic resistance genes. The presence of such a bacterial population in pig carcasses may enable horizontal gene transfer from strains present in pork to bacteria present in the human body. The majority of the isolated pyogenic bacteria were characterised by a high degree of intra-species polymorphism. This implies that they should be monitored in pig herds, and their genetic relatedness assessed, e.g. by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Besides, these abscessogenic zoonotic bacteria, porcine lymph nodes may have another significant zoonotic bacteria species present: *Mycobacterium avium*. It has been shown that the percentage of the cross-sectional area of pig lymph nodes affected by tuberculosis-like lesions as evaluated by photogrammetric examination and the number of such lesions in the examined lymph nodes, correlates positively with the presence of *M. avium*, one of the most commonly isolated species of atypical *Mycobacteria* spp. However, even in lymph nodes without lesions, the probability of the presence of *M. avium* is relatively high and such nodes should be classified as “probably free” rather than as free of *Mycobacteria* spp. The qualitative severity of the lesions, the gender of animals and the size of the herd had no effect on the presence of *M. avium* in the lymph nodes examined. Criteria which are reliable in screening, seem to be the number of lesions and the

percentage of the cross-sectional area of pig lymph nodes affected by tuberculosis-like lesions. Evaluation of these characteristics should select material for bacteriological and molecular microbiological tests with a high probability of *Mycobacteria* spp. presence.

Keywords: antimicrobial resistance, bacterial polymorphism, *Mycobacterium avium*, “One Health” concept, porcine lymph nodes, post-slaughter examination, pyogenic bacteria, purulent or tubercular lesions

Spis treści

Streszczenie	7
Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	15
1. Wstęp	17
2. Cele pracy	23
3. Materiał i metody	25
3.1. Różnorodność genetyczna i oporność na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne patogenów ropotwórczych izolowanych z węzłów chłonnych świń	25
3.1.1. Izolacja i identyfikacja bakterii	25
3.1.2. Izolacja DNA.....	26
3.1.3. Badanie wrażliwości na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne	26
3.1.4. Wykrywanie wybranych genów oporności na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne	27
3.1.5. Ocena zróżnicowania genetycznego z wykorzystaniem elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE).....	28
3.1.5.1. Analiza szczepów <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.1.5.2. Analiza szczepów <i>Streptococcus</i> spp.	28
3.1.5.3. Analiza szczepów <i>Rhodococcus equi</i>	29
3.2. Przewidywanie obecności <i>Mycobacterium avium</i> w węzłach chłonnych świń na podstawie liczby, powierzchni (nasilenie ilościowe zmian) oraz rodzaju zmian (nasilenie jakościowe zmian) stwierdzanych podczas badania poubojowego	30
3.2.1. Klasyfikacja zmian i badanie histopatologiczne	30
3.2.2. Izolacja prątków	31
3.2.3. Izolacja DNA.....	31
3.2.4. Genotypowanie izolatów prątków	31
3.2.5. Analiza statystyczna	32
3.3. <i>Mycobacterium avium</i> complex – niedoceniane zagrożenie dla ludzi i zwierząt.....	33
4. Wyniki	35

4.1. Różnorodność genetyczna i oporność na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne patogenów ropotwórczych wyizolowanych z węzłów chłonnych świń	35
4.1.1. Izolaty bakteryjne	35
4.1.2. Fenotypy i genotypy oporności na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne	35
4.1.2.1. Badanie lekowrażliwości <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.1.2.2. Badanie lekowrażliwości <i>Streptococcus</i> spp.	36
4.1.2.3. Badanie lekowrażliwości <i>Rhodococcus equi</i>	37
4.1.3. Pokrewieństwo filogenetyczne badanych szczepów	37
4.1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.1.3.2. <i>Streptococcus</i> spp.	37
4.1.3.3. <i>Rhodococcus equi</i>	38
4.2. Przewidywanie obecności <i>Mycobacterium avium</i> w węzłach chłonnych świń na podstawie liczby i wielkości oraz rodzaju zmian stwierdzanych podczas badania poubojowego	39
4.2.1. Klasyfikacja zmian anatomopatologicznych i histopatologia	39
4.2.2. Izolacja prątków	39
4.2.3. Genotypowanie izolatów prątków	39
4.2.4. Analiza statystyczna	40
5. Dyskusja	43
6. Wnioski	53
7. Bibliografia	55
8. Załączniki	69

Wykaz skrótów

- AIC** (ang. *Akaike Information Criterion*) - kryterium informacyjne Akaiego
- ATS/IDSA** (ang. *The American Thoracic Society and the Infectious Diseases Society of America*) - Amerykańskie Towarzystwo Chorób Klatki Piersiowej i Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych
- AMC** amoksycylina z kwasem klawulanowym
- AUC** (ang. *Area Under ROC Curve*) - obszar pod krzywą ROC
- CAB** (ang. *Columbia Agar Blood*) - podłoże Columbia Agar z dodatkiem krwi
- CA-SFM** (fr. *Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*) - Francuskie Towarzystwo Mikrobiologiczne
- CAMP** - akronim od „Christie-Atkins-Munch-Peterson”, test służący do identyfikacji m.in. paciorkowców β -hemolizujących, na podstawie tworzenia przez nie czynnika CAMP
- CIP** ciprofloksacyna
- CLSI** (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) - Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych
- CTX** cefotaksym
- DOX** doksyCYklina
- ERY** erytromycyna
- FAO** (ang. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) - Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa
- GEN** gentamycyna
- HGT** (ang. *Horizontal Gene Transfer*) - horyzontalny transfer genów
- LAI** (ang. *Liposomal Amikacin for Inhalation*) - liposomalna amikacyna do inhalacji
- LSD** (ang. *Last Significant Differences*) - najmniejsza istotna różnica
- MAA** *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

MAC *Mycobacterium avium* complex

MAH *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

MAI *Mycobacterium avium* subsp. *intracellulare*

MAP *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAS *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*

MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) - minimalne stężenie hamujące

MOTT (ang. *Mycobacteria other than tuberculosis*) - prątki inne niż gruźlicze

MTC *Mycobacterium tuberculosis* complex

NTM (ang. *Nontuberculous Mycobacteria*) - prątki niegruźlicze

PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy

PEN penicylina

PFGE (ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) - elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym

ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) - ocena jakości klasyfikatora

SXT trimetoprim – sulfametoksazol

TAE (ang. *Tris-acetate-EDTA*) - bufor zawierający w swoim składzie Tris, kwas octowy oraz EDTA

TBE (ang. *Tris-borate-EDTA*) - bufor zawierający w swoim składzie Tris, kwas borowy oraz EDTA

TSB (ang. *tryptose-soy bouillon*) - bulion tryptozowo-sojowy

UPGMA (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*) - metoda nieważona grupowania parami ze średnią arytmetyczną

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. Kaczmarkowska A, Kwiecień E, Didkowska A, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. 2023. The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes. *Antibiotics*, 12(6), 1026.
DOI: /doi.org/10.3390/antibiotics12061026
(IF₂₀₂₃ = 5,22; MEiN₂₀₂₃ = 70 pkt.)
2. Kaczmarkowska A, Didkowska A, Brzezińska S, Klich D, Kwiecień E, Dolka I, Kociuba P, Rzewuska M, Augustynowicz-Kopeć E, Anusz K. 2022. Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? *PloSone*, 17(7), e0269912.
DOI: /doi.org/10.1371/journal.pone.0269912
(IF₂₀₂₂ = 3,7; MEiN₂₀₂₁ = 100 pkt.)
3. Kaczmarkowska A, Didkowska A, Kwiecień E, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. 2022. The *Mycobacterium avium* complex - an underestimated threat to humans and animals. *Ann Agric Environ Med*. 29(1), 22–27.
DOI: /doi.org/10.26444/aaem/136398
(IF₂₀₂₂ = 1,7; MEiN₂₀₂₂ = 100 pkt.)

Łączna punktacja publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

Łączny współczynnik wpływu (IF) według Journal Citation Reports: **10,62**

Suma punktów MEiN wg wykazu czasopism punktowanych przez Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEiN): **270 pkt.**

1. Wstęp

Według Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations), najczęściej spożywanym mięsem na świecie jest wieprzowina (<https://ask.usda.gov/s/article/What-is-the-most-consumed-meat-in-the-world>). W związku z tym niezwykle ważne jest zapewnienie jej najwyższej jakości mikrobiologicznej. Zmiany w węzłach chłonnych głowy, narządów klatki piersiowej oraz jamy brzusznej świń są częstą przyczyną uznawania mięsa wieprzowego za niezdatne do spożycia. Należy to podkreślić przede wszystkim przez wzgląd na ochronę zdrowia publicznego, z uwzględnieniem jako konsekwencji także znacznych strat ekonomicznych (Martin – Hernando i in., 2007, Martínez i in., 2007, Lara i in., 2011, Di Marco i in., 2012, Cardoso-Toset i in., 2015). Tym niemniej, obecne przepisy Unii Europejskiej odnoszące się do procedur badań poubojowych zwierząt rzeźnych zalecają oględziny węzłów chłonnych bez ich nacinania (Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/627), co zdecydowanie ogranicza możliwość identyfikacji potencjalnych zmian patologicznych. Trzystopniowe badanie poubojowe (oglądanie, omacywanie, nacinanie) zwiększa szansę na identyfikację zmian w węzłach chłonnych. Badanie opierające się tylko na ocenie wizualnej węzłów chłonnych, bez nacinania, wiąże się z ryzykiem przeoczenia zmian patologicznych, przez co takie mięso może zostać włączone do łańcucha pokarmowego człowieka.

Podczas badań poubojowych można zaobserwować zmiany w różnych narządach, w tym ropne zmiany w węzłach chłonnych. W przypadku trzody chlewnej zmiany w węzłach chłonnych mogą być wywoływane przez różne patogeny, które często wykazują potencjał zoonotyczny. Do najczęściej izolowanych bakterii z takich zmian należą: *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Rhodococcus equi* (synonim *Prescottella equi*) (*R. equi*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) i różne gatunki rodzaju *Streptococcus* (Kawata i in., 2003, Komijn i in., 2007, Cardoso-Toset i in., 2015, Kaczmarkowska i in., 2022). Co więcej, powszechne stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych przyczyniło się do selekcji szczepów bakteryjnych opornych na ich działanie. Bakterie odporne na środki przeciwdrobnoustrojowe są obecnie często izolowane od większości gatunków zwierząt hodowlanych. Oporność w coraz większym stopniu zagraża skuteczności leków, także tym stosowanym u ludzi (Monger i in., 2021). W kontrolowaniu powyższego zagrożenia podstawową rolę odgrywa określanie wartości

minimalnego stężenia hamującego chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych (ang. MIC – minimum inhibitory concentration), a także wykrywanie genów oporności na chemioterapeutyki w szczepach bakteryjnych.

Gram-dodatnie bakterie z rodzaju *Streptococcus* często przyczyniają się do powstawania zmian ropnych u ludzi i zwierząt, w tym u trzody chlewnej (Cardoso-Toset i in., 2020). *S. dysgalactiae* jest częścią fizjologicznej mikrobioty świń, ale u prosiąt uważany jest za jeden z ważniejszych patogenów (Gottschalk i in., 2012, Oh i in., 2020). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, który jest patogenem ropotwórczym należącym do grup Lancefield A, C, G i L, jest coraz częściej izolowany z ciężkich przypadków zakażeń u ludzi na całym świecie (Brandt i in., 2009, Oh i in., 2020). Bakteria ta może powodować zakażenia, objawiające się: ropniami skóry, zapaleniem tkanki łącznej, zapaleniem gardła, zapaleniem stawów, bakteriecią, zapaleniem wsierdza czy powodować wystąpienie zespołu wstrząsu toksycznego (Brandt i in., 2009, Oh i in., 2020). Z kolei beta-hemolityczny gatunek *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, został w 2019 r. zidentyfikowany jako patogen świń, który odpowiada za nagłe zgony, poronienia i posocznice (Costa i in., 2022), natomiast u ludzi bakterie te najczęściej powodują zakażenia u osób z obniżoną odpornością (Salasia i in., 2004, Baracco i in., 2019, Kim i in., 2022).

Ropne zakażenia u zwierząt gospodarskich, w tym świń, mogą być także wywoływane przez *R. equi*, który jest szeroko rozpowszechniony w środowisku. Ten tlenowy, Gram-dodatni, oportunistyczny patogen wewnątrzkomórkowy został po raz pierwszy wyizolowany w 1923 roku od źrebiąt z zapaleniem płuc. Co istotne *R. equi* jest wymieniany jako jeden z najważniejszych gatunków bakterii izolowanych z węzłów chłonnych świń (Lara in., 2011). Należy zauważyć także, że w ostatnich latach wzrasta ilość diagnozowanych zakażeń wywołanych przez *R. equi* u osób z obniżoną odpornością, w tym u pacjentów po przeszczepach narządów (Lin i in., 2019, Suzuki i in., 2021).

Innym drobnoustrojem, który powoduje zakażenia ludzi i zwierząt na całym świecie, jest *S. aureus*. Ten Gram-dodatni ziarniak jest oportunistycznym patogenem, który może wywoływać szereg chorób, w tym zakażenia skóry i tkanek miękkich, zapalenie wsierdza oraz zespół wstrząsu toksycznego. U zwierząt zakażenia te są często trudne do wyleczenia ze względu na wielolekooporność szczepów *S. aureus* i wiążą się z wysoką zachorowalnością, śmiertelnością oraz znacznymi stratami ekonomicznymi (Samutela i in., 2021).

Potwierdzenie obecności wielu rodzajów patogenów ropotwórczych, np. *S. aureus* czy *S. dysgalactiae*, w wieprzowinie sprzedawanej detalicznie, budzi obawy, ponieważ niesie za sobą zagrożenie dla konsumentów (Cardoso – Toset i in., 2017, Tang i in., 2017, Tegegne i in., 2021). Skuteczność kontroli zakażeń u zwierząt rzeźnych podczas uboju, poza badaniem sanitarno-weterynaryjnym, warunkują także badania mikrobiologiczne oraz badania pozwalające określić charakterystykę molekularną wyizolowanych szczepów bakteryjnych. Elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis) jest jedną z najlepszych metod, wykorzystywaną do badania różnorodności genetycznej izolatów, pochodzących z różnych próbek klinicznych (Arbeit i in., 1995, Vela i in., 2003).

Inną bakterią mogącą powodować zmiany w węzłach chłonnych świń jest *Mycobacterium avium*. MAC tworzą występujące na całym świecie atypowe prątki o potencjale zoonotycznym, przenoszone głównie przez zwierzęta gospodarskie i ptaki. Są to Gram-dodatnie pałeczki kwasooporne zdolne do przetrwania w fagolizosomach gospodarza. Rodzaj *Mycobacterium* wykazuje hydrofobowość, powolny wzrost, oporność na środki do dezynfekcji i antybiotyki, co przypisuje się obecności bogatej w lipidy ścianie komórkowej, wzbogaconej długołańcuchowymi kwasami mykolowymi (Falkinham i in., 2009). Do tej pory zidentyfikowano ponad 180 gatunków prątków (Kwon i in., 2019). Rodzaj *Mycobacterium* obejmuje *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), *M. leprae* i prątki niegruźlicze (NTM) (ang. Nontuberculous *Mycobacteria*) inaczej atypowe (Rindi i in., 2014), w tym prątki z MAC, szeroko rozpowszechnione w środowisku. Historycznie MAC składał się z dwóch gatunków: *M. avium* i *M. intracellulare*. Podział ten opierał się na zdolności wywołania choroby u ptaków, przy czym *M. avium* był dla nich patogenny, natomiast *M. intracellulare* nie wykazywał patogenności. W 2018 r. zaproponowano nowy podział taksonomiczny tego kompleksu, obejmujący gatunki: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. bouchedurhonense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. ituriense*, *M. lepraemurium*, *M. marseillense*, *M. paraintracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. timonense*, *M. lukis* i *M. yongonense* (van Ingen i in. 2018).

Za najważniejsze klinicznie podgatunki *M. avium* uważa się *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS) oraz *Mycobacterium avium* subsp. *intracellulare* (MAI). Spośród nich MAH, wszechobecny saprofit środowiskowy, powoduje u trzody chlewnej przewlekłą chorobę płuc, a także jest czynnikiem etiologicznym zapalenia węzłów chłonnych.

Zakażenie MAH u świń ma zwykle przebieg subkliniczny, niemniej jednak stanowi ono duży problem ekonomiczny, bowiem tusze z uogólnionymi zmianami w węzłach chłonnych uznawane są za niezdatne do spożycia przez ludzi i zwierzęta. Zmiany patologiczne są zazwyczaj zlokalizowane w krezkowych lub podżuchwowych węzłach chłonnych (Agdestein i in., 2014). Warto zauważyć, że u świń MAH jest najczęściej izolowanym patogenem wśród prątków, podczas gdy MAA jest rzadko wykrywany.

Tusze wieprzowe są poddawane badaniu poubojowemu, podczas którego należy zwrócić uwagę na obecność zmian mogących sugerować zakażenie prątkami. Podczas badania poubojowego zmiany gruźliczopodobne związane z zakażeniami prątkami MAC obserwuje się w narządach limfatycznych, najczęściej w krezkowych węzłach chłonnych, a rzadziej w węzłach chłonnych podżuchwowych, kępkach Peyera lub migdałkach (Torriani i in., 1994, Hibiya i in., 2008, Hibiya i in. 2010, Hulinova Stromerova i in., 2018). Prawdopodobnie bardzo często zmiany te pozostają nierozpoznane (Agdestein i in., 2014). Wykazano, że prątki MAC mogą występować także w węzłach chłonnych, które nie wykazują widocznych zmian podczas badania poubojowego. Bardzo pomocne w tym kontekście jest stosowanie do oceny ryzyka związanego z żywnością metod molekularnych (Kriz i in., 2014).

Przypadki zakażenia MAH opisano również u innych ssaków, w tym psów, kotów, bydła, kóz, królików domowych, jeleniowatych i koni (Madarame i in., 2017, Klotz i in., 2018, Scherrer i in., 2019, Kinoshita i in., 2020). MAA i MAS są najczęściej izolowane od ptaków, u których objawy i przebieg choroby przypominają gruźlicę (Nishiuchi i in., 2017). Natomiast MAP jest odpowiedzialny za chorobę Johnego, która dotyka głównie przeżuwacze, z kolei *M. chimaera* została wyizolowana od ludzi, pacjentów po operacji zastawek serca, gdzie spowodowała infekcje pooperacyjne, w tym zapalenie wsierdzia przebiegające z wysokim wskaźnikiem śmiertelności (Kohler i in., 2015).

Prątki z MAC są również określane jako MOTT (ang. Mycobacteria other than tuberculosis) - prątki inne niż wywołujące gruźlicę lub NTM (ang. Nontuberculous Mycobacteria) – prątki niegruźlicze lub atypowe. Choroby wywołane przez niegruźlicze prątki stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, zwłaszcza w krajach rozwiniętych (Choi i in., 2018). Szybki wzrost liczby zakażeń wywołanych przez prątki z MAC na całym świecie jest związany z rosnącą liczbą pacjentów z obniżoną odpornością (Ratnatunga i in., 2020). Ponadto ludzie i zwierzęta są narażeni na ciągły wzrost liczby środowiskowych źródeł zakażeń prątkami (Nishiuchi i in., 2017). Przeprowadzone badania potwierdziły obecność

żywych bakterii i DNA prątków w komercyjnie dostępnych produktach spożywczych, takich jak surowa wieprzowina, mleko, fermentowane produkty mięsne typu salami czy pieczone mięso (Klanicova i in., 2011). Dzięki oporności na niekorzystne warunki, prątki mogą przetrwać niektóre procedury dezynfekcji stosowane w produkcji żywności, a także obróbkę termiczną. Tak więc żywność pochodzenia zwierzęcego może być źródłem prątków mogących potencjalnie przenosić się na ludzi (Klanicova i in., 2011, Sevilla i in., 2017, Gerrard i in., 2018).

Kontakt ludzkiej skóry z prątkami z MAC, spożycie zanieczyszczonej nimi żywności, a także wdychanie skażonych aerozoli, może skutkować zapaleniem węzłów chłonnych, zakażeniami płuc, skóry i tkanek miękkich. Pacjenci immunokompetentni najczęściej cierpią z powodu miejscowych zakażeń, takich jak zapalenie węzłów chłonnych szyjnych, podczas gdy u osób z niedoborem odporności prątki MAC powodują rozsiane zakażenia płuc (Kaevska i in., 2011, Despierres i in., 2012, Mukherjee i in., 2012).

Jak wspomniano zakażenia prątkami z MAC u ludzi stają się coraz większym problemem, dlatego należy zwrócić szczególną uwagę na zapobieganie ich rozprzestrzenianiu się (Hulinova Stromerova i in., 2018). Stwierdzono, duże podobieństwo pomiędzy izolatami *M. avium* pochodzącymi od ludzi a izolatami pochodzącymi od świń, co sugeruje istnienie powiązań epidemiologicznych między zakażeniami u świń i zakażeniami u ludzi lub istnieniu wspólnych źródeł zakażenia dla obu gatunków (Hiller i in., 2013). Świnie zwykle zakażają się ze źródeł w środowisku zewnętrznym, takich jak ściółka, pasza, woda lub gleba, które zostały zanieczyszczone odchodami dzikich ptaków lub małych ssaków lądowych (Slany i in., 2016), a do zakażenia dochodzi zwykle drogą pokarmową (Komatsu i in., 2017, Hulinova Stromerova i in., 2018).

Najczęściej wybieranymi chemioterapeutykami przeciwdrobnoustrojowymi do leczenia chorób wywoływanych przez bakterie z MAC u ludzi i zwierząt są antybiotyki makrolidowe, takie jak klarytromycyna czy azytromycyna (Moon i in., 2016, Fukushima i in., 2021, Busatto i in., 2019). American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA) w 2007 r. rekomendowała, aby leczenie opierało się na antybiotykach makrolidowych w połączeniu z ryfampicyną i etambutolem. Dodatkowo zalecają stosowanie streptomycyny lub pozajelitowo amikacyny (Kwon i in., 2019). Alternatywnie sugeruje się podawanie bedakiliny, która wykazała wysoką skuteczność przeciwko *M. avium*, oraz liposomalnej amikacyny do inhalacji (LAI) (Chin i in., 2020). U ludzi i zwierząt leczenie

choroby wywołanej przez prątki z MAC wymaga długotrwałej antybiotykoterapii, kontynuowanej przez co najmniej 12 miesięcy po otrzymaniu ujemnych wyników posiewów. Wielokrotnie, po pomyślnie zakończonej terapii następuje reinfekcja (od 32% do 48% przypadków) (Nishiuchi i in., 2017).

Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/627 z dnia 15 marca 2019 roku ustanawiające jednolite praktyczne rozwiązania dotyczące prowadzenia kontroli urzędowych produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 oraz zmieniające rozporządzenie Komisji (WE) nr 2074/2005 w odniesieniu do kontroli urzędowych, w przypadkach stwierdzania przez urzędowych lekarzy weterynarii prowadzących badania poubojowe świń oznak ewentualnego ryzyka dla ludzi i zwierząt lub dobrostanu zwierząt, wskazanych zgodnie z art. 24, nakłada na nich obowiązek rozszerzania na podstawie własnej opinii generalnie rekomendowanego badania wizualnego (unikanie zanieczyszczeń krzyżowych) o badanie dotykowe i nacinanie. W takiej sytuacji istnieje potrzeba formułowania naukowych przesłanek uzasadniających wdrażanie rozszerzonej procedury badania poubojowego świń. Przeprowadzone badania wniosły w tym zakresie wartościowe obserwacje i wnioski.

2. Cele pracy

1. Ocena występowania oraz zróżnicowania genetycznego potencjalnie zoonotycznych szczepów ropotwórczych *Streptococcus* spp., *R. equi* i *S. aureus* wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian, w związku z ewentualną decyzją urzędowego lekarza weterynarii o podjęciu, poza rekomendowanym badaniem wizualnym, dodatkowej procedury badania poubojowego, rozszerzonej o badanie dotykowe i nacinanie.
2. Określenie dla potencjalnie zoonotycznych szczepów ropotwórczych *Streptococcus* spp., *R. equi* i *S. aureus*, wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian, wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) wybranych chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych w kontekście wykrywania determinant genetycznych lekooporności.
3. W związku z wzrastającym zagrożeniem zakażeniami prątkami z MAC u ludzi i zwierząt, ustalenie, czy można przewidzieć występowanie *M. avium* w węzłach chłonnych świń na podstawie rodzaju i wielkości stwierdzonych w nich zmian, a także czy na prawdopodobieństwo obecności *M. avium* w węzłach chłonnych świń wpływa płeć zwierząt oraz wielkość stada.

3. Materiał i metody

3.1. Różnorodność genetyczna i oporność na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne patogenów ropotwórczych izolowanych z węzłów chłonnych świń

Podczas badania poubojowego w rzeźniach, pobrano węzły chłonne podżuchwowe od 199 świń (99 samców i 100 samic). W dwóch przypadkach pobrano dwie próbki od jednej świni, natomiast w jednym przypadku pobrano dodatkowo siedem próbek od jednej świni, ponieważ w tuszy stwierdzono uogólnione zmiany chorobowe (pobrano węzły chłonne: tchawiczo - oskrzelowe, śródpiersiowe, pachowe pierwszego żebra, kręzkowe i wnęki wątroby oraz próbki płuc i wątroby). Węzły chłonne oraz narządy ze zmianami ropnymi (n = 95) oraz losowo wybrane niezmiennione węzły chłonne podżuchwowe (n = 113) zbadano w kierunku obecności wybranych bakterii ropotwórczych (*Streptococcus* spp., *R. equi*, *S. aureus*). Materiał do badań został pobrany w dwóch rzeźniach na terenie województwa wielkopolskiego, natomiast zwierzęta pochodziły z 83 ferm zlokalizowanych w centralnej Polsce, o średniej liczbie 117 osobników w stadzie. Średni wiek świń wynosił 6,4 miesiąca. Do czasu analizy, pobrany materiał przechowywano w temperaturze -20°C.

3.1.1. Izolacja i identyfikacja bakterii

Po rozmrożeniu, tkanki rozdrabniano sterylnymi nożyczkami i umieszczano w workach z membraną filtrującą BagPack (BagPage®100). Następnie dodawano sterylny roztwór soli fizjologicznej i homogenizowano za pomocą stomachera przez trzy minuty przy 12 uderzeniach na 1 s. Powstałą zawiesinę przenoszono do probówek o pojemności 15 ml i odwirowywano z prędkością 1500×g. Powstały supernatant odrzucano, a do dalszej analizy wykorzystywano uzyskany osad.

Po homogenizacji, osad przenoszono przy użyciu sterylnych wacików na podłoże Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi owczej (CAB) (Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska). Posiewy inkubowano przez 48 h w 37°C w warunkach mikroaerofilnych (5-10% CO₂). Bakterie identyfikowano w oparciu o: cechy wzrostu, w tym rodzaj hemolizy na CAB; morfologię komórek – wykonano barwienie metodą Grama; oraz aktywność katalazy. Ponadto, w celu identyfikacji *R. equi* przeprowadzono test CAMP ze szczepem referencyjnym *S. aureus* ATCC®25923. Wynik testu CAMP odczytywano po 48 godzinach inkubacji w 37°C w warunkach tlenowych. W celu identyfikacji izolatów *S. aureus* wykonano test aglutynacji lateksowej Microgen®Staph (Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska). Dodatkowo,

identyfikacja izolatów *S. aureus* została potwierdzona przy użyciu techniki PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) (Sasaki i in., 2010). Izolaty *Streptococcus* spp. zidentyfikowano na poziomie gatunku na podstawie testu PCR z użyciem starterów Sdy519 i Sdy920 zaprojektowanych dla wysoce zróżnicowanego i specyficznego dla gatunku regionu genu kodującego 16S rRNA *S. dysgalactiae* (Riffon i in., 2001) lub testu PCR z zestawami starterów SodA-F i SodA-R dla genu *sodA* *S. equi* (Alber i in., 2004). Różnicowanie *S. equi* subsp. *zooepidemicus* i *S. equi* subsp. *equi* przeprowadzono poprzez wykrycie genu *seel* kodującego superantygenową toksynę *S. equi* subsp. *equi*, jak opisano przez Alber i in. (2004). Dodatkowo do serotypowania izolatów paciorkowców wykorzystano test aglutynacji lateksowej Microgen®Strep (Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska). Wszystkie badane izolaty przechowywano w temperaturze -20°C w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB) zawierającym 20% glicerolu.

3.1.2. Izolacja DNA

Do izolacji DNA badanych szczepów zastosowano metodę termiczną. Kolonie bakteryjne wyhodowane na CAB zawieszano w 500 µl wody wolnej od nukleaz. Zawiesinę ogrzewano przez 10 minut w temperaturze 99°C, po czym schładzano na lodzie i odwirowywano (6 minut, 8000×g). Zebrany supernatant zawierający DNA, przechowywano w temperaturze -20°C i wykorzystano jako matrycę w reakcji PCR.

3.1.3. Badanie wrażliwości na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne

Wartości MIC dla ośmiu chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych: amoksycylina z kwasem klawulanowym (AMC; 0,016-256 µg/ml), penicylina (PEN; 0,002-32 µg/ml), cefotaksym (CTX; 0,002-32 µg/ml), erytromycyna (ERY; 0,016-256 µg/ml), doksycyklina (DOX; 0,016-256 µg/ml), gentamycyna (GEN; 0,016-256 µg/ml), ciprofloksacyna (CIP; 0,002-32 µg/ml) i trimetoprim-sulfametoksazol (SXT; 0,002-32 µg/ml), określano stosując metodę dyfuzji paskowej z użyciem pasków testowych Liofilchem®MIC (Liofilchem, Via Scozia, Włochy) nasączonych antybiotykiem w gradiencie stężeń. Zawiesinę bakterii w jałowym roztworze soli fizjologicznej (gęstość 0,5 w skali McFarlanda) zaszczepiano na podłożu Mueller-Hinton Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska). Na tak przygotowanym podłożu umieszczano paski z antybiotykami. Płytkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Warunki testowe dla badanych gatunków bakterii zastosowane w badaniu były zgodne z wytycznymi CLSI (ang. Clinical Laboratory Standards Institute) (CLSI VET08, 2018). Wartość MIC

odczytywano w punkcie, w którym krawędź elipsy zahamowania wzrostu przecinała pasek. Ponadto dla każdego chemioterapeutyku przeciwbakteryjnego określono wartości MIC₅₀ (stężenie antybiotyku wymagane do zahamowania wzrostu 50% izolatów) i MIC₉₀ (stężenie antybiotyku wymagane do zahamowania wzrostu 90% izolatów). Trzy szczepy referencyjne, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC®12394, *S. aureus* ATCC®25923 i *R. equi* ATCC®6939, zostały włączone do badania. Punkty graniczne MIC zastosowane w tym badaniu przedstawiono w Tabeli 2 – publikacja nr 1. W przypadku *Streptococcus* spp. wartości graniczne MIC dla PEN, CIP (jak dla enrofloksacyny), ERY, DOX (jak dla tetracykliny), GEN i SXT oparto na kryteriach zalecanych dla *Streptococcus* spp. zgodnie z wytycznymi Komitetu ds. Oznaczania Wrażliwości Drobnoustrojów Francuskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego (CA-SFM) VET2021 (CA – SFM, 2021). W przypadku CTX przyjęto kryterium dla cefpodoksymu dla *Streptococcus canis* zgodnie z wytycznymi CLSI VET08 (CLSI VET08, 2018). Kryterium dla AMC dla izolatów *Streptococcus* spp. pochodzących od świń, zostało zaadoptowane z CLSI VET08 (CLSI VET08, 2018) dla szczepów wyizolowanych od kotów. W przypadku *S. aureus* wykorzystano w interpretacji kryteria dla PEN, CIP (dla enrofloksacyny), ERY, DOX (dla tetracykliny), GEN i SXT określone dla *Staphylococcus* spp. w wytycznych CA-FSM VET2021 (CA – SFM, 2021). Punkt odcięcia MIC dla CTX był taki sam jak dla cefpodoksymu w dokumencie CLSI VET08 dla *S. aureus* i *Staphylococcus pseudintermedius* w przypadku psów, a AMC został również zaadaptowany z tych samych wytycznych jako kryteria kategoryzacji *Streptococcus* spp. izolatów psów (CLSI VET08, 2018). W przypadku *R. equi*, ERY i DOX zostały zinterpretowane zgodnie z kryteriami przyjętymi dla *R. equi* w dokumencie CLSI VET06 (CLSI VET06, 2017), podczas gdy wartości uzyskane dla innych chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych zostały odniesione do wartości *Staphylococcus* spp. zgodnie z wytycznymi CA-FSM VET2021 i CLSI VET08 (CA – SFM, 2021, CLSI VET08, 2018).

3.1.4. Wykrywanie wybranych genów oporności na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne

Występowanie genów związanych z opornością na erytromycynę (*ermA* i *ermB*) i tetracykliny (*tetK/L*, *tetM* i *tetO*) oceniano dla szczepów paciorkowców przy użyciu metody PCR. Sekwencje wykorzystanych starterów oraz szczegółowe warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 3 – publikacja nr 1. W pierwszej kolejności zastosowano uniwersalne startery wykrywające geny oporności na tetracykliny, kodujące białka chroniące rybosom. Następnie, w przypadku izolatów, u których uzyskano wynik pozytywny w tej reakcji, zastosowano specyficzne startery dla genów *tetM* i *tetO*. Wszystkie mieszaniny reakcyjne PCR zawierały

1 µl każdego startera (10 pmol/µl), 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 40 ng matrycy DNA i wodę wolną od nukleaz do końcowej objętości 25 µl. Produkty reakcji były rozdzielane elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym w buforze Tris-Acetate-EDTA (TAE) z Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics, Düren, Niemcy), a następnie wizualizowane i analizowane przy użyciu Gel Doc™ EZ Imaging System z oprogramowaniem Image Lab Software (wersja 5.2.1) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.1.5. Ocena zróżnicowania genetycznego z wykorzystaniem elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)

3.1.5.1. Analiza szczepów *Staphylococcus aureus*

Procedura PFGE została zaadaptowana z wcześniejszych badań (Hennekinne i in., 2003, Szaluś – Jordanow i in., 2013), z pewnymi modyfikacjami. Szczepy *S. aureus* zebrane z 24-godzinnej hodowli na CAB zawieszano w jałowym roztworze soli fizjologicznej, aby uzyskać gęstość 3,5 w skali McFarlanda. Tak przygotowaną zawiesinę bakterii mieszano w równej objętości z 2% agarozą CleanCut (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Uzyskane krążki agarozowe inkubowano przez 18 h w 37°C w roztworze lizującym zawierającym: 2 mg/ml lizozymu (Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, Badenia-Wirtembergia, Niemcy), 5 µg/ml RNazy (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) i 50 µg/ml lizostafiny (A&A, Gdańsk, Biotechnology). Po czasie inkubacji krążki przenoszono do roztworu z 1 mg/ml proteiny K (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) i inkubowano przez 24 h w 50°C. Krążki agarozowe trawiono *SmaI* (20 U/µl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) przez noc w 25°C. Fragmenty restrykcyjne rozdzielano w 1,2% żelu agarozowym. Program rozdziału obejmował: całkowity czas rozdziału 20 h, temperatura 14°C, gradient napięcia 6 V/cm, początkowy czas impulsu 5 s i końcowy czas impulsu 30 s. W badaniu wykorzystano również szczep referencyjny *S. aureus* ATCC®25923.

3.1.5.2. Analiza szczepów *Streptococcus* spp.

Analizę PFGE przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Vela i in. (2003) (Vela i in., 2003), z pewnymi zmianami. Całonocne hodowle szczepów *Streptococcus* spp. na CAB zawieszono w jałowym roztworze soli fizjologicznej, aby uzyskać gęstość 4 w skali McFarlanda. Równą objętość zawiesiny bakteryjnej i 2% agarozę CleanCut (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) zmieszano w celu przygotowania krążków agarozowych. Krążki agarozowe inkubowano przez noc w 37°C z 1 mg/ml lizozymu (Sigma-Aldrich, Steinheim am

Albuch, Badenia-Wirtembergia, Niemcy), a następnie inkubowano przez kolejne 24 godziny w 50°C z 500 µg/ml proteinazy K (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Aby przeprowadzić trawienie restrykcyjne, przygotowano roztwór z 20 U/µl *SmaI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i inkubowano przez noc w 25°C. Do elektroforezy użyto 1,1% żelu agarozowego. Parametry rozdziału obejmowały: czas rozdziału 21 h, temperatura 14°C, gradient napięcia 6 V/cm, początkowy czas impulsu 1 s i końcowy czas impulsu 30 s. W badaniu wykorzystano również szczep referencyjny *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC®12394.

3.1.5.3. Analiza szczepów *Rhodococcus equi*

Analizę PFGE przeprowadzono zgodnie z wcześniejszym protokołem (Cohen i in., 2003, Witkowski i in., 2015), z niewielkimi modyfikacjami. Całonocne hodowle *R. equi* w bulionie mózgowo-sercowym (BHI) z dodatkiem 1% glicerolu, 0,4% glukozy i 0,2% TWEEN®85 dostosowano do OD₆₀₀ = 0,65, a komórki umieszczono w 1,5% krążkach agarozowych przy użyciu agarozы o niskiej temperaturze topnienia Top Vision (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Po 18-godzinnej lizie w 37°C, z użyciem 20 mg/ml lizozymu (Sigma-Aldrich, Niemcy) i 50 µg/ml RNazy (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), krążki inkubowano przez noc z 20 mg/ml proteinazy K (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) w 50°C. Następnie krążki agarozowe trawiono 10 U/µl *VspI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) przez noc w 37°C. Do elektroforezy użyto 1,1% żelu agarozowego. Parametry rozdziału obejmowały: całkowity czas rozdziału 22 h, temperatura 14°C i gradient napięcia 6 V/cm, przy czym program rozdziału był dwuetapowy: podczas pierwszego przebiegu (7 h) zastosowano początkowy czas impulsu 6 s i końcowy czas impulsu 15 s; podczas drugiego przebiegu (15 h) zastosowano początkowy czas impulsu 23 s i końcowy czas impulsu 40 s. W badaniu wykorzystano również szczep referencyjny, *R. equi* ATCC®6939.

Fragmety restrykcyjne wszystkich badanych szczepów rozdzielono przy użyciu systemu CHEF-DR II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) w 0,5× buforze Tris-Borate-EDTA (TBE). Żele barwiono bromkiem etydyny przez 15 minut, odbarwiano w wodzie destylowanej, wizualizowano za pomocą systemu obrazowania Gel Doc™ EZ z oprogramowaniem Image Lab (wersja 5.2.1) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Do analizy wyników PFGE wykorzystano oprogramowanie BioNumerics w wersji 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgia). Analizę skupień przeprowadzono metodą nieważonych grup par ze średnią arytmetyczną (UPGMA – ang. unweighted pair group method with arithmetic mean) przy użyciu

współczynnika podobieństwa Dice z optymalizacją i tolerancją pozycji ustawioną na 1%. Szczepy zostały pogrupowane przy użyciu 80% granicy homologii, powyżej której zostały przypisane do tego samego klastra, ponieważ uznano je za blisko spokrewnione (Tenover i in., 1995).

3.2. Przewidywanie obecności *Mycobacterium avium* w węzłach chłonnych świń na podstawie liczby, powierzchni (nasilenie ilościowe zmian) oraz rodzaju zmian (nasilenie jakościowe zmian) stwierdzanych podczas badania poubojowego

Łącznie 10 600 tusz świń poddano badaniu poubojowemu, które obejmowało nacięcie podżuchwowych i krezkowych węzłów chłonnych. U 86 zwierząt stwierdzono zmiany patologiczne w podżuchwowych węzłach chłonnych. Węzły chłonne podżuchwowe ze zmianami (n = 86) i losowo wybrane węzły chłonne podżuchwowe bez zmian (n = 113) zostały następnie zbadane w kierunku obecności *Mycobacterium* spp. Zwierzęta, z tusz których pobrano materiał do badań, były w wieku od 5,5 miesiąca do czterech lat (średni wiek: 6,4 miesiąca). Spośród 199 zwierząt 99 było samcami, a 100 samicami. Zwierzęta pochodziły z 83 ferm zlokalizowanych w centralnej Polsce, o wielkości od 2 do 3480 osobników; średnia wielkość 117 zwierząt w stadzie. Pobrane węzły chłonne podżuchwowe były przechowywane przed analizą w temperaturze -20°C.

3.2.1. Klasyfikacja zmian i badanie histopatologiczne

Zebrane węzły chłonne zostały podzielone na trzy grupy w zależności od rodzaju zmian i trzy grupy w zależności od liczby zmian (nasilenie ilościowe zmian); klasyfikacja została przeprowadzona przez lekarza weterynarii z ośmioletnim doświadczeniem pracy w rzeźni. Węzły chłonne, w których nie znaleziono zmian makroskopowych, zostały przypisane do grupy 0, te z pojedynczymi zmianami wielkości główki szpilki zostały umieszczone w grupie 1 (Rycina 1 - publikacja nr 2), natomiast te z licznymi zmianami wielkości główki szpilki lub zmianami rozsianymi w grupie 2 (Rycina 2 i 3 - publikacja nr 2).

Zebrany materiał został również sklasyfikowany zgodnie z charakterem zmian (nasilenie jakościowe zmian): grupa A - zmiany nieropne (Rycina 1 i 2 - publikacja nr 2), grupa B - zmiany ropne (Rycina 3 - publikacja nr 2), grupa C - bez zmian (brak zmian). Przeprowadzono także badanie fotogrametryczne węzłów chłonnych - zmienioną powierzchnię węzła chłonnego w przekroju mierzono za pomocą analizy obrazu, a następnie wyrażano jako procent całej powierzchni przekroju węzła chłonnego. Fragmenty węzłów chłonnych podżuchwowych o wymiarach około 30 x 30 x 15 mm zostały pobrane do 4% formaliny w celu

przeprowadzenia badania histopatologicznego. Badanie histopatologiczne obejmowało tylko kilka wybranych węzłów chłonnych z widocznymi zmianami, tj. pojedyncze węzły chłonne z grup A, B, 1 i 2, węzły z grup C i 0 nie zostały zbadane. Samo badanie histopatologiczne opierało się na standardowym barwieniu hematoksyliną i eozyną w celu oceny nacieku limfocytarnego oraz barwieniu Kinyoun mającym na celu wykrycie prątków.

3.2.2. Izolacja prątków

Z materiału izolowano prątki kwasooporne zgodnie z zaleceniami Referencyjnego Laboratorium Mikrobiologicznego Państwowego Instytutu Badawczego - Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Materiał wstępnie rozdrabniano sterylnymi nożyczkami i umieszczano w workach z membraną filtrującą (BagPage® 100). Następnie do materiału dodawano 5% roztwór kwasu szczawiowego (POCH, Polska) w celu odkażenia i homogenizowano za pomocą stomachera przez trzy minuty z prędkością 12 uderzeń/sekundę. Powstałą zawiesinę przelewano do probówek, które inkubowano przez 10-15 minut w temperaturze 37°C, a następnie odwirowywano przez 10 minut z prędkością 1500×g. W kolejnym kroku usuwano supernatant i dodawano sterylny 0,9% NaCl do maksymalnej objętości probówki. Probówki wstrząsano i wirowano przez 10 minut z prędkością 1500×g. Czynność tę powtarzano dwukrotnie. Osad (5 µl) wykorzystywano do zaszczepienia podłoży stałych do hodowli prątków: Löwenstein-Jensen (MERCK, Niemcy) i Stonebrink (MERCK, Niemcy). Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 12 tygodni. Pożywki były sprawdzane pod kątem wzrostu kolonii prątków co siedem dni. Brak wzrostu po 12 tygodniach uznawano za wynik ujemny.

3.2.3. Izolacja DNA

Zebrane eżę prątki wyhodowane na podłożu Löwensteina-Jensena lub Stonebrinka zawieszano w 150 µl wody destylowanej, a następnie inkubowano przez 30 minut w bloku grzejmym w temperaturze 95°C. Po inkubacji probówki odwirowywano przez pięć minut z prędkością 15000×g. Supernatant zawierający DNA przenoszono do nowych probówek i wykorzystywano do testów.

3.2.4. Genotypowanie izolatów prątków

Gatunki *Mycobacterium* spp. zostały zidentyfikowane i zróżnicowane przy użyciu komercyjnego testu GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Niemcy). Wyizolowane DNA było selektywnie powielane za pomocą reakcji multipleks PCR (Polymerase Chain Reaction). Powstałe amplikony przenoszono na paski DNA pokryte wysoce specyficznymi

sondami, które były komplementarne do wykrywanych sekwencji DNA specyficznych dla poszczególnych gatunków. Amplikony były wiązane do miejsc komplementarnych, podczas gdy niezwiązane fragmenty były usuwane podczas płukania. Następnie dodawano koniugat – streptawidynę, znakowany fosfatazą alkaliczną, a gatunki prątków identyfikowano na podstawie wzoru hybrydyzacji specyficznych sond umieszczonych na paskach z produktem reakcji multipleksowej PCR. Wynik odczytywano przy użyciu dołączonego przez producenta szablonu.

3.2.5. Analiza statystyczna

Aby zidentyfikować czynniki, które zwiększają prawdopodobieństwo obecności *M. avium* w węzłach chłonnych, zastosowano uogólniony liniowy model binarny. W modelu tym obecność *M. avium* w węzle chłonnym została wykorzystana jako zmienna zależna. Każda próbka, w której potwierdzono obecność *M. avium*, została oznaczona jako 1, podczas gdy te, w których nie potwierdzono obecności *M. avium*, zostały oznaczone jako 0. W analizie uwzględniono następujące zmienne niezależne: 1) jakościowe nasilenie zmian w węzłach chłonnych, 2) ilościowe nasilenie zmian w węzłach chłonnych, 3) płeć świń, 4) wielkość stada. Jakościowe nasilenie zmian podzielono na trzy kategorie: A - zmiany nieropne, B - zmiany ropne, C - brak zmian. Ilościowe nasilenie zmian chorobowych podzielono na trzy kategorie: 0 - bez zmian, 1 - pojedyncze zmiany i 2 - liczne zmiany. Aby znaleźć najlepiej dopasowany model, zbadano wszystkie warianty modelu (tj. zmienne zostały uwzględnione we wszystkich możliwych kombinacjach, w tym w modelu zerowym), a modele porównano za pomocą kryteriów informacyjnych Akaike (AIC – Akaike Information Criterion) zgodnie z Burnham i Anderson (Burnham i in., 2002). Model z najniższą wartością AIC został uznany za najlepiej dopasowany. Gdy różnica AIC była mniejsza niż 2, wybierano prostszy model (tj. z niższym k) zgodnie z zasadą brzytwy Ockhama. Porównanie post hoc częstości występowania *M. avium* w węzłach chłonnych danej kategorii przeprowadzono za pomocą testu najmniejszej istotnej różnicy (LSD – Last Significant Difference).

Przeprowadzono również model regresji logistycznej w celu sprawdzenia, czy obecność *M. avium* w węzłach chłonnych świń można przewidzieć na podstawie analizy wyrażonej jako procent zmienionej powierzchni przekroju węzła chłonnego. W modelu obecność *M. avium* w węzle chłonnym był zmienną zależną, a procent zmienionej powierzchni przekroju węzła chłonnego był zmienną niezależną. Zmienna zależna była podobna do stosowanej w uogólnionym liniowym modelu binarnym.

Procent zmienionej powierzchni przekroju węzła chłonnego obliczano za pomocą oprogramowania AutoCAD 2020. Zdjęcia węzłów chłonnych wykonano aparatem Sony Cyber-shot DSC-W830 ze skalą liniową, która została następnie wykorzystana do przeskalowania obrazów do skali 1:1. Powierzchnie przekrojów węzłów chłonnych i zmian chorobowych oznaczono za pomocą narzędzia splajn. Dla każdego węzła chłonnego obliczono całkowitą powierzchnię przekroju i powierzchnię zajmowaną przez zmiany (w cm²) za pomocą narzędzia Area. Aby sprawdzić, czy procent zmienionej powierzchni przekroju węzłów chłonnych lub ilościowe nasilenie zmian w węzłach chłonnych może lepiej przewidywać obecność *M. avium*, podobny model regresji logistycznej został przeprowadzony na tym samym zestawie obserwacji; ilościowe nasilenie zmian zostało użyte jako zmienna niezależna w obu modelach. Oba modele porównano zgodnie z R², tabelami klasyfikacji i AUC (obszar pod krzywą ROC - Receiver Operating Characteristic).

3.3. *Mycobacterium avium* complex – niedoceniane zagrożenie dla ludzi i zwierząt

Na podstawie baz danych PubMed i Google Scholar przeprowadzono analizę aktualnego stanu wiedzy na temat zakażeń MAC u ludzi i zwierząt, czynników zjadliwości bakterii MAC, potencjalnych źródeł zakażenia, a także postępów w poszukiwaniu nowych leków. Nie przeprowadzono formalnej metaanalizy ani analizy statystycznej. Artykuły zostały sprawdzone pod kątem wartości naukowej i przydatności, a także pod względem aktualnych informacji. Ponadto przejrano odniesienia w artykułach, aby znaleźć dodatkowe publikacje. Analiza uwzględniła czynniki etiologiczne i rozpowszechnienie mykobakteriozy, opis sposobów identyfikacji bakterii, patogenezę i immunologię zakażenia, objawy kliniczne, a także leczenie zarówno ludzi, jak i zwierząt. Podsumowano także najważniejsze informacje i aktualne trendy w tej dziedzinie. Odpowiednio wyselekcjonowane informacje zawarte w artykule uzupełniają wstęp i dyskusję niniejszego manuskryptu.

4. Wyniki

4.1. Różnorodność genetyczna i oporność na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne patogenów ropotwórczych wyizolowanych z węzłów chłonnych świń

4.1.1. Izolaty bakteryjne

Badane izolaty należały do *Streptococcus* spp., *S. aureus* i *R. equi* (Tabela 1, Rycina 1 – publikacja nr 1). Paciorkowce zidentyfikowano w znacznej liczbie (48 ze 199; 24,1%) badanych próbek, w tym w 31 węzłach chłonnych i narządach ze zmianami (31/48; 64,58%) i 17 węzłach chłonnych bez zmian (17/48; 35,4%). Przy użyciu szybkiego testu lateksowego 14 szczepów paciorkowców (14/48; 29,2%) zaklasyfikowano do grupy A wg Lancefield, a 34 (34/48; 70,8%) do grupy C. Wyniki PCR wykazały, że 45 szczepów należało do *S. dysgalactiae* (45/48; 93,8%) a trzy izolaty (3/48; 6,2%) zidentyfikowano jako *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. *R. equi* wyizolowano z 17 próbek (17/199; 8,5%), w tym ośmiu z węzłów chłonnych ze zmianami ropnymi (8/17; 47,1%) i dziewięciu z węzłów chłonnych bez zmian (9/17; 52,9%). Na podstawie testu aglutynacji lateksowej i wyników PCR pięć izolatów gronkowców (5/199; 2,5%) zidentyfikowano jako *S. aureus*. Jeden z nich (1/5; 20%) został wyizolowany z węzłów chłonnych bez zmian, a cztery (4/5; 80%) z węzłów chłonnych ze zmianami ropnymi. Ponadto wyizolowano sześć koagulazo-dodatnich szczepów *Staphylococcus* spp. innych niż *S. aureus*: cztery z węzłów chłonnych ze zmianami ropnymi i dwa z węzłów chłonnych bez zmian. Dodatkowo, w pojedynczym przypadku wyizolowano *T. pyogenes* z węzła chłonnego podżuchwowego ze zmianami ropnymi. Podczas badania bakteriologicznego wyizolowano również inne bakterie, jednak ze względu na ich niewielką liczbę nie zostały one uwzględnione w analizie. Były to koagulazo-ujemne *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. oraz Gram-ujemne pałeczki wyizolowane zarówno ze zmian ropnych, jak i tkanek bez zmian. Dwa szczepy paciorkowców zostały wyizolowane od osobników, od których pobrano więcej niż jedną próbkę, podczas gdy trzy szczepy paciorkowców i jeden szczep *R. equi* zostały wyizolowane od osobnika z uogólnionymi zmianami.

4.1.2. Fenotypy i genotypy oporności na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne

Badanie wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe przeprowadzono dla 45 szczepów *S. dysgalactiae*, 3 szczepów *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, 17 szczepów *R. equi* i 5 szczepów *S. aureus*. Rozkłady wartości MIC (MIC₅₀ i MIC₉₀) ośmiu testowanych środków przeciwdrobnoustrojowych dla badanych izolatów przedstawiono w Tabeli 2 – publikacja nr 1.

Dodatkowo dla szczepów *S. dysgalactiae* określono genotypy oporności na tetracykliny i makrolidy.

4.1.2.1. Badanie lekowrażliwości *Staphylococcus aureus*

Spośród badanych szczepów *S. aureus* wszystkie były wrażliwe na PEN, AMC, CIP, ERY, DOX, GEN i SXT. Zgodnie z zastosowanym kryterium, dwa szczepy (2/5; 40%) wykazały oporność na CTX, z wartościami MIC₅₀ i MIC₉₀ wynoszącymi odpowiednio 12 µg/ml i >32 µg/ml. Pozostałe trzy szczepy (3/5; 60%) zostały sklasyfikowane jako średnio wrażliwe na CTX, z wartościami MIC₅₀ i MIC₉₀ odpowiednio 4 µg/ml i >32 µg/ml.

4.1.2.2. Badanie lekowrażliwości *Streptococcus* spp.

W przypadku szczepów *S. equi* subsp. *zooepidemicus* stwierdzono ich wrażliwość na prawie wszystkie testowane środki przeciwdrobnoustrojowe, w tym PEN, AMC, CTX, CIP, GEN, ERY i DOX. Dwa z trzech testowanych szczepów (66,7%) były również wrażliwe na SXT, ale jeden z nich (1/3; 33,3%) został sklasyfikowany jako średnio wrażliwy. Wszystkie szczepy *S. dysgalactiae* (n = 45) były wrażliwe na antybiotyki β-laktamowe testowane w tym badaniu, w tym PEN, AMC i CTX. Ponadto wszystkie szczepy były również wrażliwe na CIP i GEN. Podobnie wysoką wrażliwość zaobserwowano w przypadku SXT: zdecydowana większość szczepów była wrażliwa (40; 88,9%), a kilka było opornych (3; 6,7%) i średnio wrażliwych (2; 4,4%). Cztery szczepy były oporne na ERY, wszystkie z wartością MIC >256 µg/ml. Łącznie 24 szczepy (50%), były oporne na DOX, z MIC w zakresie od 12 µg/ml do 64 µg/ml. Pięć z czterdziestu pięciu (11,1%) szczepów *S. dysgalactiae* (S1', S27, S44, S61 i S115 - z których dwa zostały wyizolowane z tego samego stada) było jednocześnie opornych na 2 środki przeciwdrobnoustrojowe testowane w tym badaniu (fenotyp oporności: ERY/DOX). Podsumowując wśród szczepów wyizolowanych od świń z tej samej fermy zauważalne były różnice w profilach oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Dwadzieścia jeden z czterdziestu pięciu szczepów *S. dysgalactiae* (46,7%) dało pozytywny rezultat w badaniu PCR z uniwersalnymi starterami do wykrywania genów białka ochronnego rybosomu warunkującego oporność na tetracykliny. Osiemnaście szczepów (40%) zawierało gen *tetM*, a trzy (6,8%) zawierały *tetO*. Dwa szczepy, wyizolowane od świń z tego samego stada, były nosicielami obu genów oporności na tetracyklinę, *tetM* i *tetO*. W przypadku jednego szczepu wykryto produkt reakcji z uniwersalnymi starterami, ale nie z testowanymi starterami dla określonych genów *tet*. Cztery szczepy oporne na erytromycynę (8,9%)

zawierały gen *ermB*. Wszystkie izolaty *S. dysgalactiae* testowane w tym badaniu nie miały genów *tetK/L* ani *ermA*.

4.1.2.3. Badanie lekowrażliwości *Rhodococcus equi*

Wszystkie 17 szczepów *R. equi* (100%) wykazało oporność na PEN. Jednak 12 szczepów (70,6%) wykazało oporność na CTX, podczas gdy 5 (29,4%) zostało zaklasyfikowanych jako średnio wrażliwe na CTX. W przypadku AMC, 15 szczepów (88,2%) było opornych, a 2 (11,8%) były średnio wrażliwe. Wszystkie testowane szczepy były wrażliwe na ERY. Zdecydowana większość szczepów była również wrażliwa na CIP i GEN, ale jeden szczep był oporny na oba z nich. W przypadku DOX, 13 szczepów (76,5%) zostało sklasyfikowanych jako średnio wrażliwe. Oporność na SXT zaobserwowano w przypadku sześciu szczepów (35,3%), podczas gdy jeden szczep (5,9%) był średnio wrażliwy, a dziesięć szczepów (58,8%) było wrażliwych na ten środek przeciwdrobnoustrojowy. Zaobserwowano fenotypy oporności na trzy lub cztery środki przeciwdrobnoustrojowe, w tym PEN/AMC/CTX/SXT (S107, S116, S124 i S175), P/AMC/CTX (S81, S83, S87, S125, S128, S132 i S170), PEN/AMC/SXT (S29), PEN/CTX/SXT (S11) i PEN/CIP/GEN (S177). Szczepy wyizolowane z tych samych stad nie wykazywały tych samych profili oporności.

4.1.3. Pokrewieństwo filogenetyczne badanych szczepów

4.1.3.1. *Staphylococcus aureus*

Analiza PFGE wykazała trzy różne pulsotypy wśród pięciu izolatów *S. aureus*. Jeden pulsotyp grupował trzy szczepy, podczas gdy dwa szczepy wykazywały specyficzny pulsotyp. Wyróżniono jeden klastery, który grupował cztery szczepy ze wskaźnikiem podobieństwa 84,2% (Rycina 1 – publikacja nr 1). Każde ze zwierząt, od którego wyizolowano szczepy *S. aureus*, pochodziło z innego stada.

4.1.3.2. *Streptococcus* spp.

Wszystkie 48 izolatów *Streptococcus* spp. poddano analizie PFGE. Trzy szczepy *S. equi* subsp. *zooepidemicus* uzyskane z różnych stad wykazywały ten sam pulsotyp. Szeroką różnorodność genetyczną uzyskano dla pozostałych 45 szczepów *S. dysgalactiae* wyizolowanych od 42 zwierząt. Analiza dendrogramu wykazała siedem klastrow o wskaźnikach podobieństwa w zakresie od 85,7% do 100% po trawieniu DNA *SmaI* (Rycina nr 2 – publikacja nr 1). Klastry te grupowały dwa szczepy (klastry 1, 4 i 7), trzy szczepy (klastry 2 i 3), cztery szczepy (klastery 6) i trzynaście szczepów (klastery 5). Klastry 2, 5 i 6 obejmowały niektóre szczepy z tych samych stad. Wśród badanych szczepów *S. dysgalactiae*

zaobserwowano łącznie 25 pulsotypów. Najczęstszy pulsotyp był charakterystyczny dla dwunastu szczepów. Jeden pulsotyp grupował cztery szczepy, jeden grupował trzy szczepy, a cztery grupowały po dwa szczepy. Unikalne pulsotypy zaobserwowano dla 18 szczepów. Ponadto analiza PFGE wykazała, że genetycznie różne szczepy *S. dysgalactiae* krążyły w obrębie jednego stada, podczas gdy genetycznie podobne lub identyczne szczepy występowały w różnych stadach.

W jednym przypadku dwa różne pulsotypy uzyskano z różnych narządów tego samego zwierzęcia z podobieństwem 36,3%. W innym przypadku uzyskano trzy pulsotypy od tego samego zwierzęcia z różnych narządów, z których dwa (S30 i S31) należały do tego samego klastra: pierwsze dwa miały podobieństwo 100%, a trzeci (S27) miał 58,7% podobieństwa.

Ocena dendrogramu nie wykazała znaczącej różnicy między izolatami z węzłów chłonnych ze zmianami i bez zmian. Dla izolatów z węzłów ze zmianami (n = 31) uzyskaliśmy 19 pulsotypów i wyróżniliśmy pięć klastrow, podczas gdy dla izolatów węzłów chłonnych bez zmian (n = 14) uzyskaliśmy 11 pulsotypów i wyróżniliśmy cztery klastry.

4.1.3.3. *Rhodococcus equi*

Analiza PFGE wykazała wysoką różnorodność genetyczną wśród 17 izolatów *R. equi*. Uzyskano jedenaście różnych pulsotypów. Pulsotyp 6.2 był najbardziej rozpowszechniony, ponieważ uzyskano go w pięciu izolatach, a następnie pulsotypy 6.3 i 7, które uzyskano w dwóch izolatach każdy. Osiem szczepów *R. equi* wykazało unikalny pulsotyp (Rycina 3 – publikacja nr 1). Zarówno te same, jak i różne pulsotypy występowały u zwierząt z tej samej fermi. Wyróżniono dwa klastry grupujące dziewięć i dwa szczepy o podobieństwie odpowiednio 81,3% i 100%.

Szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzonych badań znajdują się w pracy:

Kaczmarkowska A, Kwiecień E, Didkowska A, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. 2023. The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes. *Antibiotics*, 12(6), 1026. DOI: /doi.org/10.3390/antibiotics12061026

4.2. Przewidywanie obecności *Mycobacterium avium* w węzłach chłonnych świń na podstawie liczby i wielkości oraz rodzaju zmian stwierdzanych podczas badania poubojowego

4.2.1. Klasyfikacja zmian anatomopatologicznych i histopatologia

113 węzłów chłonnych bez zmian makroskopowych zaklasyfikowano do grupy 0, 38 węzłów chłonnych z pojedynczymi zmianami wielkości główki szpilki przydzielono do grupy 1, natomiast 48 węzłów chłonnych z licznymi zmianami wielkości główki szpilki lub zmianami rozsianymi przypisano do grupy 2. 73 węzły chłonne, które wykazywały zmiany nieropne zaklasyfikowano do grupy A, 13 węzłów chłonnych ze zmianami ropnymi do grupy B, natomiast 113 bez zmian makroskopowych do grupy C.

Zmienione węzły chłonne wykazywały przewlekłe, wielogniskowe, ziarniniakowe lub ropno-ziarniniakowe zapalenie z naciekiem wielojądrzastych komórek olbrzymich (Rycina 4 – publikacja nr 2). Większość węzłów chłonnych zawierała martwicę skrzepową z mineralizacją lub martwicę lityczną, otoczoną rozrostem włóknistym. Czasami wykrywano również świecący materiał eozynofilowy charakterystyczny dla zjawiska Splendore-Hoeppli, (Rycina 5 – publikacja nr 2).

Częstość występowania zmian gruźliczopodobnych w węzłach chłonnych podżuchwowych u świń wyniosła 0,81% - 86 węzłów chłonnych ze zmianami gruźliczopodobnymi na 10 600 zbadanych tusz.

4.2.2. Izolacja prątków

Spośród próbek pobranych z węzłów chłonnych ze zmianami, wzrost bakterii zaobserwowano na 63 podłożach Löwensteina-Jensena i na 36 podłożach Stonebrinka. Wzrost bakterii na obu podłożach wykryto w 31 przypadkach. W przypadku węzłów chłonnych bez zmian makroskopowych wzrost bakterii na podłożu Löwensteina-Jensena lub Stonebrinka zaobserwowano w 58 przypadkach: Löwensteina-Jensena w 29 przypadkach, Stonebrinka w 29 przypadkach, a na obu podłożach w 15 przypadkach.

4.2.3. Genotypowanie izolatów prątków

M. avium zidentyfikowano w znacznej liczbie izolatów, pochodzących zarówno z węzłów chłonnych ze zmianami (49/86; 57,0%) jak i bez zmian (22/113; 19,5%). W trzech izolatach bakteryjnych (3/86; 3,5%) z węzłów chłonnych ze zmianami zidentyfikowano *M. celatum*, w kolejnych trzech stwierdzono obecność *M. avium* oraz *M. chelonae* (3/86; 3,5%),

a w jednym *M. fortuitum* (1/86; 1,2%). Z węzłów chłonnych bez zmian cztery izolaty zidentyfikowano jako *M. celatum* (4/113; 3,5%).

4.2.4. Analiza statystyczna

W wyniku selekcji modelu usunięto wszystkie zmienne z wyjątkiem ilościowego nasilenia zmian w węzłach chłonnych. Ani jakościowe nasilenie zmian w węzłach chłonnych, ani płeć zwierząt, ani wielkość stada nie wyjaśniały istotnie obecności *M. avium*. Najlepszy model, oparty na ilościowym nasileniu zmian w węzłach chłonnych, był statystycznie istotny ($\chi^2 = 46,88$, $p < 0,001$). Nasilenie zmian było istotnie związane z obecnością *M. avium*. Ponadto kategorie „liczne zmiany” i „pojedyncze zmiany” były także istotnie związane z większą szansą obecności *M. avium* niż kategoria „brak zmian” (Tabela 2 – publikacja nr 2): Prawdopodobieństwo obecności *M. avium* było 2,5 raza większe w węzłach chłonnych z pojedynczymi zmianami w porównaniu z węzłami bez zmian, a ponad 13 razy większe w węzłach chłonnych z licznymi zmianami.

W próbkach „bez zmian” częstość występowania *M. avium* wynosiła 0,23, co wskazuje, że *M. avium* może być obecne, nawet jeśli nie było zmian widocznych makroskopowo, ale prawdopodobieństwo występowania było niskie. Częstość występowania *M. avium* w próbkach „bez zmian” różniła się znacząco od pozostałych dwóch kategorii ($p = 0,020$ w porównaniu z „pojedynczymi zmianami” i $p < 0,001$ w porównaniu z „licznymi zmianami”). W kategorii „pojedyncze zmiany” częstość wyniosła 0,44, co nie potwierdziło jednoznacznie obecności *M. avium*. Jednak wartość ta wynosiła 0,8 w kategorii „liczne zmiany”, co wskazuje na wysokie prawdopodobieństwo wykrycia gatunku *M. avium* (ryc. 6). Stwierdzono również, że kategorie „pojedyncze zmiany” i „liczne zmiany” różniły się istotnie w porównaniu parami ($p < 0,001$).

Model regresji logistycznej wykazał, że procent powierzchni zmiany w węzłach chłonnych może znacząco przewidywać obecność *M. avium* ($\chi^2 = 15,33$, $p < 0,001$). Zakażenie *M. avium* było bardziej prawdopodobne, gdy zmiana obejmowała większy obszar węzła chłonnego (Rycina 7 – publikacja nr 2): prawdopodobieństwo obecności *M. avium* przekraczało 0,5, gdy dotknięte zmianami było ponad 10% powierzchni węzła chłonnego.

Ilościowe nasilenie zmian i pomiar procentowej powierzchni zmian w węzłach chłonnych dały dość podobne wyniki. Niemniej jednak model oparty na ilościowym nasileniu zmian wykazał lepszą sprawność modelu: wyższą wartość r-kwadrat Nagelkerke'a (odpowiednio 0,325 i 0,126), wyższy odsetek sklasyfikowanych przypadków ogółem

(odpowiednio 77,1% i 69,4%) oraz większy odsetek prawidłowo sklasyfikowanych obserwacji pozytywnych (odpowiednio 56,7% i 23,3%). Współczynnik AUC - pole pod krzywą ROC, był podobny (odpowiednio 0,74 i 0,734).

Szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzonych badań znajdują się w pracy:

Kaczmarkowska A, Didkowska A, Brzezińska S, Klich D, Kwiecień E, Dolka I, Kociuba P, Rzewuska M, Augustynowicz-Kopeć E, Anusz K. 2022. Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? PloSone, 17(7), e0269912. DOI: /doi.org/10.1371/journal.pone.0269912

5. Dyskusja

Zarówno w Polsce jak i na świecie wieprzowina jest najczęściej spożywanym mięsem (Stoś i in., 2022). Dlatego niezwykle ważna jest znajomość czynników mikrobiologicznych obecnych w węzłach chłonnych świń. Charakterystyka izolatów bakterii, w tym ocena lekooporności, pozwala na określenie ich potencjału zoonotycznego, który stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Jest to szczególnie istotne w sytuacji, kiedy w Polsce i wielu regionach świata produkowane są kiełbasy wieprzowe, nie poddawane obróbce termicznej.

Częstość występowania zmian gruźliczopodobnych w węzłach chłonnych świń wyniosła 0,81%. Zbliżone wyniki uzyskali holenderscy badacze, którzy stwierdzili zmiany ziarniniakowe w węzłach podżuchwowych u 0,75% świń z dwóch rzeźni na terenie Holandii. Tylko w jednym przypadku tego rodzaju zmiany były zlokalizowane w węzłach chłonnych krezkowych (Komijn i in., 2007). Uzyskane wyniki wskazują na znacznie wyższy wskaźnik izolacji prątków z MAC niż w holenderskich gospodarstwach ukierunkowanych na intensywną produkcję. Może to wynikać z podatności rasowej na zakażenia, charakteru systemu hodowli, ekologii bakterii (Cardoso – Toset i in., 2015) lub wieku świń.

Badania mikrobiologiczne pozwoliły na uzyskanie 48 izolatów *Streptococcus* spp. (45 *S. dysgalactiae* i trzy *S. equi* subsp. *zooepidemicus*), 17 *R. equi* oraz pięciu *S. aureus*. Otrzymane wyniki są podobne do prezentowanych we wcześniej opublikowanych doniesieniach, ale częstość izolacji poszczególnych gatunków różniła się (Martínez i in. 2007, Lara i in., 2011, Cardoso – Toset i in., 2015, Witkowski i in., 2016, Cardoso – Toset i in., 2020). Lara i in. wykazali, że *R. equi* i *Streptococcus* spp. były dominującymi gatunkami izolowanymi z węzłów chłonnych świń (Lara i in., 2011), podobnie jak w naszych badaniach. Odnosząc się do wielu doniesień, można stwierdzić, że *Streptococcus* spp. izolowany z ropnych zmian w węzłach chłonnych u świń, był jednym z głównych patogenów (Martínez i in. 2007, Cardoso – Toset i in., 2015, Cardoso – Toset i in., 2020). Z drugiej strony należy podkreślić, że częstość izolacji *T. pyogenes* w przebiegu niniejszych badań była znacznie niższa niż wcześniej opisywano u świń (Cardoso – Toset i in., 2015, Cardoso – Toset i in., 2020).

W porównaniu z wcześniejszymi publikacjami, w przebiegu niniejszych badań znacznie więcej bakterii patogennych wyizolowano z węzłów chłonnych bez zmian ropnych (Lin i in. 2019). W dwóch przypadkach z tego samego węzła chłonnego bez zmian ropnych wyizolowano zarówno *S. dysgalactiae*, jak i *R. equi*. Wcześniej opisano także izolację kilku rodzajów bakterii z jednej próbki węzła chłonnego (Martínez i in. 2007).

Najczęściej izolowanym drobnoustrojem był *S. dysgalactiae*. Nie przeprowadzono identyfikacji szczepów *S. dysgalactiae* do podgatunku, ponieważ taksonomia *S. dysgalactiae* pozostaje niejasna. Ostatnie badania wskazują, że *S. dysgalactiae* można podzielić na dwie odrębne grupy. Jedna obejmuje tylko szczepy ludzkie, podczas gdy druga zwierzęce pochodzące od świń, psów i koni, a także bardziej odrębne filogenetycznie szczepy bydła (Alves – Barroco i in., 2022). Większość izolatów *S. dysgalactiae* należała do grupy C Lancefield, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Katsumi i in., 1998, Oh i in., 2020). Jednakże niektóre szczepy należały do grupy A. Do tej pory nie ma doniesień o zakażeniach świń wywołanych przez *S. dysgalactiae* z grupy A Lancefield. Należy zaznaczyć, że szczepy *S. dysgalactiae* z grupy A są bardzo rzadko izolowane. Tym niemniej, szczepy te wykazują potencjał zoonotyczny i były izolowane od pacjentów z bakteriami (Ishihara i in., 2020).

Częstość występowania *M. avium* osiągnęła 56,98% w węzłach chłonnych ze zmianami, a 19,47% w węzłach bez zmian. Stosunkowo wysoką częstość występowania *M. avium* w niezmiennych węzłach chłonnych można tłumaczyć krótkim okresem życia świń oraz faktem, że zakażenie wystąpiło zbyt późno, aby zmiany mogły się rozwinąć (Van Ingen i in., 2010). Podobne wskaźniki izolacji *M. avium* opublikowali Pate i in., którzy wyizolowali patogen od 47,3% świń ze zmianami w węzłach chłonnych, dla kontrastu *R. equi* w ich badaniu został wyizolowany tylko od 3,9% świń ze zmianami w węzłach chłonnych (Pate i in., 2004).

Na podstawie przeprowadzonych badań oceniono pokrewieństwo genetyczne i oporność na leki przeciwdrobnoustrojowe bakterii ropotwórczych wyizolowanych z węzłów chłonnych świń, pobranych podczas badania poubojowego. W przebiegu badań izolowano bakterie z węzłów chłonnych ze zmianami ropnymi i bez zmian. Wyizolowane *S. aureus* (Algammal i in., 2020), *S. dysgalactiae* (Schreiber i in., 2014, Koh i in., 2020), *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Kim i in., 2022), *R. equi* (Vázquez – Boland i in., 2013, Takai i in., 2020) i *T. pyogenes* (Deliwala i in., 2020) mają potencjał zoonotyczny. Nie tylko konsumenci wieprzowiny, ale także pracownicy rzeźni, lekarze weterynarii i inni pracownicy przemysłu spożywczego są szczególnie narażeni na zakażenie tymi drobnoustrojami.

Do oceny pokrewieństwa genetycznego wyizolowanych szczepów wykorzystano metodę PFGE, uznaną za "złoty standard" ze względu na moc dyskryminacyjną w badaniach różnych grup bakterii (Arbeit i in., 1995, Sabat i in., 2013). Zaobserwowano wysoką zmienność genetyczną szczepów *S. dysgalactiae* - 25 różnych pulsotypów PFGE. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat różnorodności genetycznej paciorkowców, w tym

S. dysgalactiae, pochodzących od zwierząt (Cardoso – Tosest i in., 2020, Costa i in., 2022). Zastosowana metoda PFGE wykazała wysoki stopień polimorfizmu wewnątrzgatunkowego, zarówno między izolatami pochodzącymi z różnych gospodarstw, jak i pomiędzy izolatami pochodzącymi z tego samego gospodarstwa. Podobnie jak w badaniu Cardoso - Tosest i in., analiza PFGE wykazała, że genetycznie różne izolaty *S. dysgalactiae* krążyły w jednym stadzie, podczas gdy genetycznie podobne izolaty krążyły w różnych stadach (Cardoso – Tosest i in., 2020). Znaczący polimorfizm wśród szczepów *S. dysgalactiae* potwierdza, że PFGE jest wysoce dyskryminującym narzędziem w badaniach epidemiologicznych zakażeń zwierząt wywołanych przez tę bakterię .

Obserwowano niską różnorodność wzorów PFGE dla szczepów *S. equi* subsp. *zooeconomicus* i *S. aureus*. Należy jednak zauważyć, że liczba badanych szczepów była ograniczona. Trzy szczepy *S. equi* subsp. *zooeconomicus* z różnych ferm miały jeden pulsotyp. Podobne wyniki uzyskano podczas genotypowania izolatów *S. equi* subsp. *zooeconomicus* od świń i małą w Indonezji (Saasia i in., 2004).

W przypadku *S. aureus* uzyskano trzy pulsotypy dla pięciu szczepów z różnych stad, a cztery szczepy należały do jednego klastra. W literaturze istnieją ograniczone dane dotyczące typowania PFGE szczepów *S. aureus* izolowanych od świń (Gómez-Sanz i in., 2010, Broens i in., 2011). W naszych badaniach wzory PFGE wykazały wysokie podobieństwo. Porównywalne wyniki uzyskał Broens i in., którzy dowiedli także, że świnię MRSA-ujemne mogą zostać skolonizowane przez szczepy MRSA-dodatnie podczas transportu z gospodarstwa do rzeźni (Broens i in., 2011). Można przypuszczać, że źródłem kolonizacji MRSA u świń mogą być zanieczyszczone ciężarówki, rzeźnie lub personel. Ponadto mieszanie świń z różnych gospodarstw w transporcie i w magazynach żywca może również prowadzić do kolonizacji szczepami MRSA-dodatnimi (Broens i in., 2011, Molla i in., 2012). Istnieją doniesienia, wskazujące na dużą zmienność wzorców PFGE między szczepami MRSA-dodatnimi izolowanymi od świń, co sugeruje rozległe rearanżacje DNA i potencjał do uzyskania lub utraty cech genetycznych, to znaczy zdarzeń genomowych zachodzących w krótkim czasie (Lo i in., 2012).

Genotypowanie szczepów *R. equi* metodą PFGE wykazało wysoką różnorodność genetyczną pośród badanych izolatów. Dwa izolaty z tego samego stada wykazywały ten sam pulsotyp; jednak ten sam pulsotyp stwierdzono również w trzech izolatach pochodzących od

świń z trzech różnych stad. Podobne wyniki uzyskali Pate i in., którzy ocenili różnorodność genetyczną *R. equi* izolowanych od świń w Słowenii (Pate i in., 2009).

Wobec stwierdzenia wysokiego stopnia polimorfizmu wewnątrzgatunkowego bakterii ropotwórczych wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian, szczególnie w odniesieniu do *S. dysgalactiae* i *R. equi*, w pełni uzasadnione jest rekomendowanie ich monitorowania w stadach świń, z uzupełnieniem badań bakteriologicznych oceną pokrewieństwa genetycznego przy użyciu metody PFGE – wysoce dyskryminującego narzędzia w badaniach epidemiologicznych. Takie postępowanie będzie zgodne z koncepcją „One Health”.

W badaniach dotyczących wrażliwości na antybiotyki wykorzystano metodę dyfuzji paskowej, która jest powszechnie stosowana w laboratoriach diagnostycznych. Badane szczepy paciorkowców wykazywały najniższe wartości MIC dla antybiotyków β -laktamowych, aminoglikozydów, fluorochinolonów i sulfonamidów, a najwyższe dla tetracyklin i makrolidów. Znanych jest tylko kilka doniesień na temat wrażliwości przeciwdrobnoustrojowej izolatów *Streptococcus* spp. od świń. Wyniki potwierdziły, że antybiotyki β -laktamowe są najlepszym wyborem do leczenia zakażeń paciorkowcami u ludzi i świń, co jest zgodne z wcześniejszymi publikacjami (Oh i in., 2020, Moreno i in., 2016). W przedmiotowych badaniach makrolidy i tetracykliny wykazały najwyższe wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ wśród badanych zakresów rozcieńczeń, co jest zgodne z badaniami oporności na antybiotyki szczepów *S. dysgalactiae* od świń pochodzących z Brazylii, Austrii i Korei (Moreno i in., 2016, Oh i in., 2020, Renzhammer i in., 2020). Należy podkreślić, że makrolidy i tetracykliny są powszechnie stosowane w leczeniu zakażeń u zwierząt gospodarskich, a w przedstawionych badaniach oporność na te klasy antybiotyków stwierdzono u szczepów wyizolowanych zarówno z węzłów chłonnych świń ze zmianami i bez zmian. Badania koreańskich naukowców dotyczące wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe ludzkich szczepów *S. dysgalactiae* wykazały znaczny wzrost częstości występowania oporności na erytromycynę - z 9,4% do 34,8% (Kim i in., 2018). Otrzymane wyniki niniejszych badań mają duże znaczenie z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego, ponieważ osoby z zapaleniem migdałków i gardła z powodu zakażenia paciorkowcami, które są uczulone na antybiotyki β -laktamowe, podlegają alternatywnej terapii makrolidami. W przypadku potwierdzenia oporności na makrolidy, jako leki drugiego wyboru należy rozważyć tetracykliny i fluorochinolony (Savini i in., 2008, Oh i in., 2020).

Badania skoncentrowano również na występowaniu genów oporności na makrolidy i tetracykliny wśród szczepów *S. dysgalactiae*. Odnosząc się do publikacji koreańskich badaczy opublikowanej w 2020 roku, uzyskano takie same wyniki dotyczące braku genu *ermA* w badanych szczepach *S. dysgalactiae* (Oh i in., 2020). Z kolei gen *ermB* był obecny w 7,8% badanych szczepów, podczas gdy w badaniu Sang Oh i in. gen ten wykazało 18,2% szczepów (Oh i in., 2020). W odniesieniu do genów oporności na tetracykliny otrzymane wyniki różniły się od wcześniejszych badań innych autorów. W przedmiotowym badaniu gen *tetM* był dominujący (42,2%) w stosunku do genu *tetO* (6,8%), kiedy w badaniach izolatów z Korei dominował *tetO* (90,9%), a *tetM* był obecny jedynie w 18,2% szczepów (Oh i in., 2020). Natomiast podobne wyniki otrzymano w przypadku genów *tetK* i *tetL*, które nie zostały wykryte (Oh i in., 2020).

Istnieje zauważalna rozbieżność między fenotypową i genotypową opornością przeciwdrobnoustrojową izolatów *S. dysgalactiae*. Można to wytłumaczyć obserwacją Smith M. i in., że posiadany fenotyp oporności bakterii nie zawsze jest dokładnym odzwierciedleniem genów oporności przeciwdrobnoustrojowej (Smith i in., 2014, Oh i in., 2020). Ponadto nie można wykluczyć obecności w badanych szczepach innych genów, które nie zostały uwzględnione w tym badaniach.

Wszystkie badane izolaty *S. aureus* wykazywały wrażliwość na niektóre antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy, makrolidy, tetracykliny i sulfonamidy. Spośród pięciu szczepów, dwa były odporne (40%), a trzy miały pośrednią wrażliwość (60%) na CTX. Porównując otrzymane wyniki z wcześniej opublikowanymi danymi, nie stwierdzono oporności na tetracykliny, penicyliny, makrolidy lub linkozamidy, podczas gdy oporność na wszystkie cztery grupy stwierdzono wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych od świń na targach rolniczych w USA (Dressler i in., 2012). Badane szczepy były także znacznie bardziej wrażliwe na antybiotyki w porównaniu do szczepów wyizolowanych od belgijskich świń w 2013 roku, gdzie 98,6% szczepów wykazało oporność na tetracyklinę, 96,2% na trimetoprim, 61,1% na cyprofloksacynę, 57,8% na erytromycynę i 45,5% na gentamycynę (Peeters i in., 2015). Ponadto belgijscy badacze wykazali znaczący wzrost oporności na cyprofloksacynę, z 32% do 61,1% rok do roku (Peeters i in., 2015).

Wszystkie badane szczepy *R. equi* okazały się wrażliwe na makrolidy, a zdecydowana większość była również wrażliwa na fluorochinolony i aminoglikozydy, co jest zgodne z wynikami innych autorów (Cisek i in., 2014). Nie ma publikacji, które dostarczałyby danych

na temat lekooporności *R. equi* u świń, co uniemożliwia porównanie wyników. Jednak w przypadku izolatów uzyskanych od koni odnotowano wysoką wrażliwość na aminoglikozydy i tetracykliny oraz względną wrażliwość na makrolidy (Berghaus i in., 2015). Obecność szczepów *R. equi* sklasyfikowanych jako umiarkowanie wrażliwe na tetracykliny, może być związana z zastosowaną metodą badawczą. Niektóre badania sugerują bowiem, że metoda dyfuzji paskowej może zaniżać wartości MIC dla tej klasy antybiotyków (Berghaus i in., 2015). Można zatem przypuszczać, że badane szczepy były odporne na tetracykliny. Wysoka oporność szczepów *R. equi* na antybiotyki β -laktamowe nie była zaskakująca, ponieważ stwierdzano wcześniej wiele takich przypadków (Giguère i in., 2017).

Wobec stwierdzonej oporności na chemioterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe bakterii ropotwórczych wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian, należy zwrócić szczególną uwagę na zagrożenie powstawaniem rezerwuarów genów determinujących oporność na antybiotyki w surowym mięsie wieprzowym. Geny mogą być przenoszone horyzontalnie ze szczepów bytujących w mięsie do szczepów klinicznych w organizmie człowieka. Zjawisko nabywania i rozprzestrzeniania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe zachodzące za pomocą mobilnych elementów genetycznych i ich transferu do antybiotykowrażliwych drobnoustrojów za pośrednictwem horyzontalnego transferu genów (ang. HGT - Horizontal Gene Transfer) stanowi największe zagrożenie dla zdrowia publicznego (Tao i in., 2022).

Przeprowadzone badania potwierdziły statystycznie istotną korelację między wielkością zmian gruźliczopodobnych w podżuchwowych węzłach chłonnych świń a obecnością *M. avium*. Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę zakażeń prątkami z MAC u ludzi, a także możliwość przedostania się bakterii do łańcucha pokarmowego, spekulowano, że algorytm naukowy oparty na ocenie wizualnej, który mógłby być przeprowadzany w rzeźniach, może być przydatny. Zostało to potwierdzone przez analizę statystyczną, która wykazała wysokie prawdopodobieństwo izolacji *Mycobacterium* spp. z węzłów chłonnych ze zmianami gruźliczopodobnymi i niskie w przypadku ich braku. W tym kontekście należy przypomnieć, że wcześniej wykazano powiązania epidemiologiczne między zakażeniami u świń i zakażeniami u ludzi lub zakażeniami pochodzącymi ze wspólnych źródeł (Hiller i in., 2013).

Wiadomo, że u świń do zakażenia *M. avium* dochodzi drogą pokarmową. Następstwem są zmiany zlokalizowane głównie w głowie, śródpiersiu i węzłach chłonnych przewodu pokarmowego (Mijls i in., 2002, Matlova i in., 2003). Opierając się na tych ustaleniach

i wcześniej przeprowadzonych obserwacjach własnych, dotyczących częstości występowania zmian u świń, zdecydowano się zbadać podżuchwowe węzły chłonne, które są łatwo dostępne a ich ocena zajmuje niewiele czasu (około 5 sekund).

Wyniki wskazują, że wstępna ocena zmian makroskopowych na podstawie oględzin może być przydatną metodą w wykrywaniu *M. avium*, ponadto ocena ilości zmian wydaje się być szybkim i tanim narzędziem. Jedywym wymogiem jest odpowiednie przeszkolenie osób badających mięso. Jednakże, jest to nowa propozycja, prawdopodobnie pierwsza i ma pewne ograniczenia. Po pierwsze, jest to subiektywna ocena zmian w węzłach chłonnych, ponadto wyniki wskazują na stosunkowo wysokie prawdopodobieństwo obecności *M. avium* w węzłach chłonnych bez zmian makroskopowych. Tak więc, należy ostrożnie podchodzić do kontroli wzrokowej, a węzły chłonne nie wykazujące zmian gruźliczopodobnych nie powinny być automatycznie kwalifikowane jako wolne od *M. avium*, ale jako „prawdopodobnie wolne”.

Kontrola wzrokowa jest skuteczną metodą przesiewową, pozwala również uniknąć innych ograniczeń związanych z przeprowadzeniem testów laboratoryjnych - długiego czasu potrzebnego do uzyskania wyników i znacznych nakładów finansowych. Uzasadnione jest zastosowanie wizualnych badań przesiewowych w celu wybrania materiału do badań molekularnych np. z wykorzystaniem testu GenoType Mycobacterim CM.

Jak wskazują wyniki, obliczenie obszaru zmian jest skutecznym parametrem prognostycznym obecności *M. avium*. Metoda zastosowana w niniejszym badaniu do obliczenia procentu zmienionej powierzchni przekroju węzła chłonnego świni jest dość czasochłonna oraz wymaga określonego sprzętu i oprogramowania. Ponadto nie zapewnia lepszych wyników niż wizualna ocena liczby zmian w węzłach chłonnych. Niemniej jednak, niższa precyzja modelu w odniesieniu do oceny procentowej zmian mogła wynikać z mniejszej liczebności próby. Ograniczeniem tej metody mogą być także duże obszary zmian gruźliczopodobnych, które można przypisać zakażeniu mieszanemu przez *M. avium* i *Streptococcus* spp., *S. aureus* lub *R. equi*. Doniesienia autorów innej publikacji wskazują, że w niektórych przypadkach niemożliwe było wyizolowanie i wyhodowanie jakiegokolwiek czynnika etiologicznego z zaawansowanych zmian ze względu na ich silne zwapnienie i obumarcie prątków (Matlova i in., 2005).

W metodzie określającej ilościowe nasilenie zmian, częstość występowania *M. avium* w kategorii „pojedyncze zmiany” nie odzwierciedlała obecności bakterii. Jedyne sytuacje,

w których nie zaobserwowano żadnych zmian lub zaobserwowano liczne zmiany, okazały się wyraźnymi wskazaniami możliwej obecności *M. avium*. Z tego powodu uzasadnione wydaje się stosowanie kombinacji metod jednocześnie, to znaczy liczby zmian i procentu zmienionej powierzchni przekroju węzłów chłonnych, przynajmniej dla kategorii „pojedynczych zmian”. Wyniki regresji logistycznej wskazują na 50% ryzyko obecności *M. avium*, nawet jeśli zmianami objęte jest tylko 10% przekroju węzła chłonnego. Pojedyncze zmiany, które stanowią ponad 10% powierzchni przekroju, również wykazują na zwiększone ryzyko obecności *M. avium*, które wzrasta wraz z procentem zmienionej powierzchni przekroju węzła chłonnego. Gdy zmiany obejmują 50% przekroju węzła, obecność *M. avium* jest prawie gwarantowana. Oszacowanie powierzchni zmian wydaje się więc wiarygodną metodą oceny ryzyka wystąpienia *M. avium*.

Przeprowadzone badania histopatologiczne potwierdziły obecność w węzłach chłonnych świń ognisk martwicy i zwapnień, które są zmianami typowymi dla późnego stadium zapalenia ziarniniakowego wywołanego przez *M. avium* (Hibiya i in., 2008). Badania nie wykazały jednak istotnych różnic między materiałami pobranymi z różnych typów zmian.

Wielkość stada nie ma wpływu na występowanie *M. avium* w węzłach chłonnych świń. Może to wynikać z faktu, że hodowla świń w Polsce nie jest skonsolidowana, a badane zwierzęta pochodziły głównie z małych gospodarstw o podobnym statusie zoohigienicznym. Należy jednak pamiętać, że zakażenia *M. avium* występują również w dużych gospodarstwach o lepszych warunkach zoohigienicznych, nastawionych na intensywną produkcję trzody chlewnej (Wellenberg i in., 2010, Hulinova Stromerova i in., 2018). Ponadto nie zaobserwowano korelacji między występowaniem *M. avium* a charakterem zmian chorobowych ani płcią świń. Podobne wyniki odnotowano dla populacji dzików z południowej Hiszpanii (Garcia - Jimenez i in., 2015).

Uzyskane wyniki badań i wnioski z nich płynące stanowią naukowo udokumentowane przesłanki do częstszego podejmowania przez urzędowych lekarzy weterynarii zgodnej z ustawodawstwem UE rozszerzonej procedury badania poubojowego świń, wzbogaconej o badanie dotykowe i nacinanie węzłów chłonnych. Rozszerzona procedura powinna być podstawą wizualnych badań przesiewowych ukierunkowanych na wybór materiału o wysokim prawdopodobieństwie obecności między innymi bakterii ropotwórczych czy prątków, przeznaczonego do badań bakteriologicznych i molekularnych. Jej częstsze stosowanie zwiększa bezpieczeństwo konsumentów wieprzowiny. Ponadto wykrycie wielu zmian ropnych,

czy też gruźliczopodobnych u świń z określonej fermy powinno być istotnym sygnałem dla hodowcy do podjęcia programu monitorowania i prewencji zakażeń bakteryjnych.

6. Wnioski

1. *S. dysgalactiae*, *R. equi* i *S. aureus* są najczęściej izolowanymi bakteriami ropotwórczymi z węzłów chłonnych świń zarówno ze zmianami ropnymi, jak i bez zmian. Występowanie bakterii o potencjale zoonotycznym w węzłach chłonnych bez zmian jest szczególnie groźne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego, uniemożliwia bowiem podjęcie podejrzenia obecności patogenów podczas badania poubojowego, czego konsekwencją jest niepobieranie materiału do badań bakteriologicznych.

2. W świetle obowiązującego w Unii Europejskiej ustawodawstwa kładącego nacisk na ocenę jedynie wizualną tusz i narządów zwierząt rzeźnych (bez nacinania i badania dotykowego), utrudnione jest wykrywanie węzłów chłonnych ze zmianami wywoływanymi między innymi przez bakterie ropotwórcze (*S. dysgalactiae*, *R. equi*, oraz *S. aureus*), co zagraża zdrowiu publicznemu. Wobec powyższego lekarze weterynarii wykonujący badania poubojowe powinni w szerszym zakresie korzystać z zapisu artykułu 24 Rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2019/627, zobowiązującego do podejmowania według ich opinii dodatkowej procedury badania poubojowego przy zastosowaniu badania dotykowego i nacięć.

3. Niektóre szczepy bakterii ropotwórczych o potencjale zoonotycznym, wyizolowane zarówno z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi, jak i bez zmian, są odporne na środki przeciwdrobnoustrojowe, czego konsekwencją może być powstawanie rezerwuarów genów determinujących oporność na antybiotyki w surowym mięsie wieprzowym, a następnie horyzontalny transfer genów (HGT - horizontal gene transfer) ze szczepów bytujących w mięsie do szczepów klinicznych w organizmie ludzkim.

4. Bakterie ropotwórcze izolowane z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian charakteryzują się w większości wysokim stopniem polimorfizmu wewnątrzgatunkowego. Zgodnie z koncepcją „Jedno Zdrowie” wskazane jest ich monitorowanie w stadach świń, z uwzględnieniem oceny pokrewieństwa genetycznego.

5. Zarówno liczba zmian na przekrojach węzłów chłonnych świń, jak i procent zmienionej powierzchni przekroju węzłów chłonnych świń pozytywnie korelują z prawdopodobieństwem obecności *M. avium* (ilościowe nasilenie zmian).

6. Jakościowe nasilenie zmian w węzłach chłonnych świń, płeć zwierząt oraz wielkość stada nie wpływają na prawdopodobieństwo obecności *M. avium*.

8. Brandt C. M., Spellerberg B., 2009 Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. Clin. Infect. Dis., 49, 766–772.
9. Broens E. M., Graat E. A., Van Der Wolf P. J., Van De Giessen A. W., De Jong M. C., 2011. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs during transportation from farm to abattoir. Vet. J., 189, 302–305.
10. Burnham K. P, Anderson D. R. Model selection and multimodel inference: a practical information—theoretic approach. 2nd ed. New York: Springer, 2002.
11. Busatto C, Vianna JS, da Silva L. V., Junior Ramis I. B., da Silva P. E. A., 2019. *Mycobacterium avium*: an overview. Tuberculosis (Edinb)., 114, 127–134.
12. Cardoso-Toset F., Gómez-Laguna J., Amarilla S. P., Vela A. I., Carrasco L., Fernández - Garayzábal J. F., Astorga R. J., Luque I., 2015. Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. PLoS ONE, 10, e0139130.
13. Cardoso - Toset F., Gómez - Laguna J., Gómez - Gascón L., Rodríguez - Gómez I. M., Galán - Relaño A., Carrasco L., Tarradas C., Vela A. I., Luque I., 2020. Histopathological and microbiological study of porcine lymphadenitis: Contributions to diagnosis and control of the disease. Porc. Health Manag., 6, 36.
14. Cardoso-Toset F., Luque I., Morales-Partera A., Galán-Relaño A., Barrero-Domínguez B., Hernández M., Gómez-Laguna J., 2017. Survival of *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* in dry-cured Iberian pork shoulders and loins. Food Microbiol., 61, 66–71.
15. CA-SFM Comité de L’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology Guidelines: Recommandations Vétérinaires 2021. Available online: https://www.sfm-microbiologie.org/wpcontent/uploads/2021/12/CASFM_VET2021.pdf (accessed on 14 February 2023). (In French).

16. Chin KL, Sarmiento ME, Alvarez-Cabrera N, Norazmi M. N., Acosta A., 2020. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections: current state and future management. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 39(5), 799–826.
17. Choi S. R, Britigan B. E, Switzer B., Hoke T., Moran D., Narayanasamy P., 2018. In Vitro Efficacy of Free and Nanoparticle Formulations of Gallium (III) meso-Tetraphenylporphyrine against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* and Gallium Biodistribution in Mice. *Mol Pharm.*, 15(3), 1215–1225.
18. Cisek A. A., Rzewuska M., Witkowski L., Binek M., 2014. Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *Acta Biochim. Pol.*, 61, 633–638.
19. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals, 1st ed., CLSI Supplement VET06; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals, 4th ed., CLSI Supplement VET08; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
21. Cohen N. D., Smith K. E., Ficht T. A., Takai S., Libal M. C., West B. R., DelRosario L. S., Becu T., Leadon D. P., Buckley T., Chaffin M. K, Martens R. J., 2003. Epidemiologic study of results of pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Rhodococcus equi* obtained from horses and horse farms. *Am. J. Vet. Res.*, 64, 153–161.
22. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls.

23. Costa M. O., Harding J. C. S., Huang Y., Nosach R., 2022. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection of pigs leads to shedding in faeces and a carrier state. *Transbound. Emerg. Dis.*, 69, e1503–e1509.
24. Deliwala S., Beere T., Samji V., McDonald P.J., Bachuwa G., 2020. When Zoonotic Organisms Cross Over-*Trueperella pyogenes* Endocarditis Presenting as a Septic Embolic Stroke. *Cureus*, 12, e7740.
25. Despierres L., Cohen-Bacrie S., Richet H., Drancourt M., 2012. Diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* mycobacteria causing lymphadenitis, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 31 (7), 1373–9.
26. Di Marco, V., Mazzone P., Capucchio M. T., Boniotti M. B., Aronica V., Russo M., Fiasconaro M., Cifani N., Corneli S., Biasibetti E., Biagetti M., Pacciarini M. L., Cagiola M., Pasquali P., Marianelli C., 2012. Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 1209–1218.
27. Dressler A. E., Scheibel R. P., Wardyn S., Harper A.L., Hanson B. M., Kroeger J. S., Diekema D. J., Bender J. B., Gray G. C., Smith T. C., 2012. Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* in pigs at agricultural fairs in the USA. *Vet. Rec.*, 170, 495.
28. Falkinham J.O., 2009. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.*, 107(2), 356–367.
29. Fukushima K, Kitada S, Komukai S., Kuge T., Matsuki T., Kagawa H., Tsujino K., Miki M., Miki K., Kida H., 2021. First line treatment selection modifies disease course and long-term clinical outcomes in *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Sci Rep.*, 11(1), 1178.
30. García-Jiménez W. L., Benítez-Medina J. M., Martínez R., Carranza J., Cerrato R., García-Sánchez A., Risco D., Moreno J. C., Sequeda M., Gómez L., Fernández - Llario P., Hermoso-de-Mendoza J., 2015. Non-tuberculous mycobacteria in wild boar (*Sus scrofa*) from Southern

Spain: epidemiological, clinical and diagnostic concerns. *Transbound Emerg Dis.*, 62(1), 72–80.

31. Gerrard Z. E., Swift B. M. C., Botsaris G., Davidson R. S., Hutchings M. R., Huxley J. N., Rees C. E. D., 2018. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail pasteurised milk. *Food Microbiol.*, 74, 57–63.

32. Giguère S., Berghaus L. J., Willingham-Lane J. M., 2017. Antimicrobial Resistance in *Rhodococcus equi*. *Microbiol. Spectr.*, 5, 10.

33. Gómez-Sanz E., Torres C., Lozano C., Fernández-Pérez R., Aspiroz C., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., 2010. Detection Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7, 1269–1277.

34. Gottschalk M. Streptococcosis. In *Disease of Swine*, 10th ed., Zimmerman J. J., Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson G. W., 2012. Eds., John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, UK, pp. 841–855.

35. Hennekinne J. A., Kerouanton A., Brisabois A., De Buyser M. L., 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 321–329.

36. Hibiya K., Kasumi Y., Sugawara I., Fujita J., 2008. Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 31(4), 347–66.

37. Hibiya K., Utsunomiya K., Yoshida T., Toma S., Higa F., Tateyama M., Fujita J., 2010. Pathogenesis of systemic *Mycobacterium avium* infection in pigs through histological analysis of hepatic lesions. *Can J Vet Res.*, 74(4), 252-7.

38. Hiller A., Oorburg D., Wisselink H., van Solt-Smits C. B., Urlings B., Klein G., Althoff G. S., Heres L., 2013. Prevalence of *Mycobacterium avium* in Slaughter Pigs Based on Serological

Monitoring Results and Bacteriological Validation. *Int J Environ Res Public Health.*, 10(9), 4027–4038.

39. Hulinova Stromerova N., Faldyna M., 2018. *Mycobacterium avium* complex infection in pigs: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 57, 62–68.

40. Ishihara H., Ogura K., Miyoshi-Akiyama T., Nakamura M., Kaya H., Okamoto S., 2020. Prevalence and genomic characterization of Group A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from patients with invasive infections in Toyama prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 64, 113–122.

41. Kaczmarkowska A., Didkowska A., Brzezińska S., Klich D., Kwiecień E., Dolka I., Kociuba P., Rzewuska M., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K., 2022. Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? *PLoS ONE*, 17, e0269912.

42. Kaevska M., Slana I., Kralik P., Reischl U., Orosova J., Holcikova A., Pavlik I., 2011. "*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*" in neck lymph nodes of children and their environment examined by culture and triplex quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol.*, 49(1), 167–72.

43. Katsumi M., Kataoka Y., Takahashi T., Kikuchi N., Hiramune T., 1998. Biochemical and serological examination of beta-hemolytic streptococci isolated from slaughtered pigs. *J. Vet. Med. Sci.*, 60, 129–131.

44. Kawata K., Minakami T., Mori Y., Katsumi M., Kataoka Y., Ezawa A., Kikuchi N., Takahashi T., 2003. rDNA sequence analyses of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53 Pt 6, 1941–1946.

45. Kim M., Heo S. T., Oh H., Kim M., Jo J., Kim Y. R., Lee K. H., Yoo J. R., 2022. Human zoonotic infectious disease caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Zoonoses Public Health*, 69, 136–142.

46. Kim S., Byun J. H., Park H., Lee J., Lee H. S., Yoshida H., Shibayama A., Fujita T., Tsuyuki Y., Takahashi T., 2018. Molecular epidemiological features and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from Korea and Japan. *Ann. Lab. Med.*, 38, 212–219.
47. Kinoshita Y., Takechi M., Uchida-Fujii E., Miyazawa K., Nukada T., Niwa H., 2021. Ten cases of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infections linked to equine abortions in Japan, 2018–2019. *Vet Med Sci.*, 7(3), 621-625.
48. Klanicova B., Slana I., Vondruskova H., Kaevska M., Pavlik I., 2011. Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies in meat products. *J Food Prot.*, 74(4), 636–40.
49. Klotz D., Barth S. A., Baumgartner W., Hewicker - Trautwein M., 2018. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a domestic rabbit. *Emerg Infect Dis.*, 24(3), 596–598.
50. Koh T. H., Binte A. R. N., Sessions O. M., 2020 Comparative genomic analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*, an occasional cause of zoonotic infection. *Pathology*, 52, 262–266.
51. Komatsu T., Inaba N., Kondo K., Nagata R., Kawaji S., Shibahara T., 2017. Systemic mycobacteriosis caused by ‘*Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*’ in a 14-month-old Japanese black beef steer. *J Vet Med Sci.*, 79(8), 1384–1388.
52. Komijn R. E., Wisselink H. J., Rijsman V. M. C., Stockhofe - Zurwieden N., Bakker D., van Zijderveld F. G., Eger T., Wagenaar J. A., Putirulan F. F., Urlings B. A. P., 2007. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.*, 120, 352–357.
53. Kriz P., Kaevska M., Slana I., Bartejsova I., Pavlik I., 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in lymph nodes and diaphragms of pigs from one infected herd in the Czech Republic. *J Food Prot.*, 77

(1), 141–4.

54. Kohler P., Kuster S. P, Bloemberg G., Schulthess B., Frank M., Tanner F. C., Rössle M., Böni C., Falk V., Wilhelm M. J., Sommerstein R., Achermann Y., Ten Oever J., Debast S. B., Wolfhagen M. J., Brandon Bravo Bruinsma G. J., Vos M. C., Bogers A., Serr A., Beyersdorf F., Sax H., Böttger E. C., Weber R., van Ingen J., Wagner D., Hasse, B., 2015. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *Eur Heart J.*, 21(40), 2745–2753.

55. Kwon Y. S., Koh W. J., Daley C. L., 2019. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Tuberc Respir Dis.*, 82(1), 15–26.

56. Lara G. H., Ribeiro M. G., Leite C. Q., Paes A. C., Guazzelli A., da Silva A. V., Santos A. C., Listoni F. J., 2011. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Res. Vet. Sci.*, 90, 185–188.

57. Lin W. V., Kruse R. L., Yang K., Musher D. M., 2019. Diagnosis and management of pulmonary infection due to *Rhodococcus equi*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 25, 310–315.

58. Lo Y. P., Wan M. T., Chen M. M., Su H. Y., Lauderdale T. L., Chou C. C., 2012. Molecular characterization and clonal genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of pig origin in Taiwan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 35, 513–521.

59. Madarame H., Saito M., Ogihara K., Ochiai H., Oba M., Omatsu T., Tsuyuki Y., Mizutani T., 2017. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* meningoencephalitis in a cat. *Vet Microbiol.*, 204, 43–45.

60. Matlova L, Dvorska L, Ayele W. Y., Bartos M., Amemori T., Pavlik I., 2005. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J Clin Microbiol.*, 43(3), 1261–8.

61. Matlova L., Dvorska L., Bartl J., Bartos̃ M., Ayele W. Y., Alexa M., Pavlik I., 2003. Mycobacteria isolated from the environment of pig farms in the Czech Republic during the years 1996 to 2002. *Vet Med Czech.*, 48 (12), 343–357.
62. Martínez J., Jaro P. J., Aduriz G., Gómez E. A., Peris B., Corpa J.M., 2007. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. *Vet. J.*, 174, 160–164.
63. Martín-Hernando M. P., Höfle U., Vicente J., Ruiz-Fons F., Vidal D., Barral M., Garrido J. M., de la Fuente J., Gortazar C., 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87, 360–367.
64. Mijs W., de Haas P., Rossau R., Van der Laan T., Rigouts L., Portaels F., van Soolingen, D., 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and ‘*M. avium* subsp. *hominissuis*’ for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52(5), 1505–1518.
65. Molla B., Byrne M., Abley M., Mathews J., Jackson C.R., Fedorka-Cray P., Sreevatsan S., Wang P., Gebreyes W. A., 2012. Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of porcine origin. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 3687–3693.
66. Monger X. C., Gilbert A. A., Saucier L., Vincent A. T., 2021. Antibiotic Resistance: From Pig to Meat. *Antibiotics*, 10, 1209.
67. Moon S. M., Park H. Y., Kim S. Y., Jhun B. W., Lee H., Jeon K., Kim D. H., Huh H. J., Ki C. S., Lee N. Y., Kim H. K., Choi Y. S., Kim J., Lee S. H., Kim C. K., Shin S. J., Daley C. L., Koh W. J., 2016. Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Resistance Mutations Associated with Macrolide- Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Antimicrob Agents Chemother.*, 60(11), 6758–6765.
68. Moreno L. Z., da Costa B. L., Matajira C. E., Gomes V. T., Mesquita R. E., Silva A. P., Moreno A. M., 2016. Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from swine. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 86, 178–180.

69. Mukherjee R., Chatterji D., 2012. Glycopeptidolipids: immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope. *IUBMB Life.*, 64(3), 215–25.
70. Nishiuchi Y., Iwamoto T., Maruyama F., 2017. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* complex. *Front Med (Lausanne)*, 4, 27.
71. Oh S. I., Kim J. W., Kim J., So B., Kim B., Kim H. Y., 2020. Molecular subtyping and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates from clinically diseased pigs. *J. Vet. Sci.*, 21, e57.
72. Pate M., Ocepek M., Zdovc I., Minato C., Ohtsu Y., Matsuoka M., Honda Y., Hashimoto L., Sasaki Y., Kakuda T., Takai S., 2009. Intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs in Slovenia: Discovery of new plasmid types and assessment of genetic diversity by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Med.*, 54, 111–117.
73. Pate M., Zdovc I., Pirš T., Krt B., Ocepek M., 2004. “Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia.” *Acta veterinaria Hungarica* vol. 52, 2, 143-50.
74. Peeters L. E. J., Argudín M. A., Azadikhah S., Butaye P., 2015. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus aureus* recovered from pigs farms. *Vet. Microbiol.*, 180, 151–156.
75. Ratnatunga C. N., Lutzky V. P., Kupz A., Doolan D. L., Reid D. W., Field M., Bell S. C., Thomson R. M., Miles J. J., 2020. The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Front Immunol.*, 11, 303.
76. Renzhammer R., Loncaric I., Ladstätter M., Pinior B., Roch F.F., Spargser J., Ladinig A., Unterweger C., 2020. Detection of Various *Streptococcus* spp. and Their Antimicrobial Resistance Patterns in Clinical Specimens from Austrian Swine Stocks. *Antibiotics*, 9, 893.

77. Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M., Lagacé J., 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2584–2589.
78. Rindi L., Garzelli C., 2014. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet and Evol.*, 21, 375–383.
79. Sabat A. J., Budimir A., Nashev D., Sa-Leao R., van Dijl J. M., Laurent, F., Grundmann H., Friedrich A., 2013. ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18, 20380.
80. Salasia S. I., Wibawan I. W., Pasaribu F. H., Abdulmawjood A., Lammler C., 2004. Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia. *J. Vet. Sci.*, 5, 263–265.
81. Samutela M. T., Kwenda G., Simulundu E., Nkhoma P., Higashi H., Frey A., Bates M., Hang'ombe B. M. 2021. Pigs as a potential source of emerging livestock-associated *Staphylococcus aureus* in Africa: A systematic review. *Int. J. Infect. Dis.*, 109, 38–49.
82. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirotaki S., Kawakami T., Fukata T., Hiramatsu K., 2010. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 765–769.
83. Savini V., Catavittello C., Talia M., Manna A., Pompetti F., Di Bonaventura G., Di Giuseppe N., Febbo F., Balbinot A., Di Zacomo S., Esattore F., D'Antonio D., 2008. Lactam failure in treatment of two group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Pharyngitis patients. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 814–816.
84. Scherrer S., Stephan R., Zumthor J. P, Kipar A., Seehusen F., 2019. Morphological and Molecular Characterization of a New *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* S-Type Strain Genotype in Goats. *Front Vet Sci.*, 6(250).

85. Schrieber L., Towers R., Muscatello G., Speare R., 2014. Transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* between child and dog in an Aboriginal Australian community. *Zoonoses Public Health*, 61, 145–148.
86. Sevilla I. A, Molina E., Tello M., Elguezabal N., Juste R. A, Garrido J. M., 2017. Detection of Mycobacteria by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets. *Front Microbiol.*, 8, 1030.
87. Slany M., Ulmann V., Slana I., 2016. Avian Mycobacteriosis: Still Existing Threat to Humans. *Biomed Res Int.*, 4387461, 1–12.
88. Smith M., Do T. N., Gibson J. S., Jordan D., Cobbold R. N., Trott D. J., 2014. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Australian and Vietnamese pigs. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2, 162–167.
89. Stoś K., Rychlik E., Woźniak A., Ołtarzewski M., 2022. Red and Processed Meat Consumption in Poland. *Foods*, 11, 3283.
90. Suzuki Y., Kubota H., Madarame H., Takase F., Takahashi K., Sasaki Y., Kakuda T., Takai S., 2021. Pathogenicity and genomic features of vapN-harboring *Rhodococcus equi* isolated from human patients. *Int. J. Med. Microbiol.*, 311, 151519.
91. Szaluś-Jordanow O., Chrobak D., Pyrgiel M., Lutyńska A., Kaba J., Czopowicz M., Witkowski L., Kizerwetter-Świda M., Binek M., Frymus T., 2013. PFGE and AFLP genotyping of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from goats with Morel's disease. *Arch. Microbiol.*, 195, 37–41.
92. Takai S., Sawada N., Nakayama Y., Ishizuka S., Nakagawa R., Kawashima G., Sangkanjanavanich N., Sasaki Y., Kakuda T., Suzuki Y., 2020. Reinvestigation of the virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *Lett. Appl. Microbiol.*, 71, 679–683.






93. Tang Y., Larsen J., Kjeldgaard J., Andersen P.S., Skov R., Ingmer H., 2017. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.*, 249, 72–76.
94. Tao S., Chen H., Li N., Wang T., Liang W., 2022. The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*, 2022, 3348695.
95. Tegegne H. A., Kolářcková, I., Florianová, M., Gelbířcová, T., Madec, J.Y., Haenni, M., Karpíšková R., 2021. Detection and molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat in the retail market. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 26, 233–238.
96. Tenover F., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial straintyping. *J. Clin. Microbiol.*, 3, 2233–2239.
97. Torriani F. J, McCutchan J. A, Bozzette S. A, Grafe M. R, Havlir D. V., 1994 Autopsy findings in AIDS patients with *Mycobacterium avium* complex bacteremia. *J Infect Dis.*, 170(6), 1601–5.
98. van Ingen J., Turenne C. Y, Tortoli E., Wallace R. J., Jr, Brown - Elliott B. A., 2018. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 68(11), 3666–3677.
99. van Ingen J., Wisselink H. J, van Solt - Smits C. B, Boeree M. J, van Soolingen D., 2010. Isolation of mycobacteria other than *Mycobacterium avium* from porcine lymph nodes. *Vet Microbiol.* 144(1–2), 250– 253.
100. Vázquez-Boland J. A., Giguère S., Hapeshi A., MacArthur I., Anastasi E., Valero-Rello A., 2013. *Rhodococcus equi*: The many facets of a pathogenic actinomycete. *Vet. Microbiol.*, 167, 9–33.

101. Vela A.I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M. A., Borge C., Perea J. A., Domínguez L., Fernández - Garayzábal J. F., 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol., 41, 2498–2502.
102. Wellenberg G. J., de Haas P. E., van Ingen J., van Soelingen D., Visser, I. J., 2010. Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and wasting in pigs. Vet Rec., 167(12), 451–4.
103. Witkowski L., Rzewuska M., Cisek A. A., Chrobak-Chmiel D., Kizerwetter-Świda M., Czopowicz M., Welz M., Kita J., 2015. Prevalence and genetic diversity of *Rhodococcus equi* in wild boars (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Poland. BMC Microbiol., 15, 110.
104. Witkowski L., Rzewuska M., Takai S., Kizerwetter-Świda M., Kita J., 2016. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* in slaughtered swine, cattle and horses in Poland. BMC Microbiol., 16, 98.

8. Załączniki

Article

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

Aleksandra Kaczmarkowska ^{1,*}, Ewelina Kwiecień ², Anna Didkowska ¹, Ilona Stefańska ²,
Magdalena Rzewuska ² and Krzysztof Anusz ¹

¹ Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 02-787 Warsaw, Poland; anna_didkowska@sggw.edu.pl (A.D.); krzysztof_anusz@sggw.edu.pl (K.A.)

² Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 02-787 Warsaw, Poland; ewelina_kwiecien1@sggw.edu.pl (E.K.); ilona_stefanska@sggw.edu.pl (I.S.); magdalena_rzewuska@sggw.edu.pl (M.R.)

* Correspondence: aleksandra_kaczmarkowska@sggw.edu.pl

Abstract: According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations, pork remains the most consumed meat in the world. Consequently, it is very important to ensure that it is of the highest microbiological quality. Many of the pathogens that cause lymph node lesions in pigs are zoonotic agents, and the most commonly isolated bacteria are *Mycobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* and *Rhodococcus equi* (synonymous with *Prescottella equi*). The prevention and treatment of zoonotic infections caused by these bacteria are mainly based on antimicrobials. However, an overuse of antimicrobials contributes to the emergence and high prevalence of antimicrobial-resistant strains, which are becoming a serious challenge in many countries. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and antimicrobial resistance of the *Streptococcus* spp. ($n = 48$), *S. aureus* ($n = 5$) and *R. equi* ($n = 17$) strains isolated from swine lymph nodes with and without lesions. All isolates of *S. dysgalactiae*, *S. aureus* and *R. equi* were subjected to PFGE analysis, which showed the genetic relatedness of the tested bacteria in the studied pig populations. Additionally, selected tetracycline and macrolide resistance genes in the streptococcal strains were also studied. The results obtained in the present study provide valuable data on the prevalence, diversity, and antimicrobial resistance of the studied bacteria. Numerous isolated bacterial *Streptococcus* spp. strains presented resistance to doxycycline, and almost half of them carried tetracycline resistance genes. In addition, *R. equi* and *S. aureus* bacteria presented a high level of resistance to beta-lactam antibiotics and to cefotaxime, respectively.

Keywords: antimicrobial resistance; genetic diversity; lymph nodes; pigs; pork; *R. equi*; *S. aureus*; *S. dysgalactiae*; *S. equi*; zoonoses



Citation: Kaczmarkowska, A.; Kwiecień, E.; Didkowska, A.; Stefańska, I.; Rzewuska, M.; Anusz, K. The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1026. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061026>

Academic Editor: Dimitris C. Chatzopoulos

Received: 30 April 2023

Revised: 29 May 2023

Accepted: 6 June 2023

Published: 7 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The assessment of the microbiological quality of food is an important step in providing safe food products. Due to the fact that pork is one of the most popular meats in the world, it is especially important to ensure that it is of the highest quality. During inspection at slaughterhouses, lesions of different organs may be observed, including suppurative lesions in lymph nodes. In the case of swine, lymph node lesions may be caused by various pathogens that frequently have zoonotic potential. The bacteria most often isolated from such lesions are the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), *Mycobacterium avium* (*M. avium*), *Rhodococcus equi* (synonymous with *Prescottella equi*) (*R. equi*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and various *Streptococcus* species [1–4].

According to the available data, the Gram-positive bacteria of the genus *Streptococcus* seem to be pathogens that are relatively often associated with suppurative lesions in humans and animals, including pigs [5]. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, which is

a pyogenic pathogen from Lancefield groups A, C, G and L, is increasingly being recovered from severe invasive infections in humans worldwide [6,7]. This bacterium can cause a broad spectrum of infections in humans, including skin abscesses, cellulitis, pharyngitis, arthritis, bacteremia, endocarditis and toxic shock syndrome [6,7]. *S. dysgalactiae* is part of the normal microbiota of pigs and is also considered an important pathogen, especially in piglets [7,8]. In contrast, another beta-hemolytic species, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, was identified as an emerging pig pathogen in 2019 and is associated with sudden deaths, increased miscarriages and septicemia [9]. In humans, these bacteria cause invasive infections in immunocompromised hosts [10–12].

Purulent infections in livestock, including pigs, may also be caused by *R. equi*. This aerobic, Gram-positive, opportunistic, and facultative intracellular pathogen was first isolated in 1923 from foals with pneumonia. It is widespread in the environment but is mainly isolated from suppurative lesions of various livestock species, including pigs. Moreover, *R. equi* is mentioned as one of the most important pathogens associated with lymph node infections in swine [13]. It should be noted that *R. equi* infections have also been increasingly diagnosed in immunocompromised persons in recent years, including patients who have received organ transplants [14,15].

Another pathogen that is sometimes involved in various multidrug-resistant infections worldwide is *S. aureus*. This bacterium is a Gram-positive coccus and is an opportunistic pathogen found in both humans and animals. It causes a range of diseases, including skin and soft tissue infections, infective endocarditis and toxic shock syndrome. These infections are often difficult to treat due to the multidrug resistance of *S. aureus* strains and are associated with high morbidity, mortality and a significant economic impact [16].

Swine lymph node lesions are a significant cause of the condemnation of pig meat during slaughterhouse inspections and thus lead to significant economic losses [1,13,17]. Although these lesions in pigs are often limited to the lymph nodes of the head, sometimes the lymph nodes and organs of the thorax or abdominal cavity are also affected [1,18,19]. Despite continuous efforts to increase food safety by improving the quality of processes, the confirmed presence of many types of pathogens, e.g., *S. aureus* or *S. dysgalactiae*, in retail pork still poses a significant risk to consumers [20–22]. The molecular characterization of bacterial strains isolated from animals in slaughterhouses may be one of the most important steps to achieving effective infection control. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is one of the best typing methods and has successfully been used to study the diversity of isolates of various species recovered from different clinical samples [23,24].

Moreover, the widespread use of antimicrobials has contributed to the evolutionary selection of bacterial strains that are resistant to various antimicrobial compounds. Antimicrobial-resistant bacteria are now frequently isolated from most species of farmed animals; therefore, this resistance is increasingly threatening the efficacy of drugs, including those historically used in humans [25].

The purpose of our study was to estimate the genetic relatedness of the pyogenic zoonotic pathogen strains *Streptococcus* spp., *R. equi* and *S. aureus*, which were isolated from swine lymph nodes. Moreover, the minimum inhibitory concentration (MIC) values of selected antimicrobial agents for the studied bacteria, as well as the tetracycline and macrolide resistance determinants in streptococci, were determined.

2. Results

2.1. Bacteriological Examination

The studied pathogenic isolates belonged to *Streptococcus* spp., *S. aureus* and *R. equi* (Table 1, Figure S1). Streptococci were identified in a significant number (48 out of 199; 24.1%) of the tested samples, including 31 lymph nodes and organs with lesions (31/48; 64.58%) and 17 lymph nodes without lesions (17/48; 35.4%). Using the rapid latex test, 14 streptococcal strains (14/48; 29.2%) were classified into Lancefield group A, and 34 (34/48; 70.8%) were classified into group C. The PCR results showed that 45 *S. dysgalactiae* strains (45/48; 93.8%) and three isolates (3/48; 6.2%) were identified as *S. equi* subsp.

zoepidemicus. *R. equi* was isolated from 17 samples (17/199; 8.5%), including eight tissues with lesions (8/17; 47.1%) and nine lymph nodes without lesions (9/17; 52.9%). Based on the latex agglutination test and the PCR results, five isolates (5/199; 2.5%) were identified as *S. aureus*. One of them (1/5; 20%) was isolated from lymph nodes without lesions, and four (4/5; 80%) were isolated from tissue with lesions. Moreover, six coagulase-positive *Staphylococcus* spp. other than *S. aureus* were isolated: four from tissue with lesions and two from tissue without lesions. Additionally, *T. pyogenes* was isolated once from a mandibular lymph node with lesions. During the bacteriological examination, other bacteria were also isolated; however, due to their small number, they were not included in the analysis. These bacteria were coagulase-negative *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. and Gram-negative rods isolated from both lesions and tissues without lesions. Two strains of streptococci were isolated from individuals from whom more than two samples were taken, while three strains of streptococci and one strain of *R. equi* were isolated from an individual with generalized lesions.

Table 1. The result of microbiological examination of the lymph nodes and tissues collected from pigs in this study (total number of isolates = 70).

Samples	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
L.n. mandibular with lesions (<i>n</i> = 86)	28	0	4	8
L.n. mandibular without lesions (<i>n</i> = 113)	14	3	1	9
L.n. mediastinal with lesions (<i>n</i> = 1)	1	0	0	0
L.n. of the hilum of a liver with lesions (<i>n</i> = 1)	1	0	0	0
Liver with lesions (<i>n</i> = 1)	1	0	0	0
L.n. of the first rib with lesions (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0
L.n. retropharyngeal with lesions (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0
L.n. tracheobronchial with lesions (<i>n</i> = 2)	0	0	0	0
L.n. mesenteric with lesions (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0
Lung with lesions (<i>n</i> = 1)	0	0	0	0
Total	45	3	5	17

L.n.—Lymph node.

2.2. Phenotypes and Genotypes of Antimicrobial Resistance

Antimicrobial susceptibility testing was carried out for 45 *S. dysgalactiae* strains, 3 strains of *S. equi* subsp. *zoepidemicus*, 17 *R. equi* strains, and 5 strains of *S. aureus*. The MIC value distributions (MIC₅₀ and MIC₉₀) of eight tested antimicrobials for the studied isolates are shown in Table 2. Additionally, the genotypes of resistance to tetracyclines and macrolides were determined for the *S. dysgalactiae* strains. The distribution of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the eight antimicrobial agents for the tested isolates of *Streptococcus* spp., *R. equi* and *S.s aureus* from pigs is provided in Supplementary Tables S1–S3.

Table 2. Minimal inhibitory concentrations of 50 and 90 of selected antimicrobials for *Streptococcus* spp. isolates ($n = 48$), *R. equi* isolates ($n = 17$) and *S. aureus* isolates ($n = 5$).

Antimicrobial Agent ^a		MIC ($\mu\text{g/mL}$)		MIC Breakpoints ($\mu\text{g/mL}$) ^b	
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	S	R
<i>Streptococcus</i> spp.	PEN	0.0006	0.016	≤ 0.25	$>16^c$
	AMC	0.016	0.047	$\leq 0.25/0.12$	$\geq 1/0.5^d$
	CTX	0.032	0.094	≤ 2	$\geq 8^d$
	CIP	0.5	0.75	≤ 0.5	$>2^c$
	ERY	0.19	0.75	≤ 1	$>4^c$
	DOX	0.5	24	≤ 4	$>8^c$
	GEN	1.5	3	≤ 250	$>500^c$
	SXT	0.38	3	$\leq 2/38$	$>8/152^c$
<i>Rhodococcus equi</i>	PEN	12	>32	≤ 0.25	$>0.25^c$
	AMC	1.5	2	$\leq 0.25/0.12$	$\geq 1/0.5^d$
	CTX	>32	>32	≤ 2	$\geq 8^d$
	CIP	0.75	1.5	≤ 2	$>2^c$
	ERY	0.25	0.38	≤ 0.5	$\geq 8^e$
	DOX	8	12	≤ 4	$\geq 16^e$
	GEN	0.5	0.75	≤ 1	$>1^c$
	SXT	2	>32	$\leq 2/38$	$>8/152^c$
<i>Staphylococcus aureus</i>	PEN	0.032	0.125	≤ 0.25	$>0.25^c$
	AMC	0.125	0.25	$\leq 0.25/0.12$	$\geq 1/0.5^d$
	CTX	4	>32	≤ 2	$\geq 8^d$
	CIP	0.25	0.75	≤ 2	$>2^c$
	ERY	0.094	0.5	≤ 1	$>4^c$
	DOX	0.38	0.5	≤ 4	$>8^c$
	GEN	0.19	0.19	≤ 1	$>1^c$
	SXT	0.19	0.38	$\leq 2/38$	$>8/152^c$

^a PEN—Penicillin; AMC—amoxicillin/clavulanic acid; CTX—cefotaxime; CIP—ciprofloxacin; ERY—erythromycin; DOX—doxycycline; GEN—gentamicin; SXT—trimethoprim-sulfamethoxazole; ^b S—susceptible; R—resistant. ^c According to the CA-SFM document VET2021 [26]; ^d according to the CLSI document VET08 [27]; ^e according to the CLSI document VET06 [28].

2.2.1. Study for *S. aureus*

Among the tested *S. aureus* strains, all were susceptible to PEN, AMC, CIP, ERY, DOX, GEN and SXT. According to the used criterion, two strains (2/5; 40%) showed resistance to CTX, with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 12 $\mu\text{g/mL}$ and $>32 \mu\text{g/mL}$, respectively. The remaining three strains (3/5; 60%) were classified as intermediate to CTX, with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 4 $\mu\text{g/mL}$ and $>32 \mu\text{g/mL}$, respectively.

2.2.2. Study for *Streptococcus* spp.

In the case of the *S. equi* subsp. *zoepidemicus* strains, their susceptibility to almost all the tested antimicrobial agents was found, including PEN, AMC, CTX, CIP, GEN, ERY and DOX. Two of the three tested strains (66.7%) were also susceptible to SXT, but one of them (1/3; 33.3%) was categorized as intermediate. All *S. dysgalactiae* strains ($n = 45$) were susceptible to the β -lactam antibiotics tested in this study, including PEN, AMC and CTX. Moreover, all strains were also susceptible to CIP and GEN. A similarly high susceptibility was observed for SXT: the vast majority of strains were susceptible (40, 88.9%), and a few were resistant (3, 6.7%) and intermediate (2, 4.4%). Four strains were resistant to ERY, all of them with an MIC value $>256 \mu\text{g/mL}$. More strains, 24 (50%) in total, were resistant to DOX, with an MIC ranging from 12 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$. Five of forty-five (11.1%) *S. dysgalactiae* strains (S1', S27, S44, S61 and S115—two of which were isolated from the same herd) were concurrently resistant to 2 antimicrobials tested in this study (resistance phenotype: ERY/DOX). Generally, among the strains isolated from pigs from the same farm, differences in antimicrobial resistance profiles were noticeable.

Twenty-one of forty-five *S. dysgalactiae* strains (46.7%) were positive during the PCR with universal primers for the detection of tetracycline ribosome protection protein genes. Eighteen strains (40%) harbored the *tetM* gene, and three (6.8%) harbored *tetO*. Two strains, isolated from pigs from the same herd, carried both tetracycline resistance genes, *tetM* and *tetO*. In the case of one strain, the product of the reaction with universal primers was detected but not with the tested primers for specific genes. Four erythromycin-resistant strains (8.9%) were positive for the *ermB* gene. All *S. dysgalactiae* isolates tested in this study were negative for *tetK/L* and *ermA* genes.

2.2.3. Study for *R. equi*

All 17 strains of *R. equi* (100%) showed resistance to PEN. However, 12 strains (70.6%) showed resistance to CTX, while 5 (29.4%) were grouped as CTX intermediate. In the case of AMC, 15 strains (88.2%) were resistant and 2 (11.8%) were intermediate. All tested strains were susceptible to ERY. Generally, the vast majority of strains were also susceptible to CIP and GEN, but one strain was resistant to both of them. In the case of DOX, 13 strains (76.5%) were classified as intermediate. Resistance to SXT was observed for six strains (35.3%), while one strain (5.9%) was intermediate, and ten strains (58.8%) were susceptible to this antimicrobial. Resistance phenotypes with three or four antimicrobial agents were observed, including PEN/AMC/CTX/SXT (S107, S116, S124 and S175), P/AMC/CTX (S81, S83, S87, S125, S128, S132 and S170), PEN/AMC/SXT (S29), PEN/CTX/SXT (S11) and PEN/CIP/GEN (S177). Strains isolated from the same herds did not present the same resistance profiles.

2.3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis

2.3.1. *S. aureus*

PFGE analysis showed three different pulsotypes among five *S. aureus* isolates. One pulsotype grouped three strains, while two strains showed a specific pulsotype. One cluster was distinguished that grouped four strains with a similarity index of 84.2% (Figure 1). Each of the animals from which *S. aureus* strains were isolated represented a different herd.

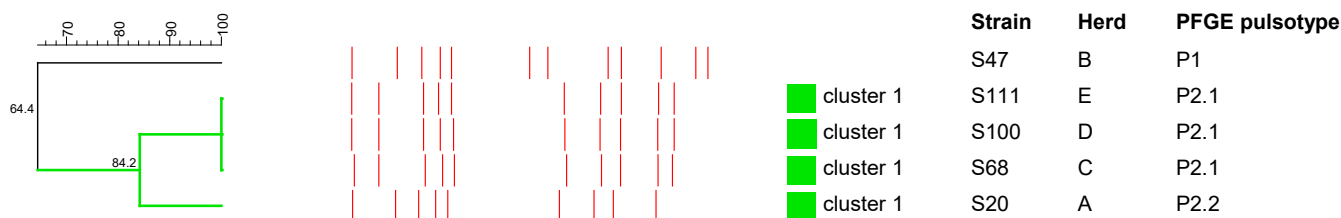


Figure 1. Dendrogram showing the degree of similarity among the five tested *S. aureus* strains based on the results of PFGE analysis. Red lines show the obtained PFGE patterns. One cluster (green square) was defined from groups of closely related strains sharing at least 80% similarity.

2.3.2. *Streptococcus* spp.

All 48 isolates of *Streptococcus* spp. were analyzed by PFGE. Three strains of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* that were obtained from different herds showed the same pulsotype. On the other hand, broad genetic diversity was obtained for the remaining 45 *S. dysgalactiae* strains isolated from 42 animals. The dendrogram analysis showed seven clusters with similarity indexes ranging from 85.7% to 100% after *SmaI* DNA digestion (Figure 2). These clusters grouped two strains (clusters 1, 4 and 7), three strains (clusters 2 and 3), four strains (cluster 6) and thirteen strains (cluster 6). Clusters 2, 5 and 6 included some strains from the same herds. A total of 25 pulsotypes were observed among the tested *S. dysgalactiae* strains. The most common pulsotype was characteristic of twelve strains. One pulsotype grouped four strains, one grouped three strains, and four grouped two strains each. Unique pulsotypes were observed for 18 strains. In addition, the PFGE analysis showed that

genetically different *S. dysgalactiae* strains circulated within a single herd, while genetically similar or identical strains occurred in different herds.

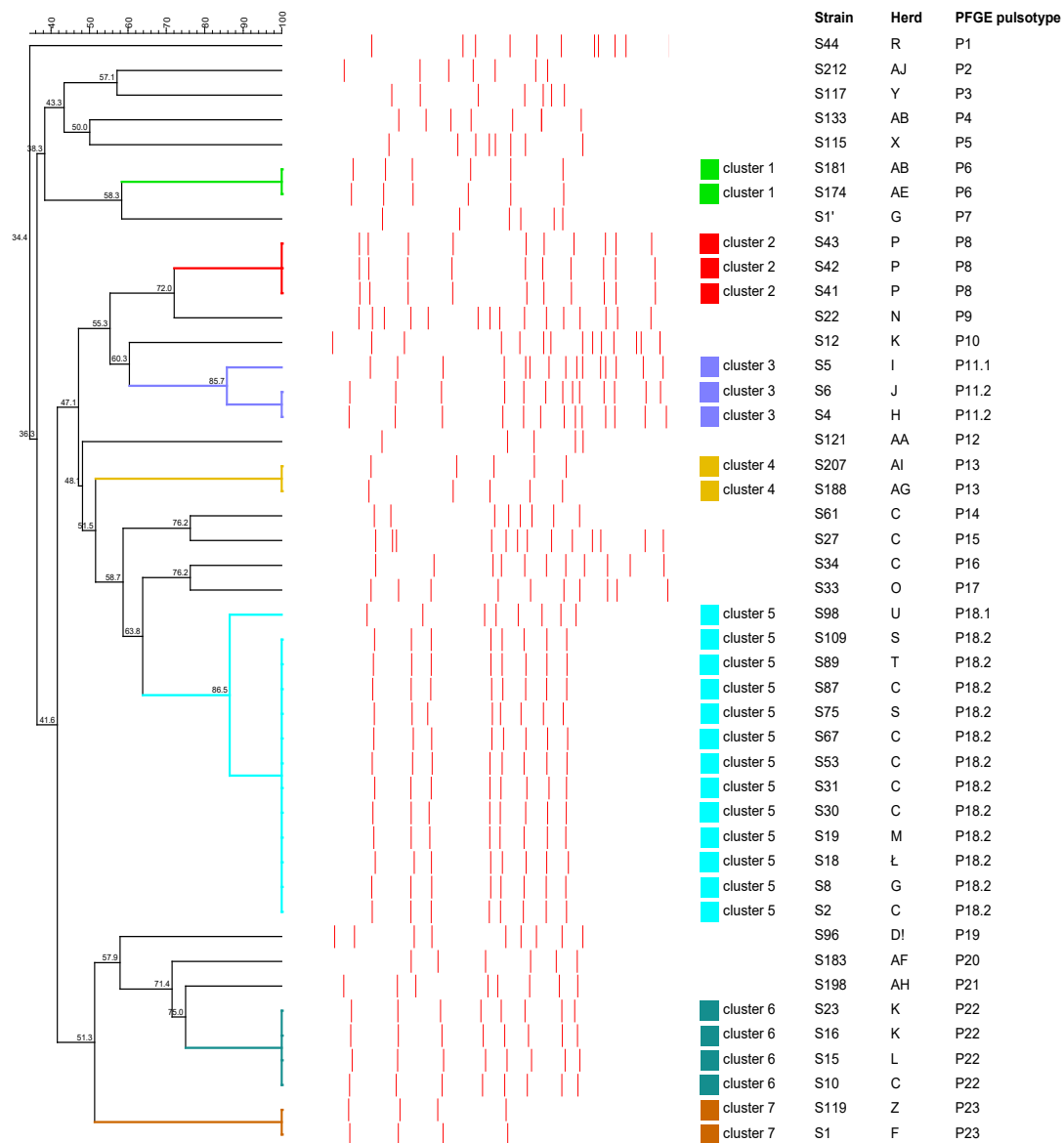


Figure 2. Dendrogram showing the degree of similarity among 45 tested *S. dysgalactiae* strains based on the results of PFGE analysis. Red lines show the obtained PFGE pulsotypes. Seven clusters (colored squares) were defined from groups of closely related strains sharing at least 80% similarity.

In one case, two different pulsotypes were obtained from different organs of the same animal with a similarity of 36.3%. In another case, three pulsotypes were obtained from the same animal from different organs, two of which (S30 and S31) belonged to the same cluster: the first two had a similarity of 100%, and the third (S27) had 58.7% similarity.

The evaluation of the dendrogram showed no significant difference between isolates from lesioned and non-lesioned lymph nodes. For isolates from lesioned lymph nodes ($n = 31$), we obtained 19 pulsotypes and distinguished five clusters, while for isolates from non-lesioned lymph nodes ($n = 14$), we obtained 11 pulsotypes and distinguished four clusters.

2.3.3. *R. equi*

The PFGE analysis showed high genetic diversity among 17 *R. equi* isolates. Eleven different pulsotypes were obtained. Pulsotype 6.2 was the most prevalent as it was found in five isolates, followed by pulsotypes 6.3 and 7, which were found in two isolates each. Eight *R. equi* strains each presented a unique pulsotype (Figure 3). Both same and different pulsotypes were present in animals from the same farm. Two clusters that grouped nine and two strains with 81.3% and 100% similarity, respectively, were distinguished.

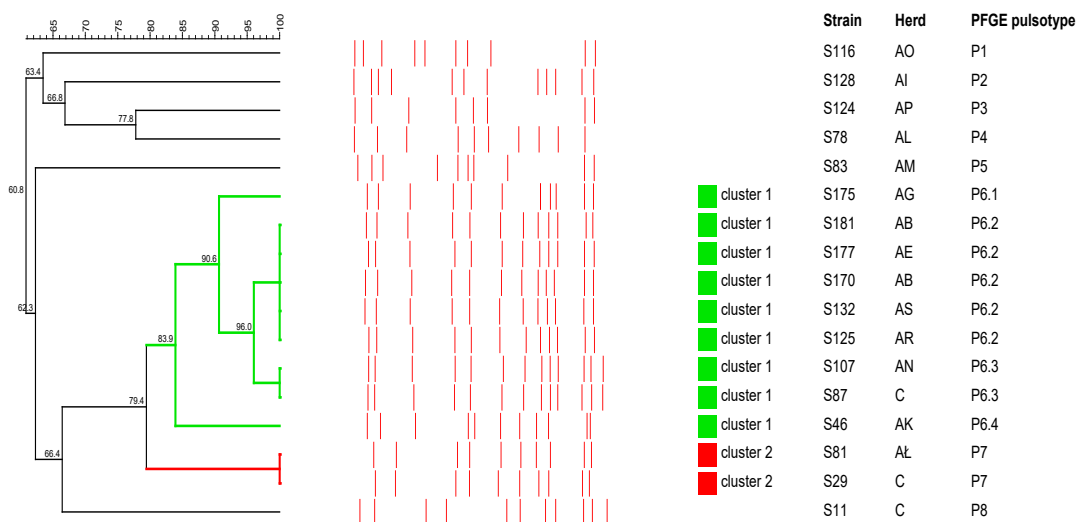


Figure 3. Dendrogram showing the degree of similarity among the tested *R. equi* strains based on the PFGE typing. Red lines show the obtained PFGE patterns. Two clusters (colored squares) were defined from groups of closely related strains sharing at least 80% similarity.

3. Discussion

In this research, we evaluated the genetic relatedness and antimicrobial resistance of bacteria isolated from pig lymph nodes collected during post-mortem examination at a slaughterhouse. One of the main limitations of this study was the restriction of the geographic area of the study to Poland as the pigs came from only three provinces: Wielkopolska (Greater Poland), Łódzkie and Kujawsko-Pomorskie. Another limitation was the freezing of lymph nodes prior to testing, which may have resulted in the reduced growth of some bacterial species.

The farm types and herd sizes are typical of Poland [29]. In our study, we isolated bacteria from lymph nodes both with and without lesions. Pathogens isolated from lymph nodes in pigs may be zoonotic, including *S. aureus* [30], *S. dysgalactiae* [31,32], *S. equi* subsp. *zooepidemicus* [11], *R. equi* [33,34] and *T. pyogenes* [35]. Not only pork consumers but also abattoir workers, veterinarians and other industry workers who come into direct contact with infected tissues are particularly vulnerable to infection from these microorganisms.

The microbiological analysis showed that 48 isolates belonged to *Streptococcus* spp., including 45 *S. dysgalactiae* and 3 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*; 17 isolates were *R. equi*; and 5 were *S. aureus*. The obtained results are similar to previously published reports regarding isolated pathogens, but the frequency of the isolation of each species varied [1,5,13,17,36]. In a study conducted by Lara et al. (2011), *R. equi* and *Streptococcus* spp. were the predominant species isolated from porcine lymph nodes, similarly to in our study. Generally, *Streptococcus* spp. were often isolated as one of the main pathogens from purulent lesions of lymph nodes in pigs [1,5,17]. On the other hand, it should be mentioned that the frequency of *T. pyogenes* isolation in this study was much lower than previously reported in pigs [1,5].

However, compared to previous reports, significantly more pathogens were isolated from lymph nodes without lesions in our study [14]. In two cases, both *S. dysgalactiae* and

R. equi were isolated from the same lymph node without lesions. The isolation of a few kinds of bacteria from one lymph node sample has previously been reported [17].

The most common bacterium isolated in this study was *S. dysgalactiae*. However, the identification of *S. dysgalactiae* strains into subspecies was not performed because the taxonomy of *S. dysgalactiae* remains unclear. Recent studies indicate that *S. dysgalactiae* may be segregated into two distinct groups: one includes only human strains, while the other includes animal strains of swine, canine and equine origin, as well as more phylogenetically distinct bovine strains [37]. Most *S. dysgalactiae* isolates in this study belonged to Lancefield group C, as is consistent with previous reports [7,38], but some isolates belonged to group A. To date, there are no reports in the literature of infections caused by *S. dysgalactiae* from Lancefield group A in pigs. Moreover, it should be highlighted that the presence of group A *S. dysgalactiae* strains are very rare. It is worth noting that *S. dysgalactiae* group A has zoonotic potential and has been reported in patients with bacteremia [39].

To assess genetic relatedness, we used the PFGE method, which has been recognized as the “gold standard” due to its excellent discriminatory power in studies of various groups of bacteria [23,40]. High genetic variation was observed for *S. dysgalactiae* strains of 25 different PFGE pulsotypes. These results are consistent with previous studies on the genetic diversity of streptococci from animals, including *S. dysgalactiae* [5,9]. The PFGE method used showed a high degree of intra-species polymorphism, both between isolates from different hosts and between isolates from the same host. As in the study by Cardoso-Tosset et al. (2020) [5], the PFGE analysis showed that genetically different *S. dysgalactiae* isolates circulated within one herd, while genetically similar isolates circulated in different herds. The significant polymorphism revealed by the PFGE method among *S. dysgalactiae* strains confirms that it is a highly discriminating tool in epidemiological studies of animal infections caused by this bacterium.

Low diversity in PFGE patterns was observed for the *S. equi* subsp. *zoepidemicus* and *S. aureus* strains; however, it should be noted that the number of tested strains was limited. Three *S. equi* subsp. *zoepidemicus* strains from different farms were of a single pulsotype. This is in line with the results of genotyping *S. equi* subsp. *zoepidemicus* isolates from pigs and monkeys in Indonesia [12].

In the case of *S. aureus*, three pulsotypes were obtained for five strains from different herds, and four strains belonged to one cluster. There are limited data in the literature on the PFGE typing of *S. aureus* strains isolated from pigs [41,42]. In our study, PFGE patterns showed high similarity. Comparable results were obtained in a study by Broens (2011), which found that MRSA-negative pigs can be colonized by MRSA-positive strains during transport from farm to slaughterhouse, suggesting that the source of MRSA colonization in pigs could be contaminated trucks, slaughterhouses or staff. In addition, mixing pigs from different farms in transport and in slaughterhouse livestock stores could also lead to colonization by MRSA strains [41,43]. However, there are also reports indicating wide variation in PFGE patterns between MRSA strains isolated from pigs, thus suggesting extensive DNA rearrangements and the potential for the gain or loss of genetic traits, i.e., genomic events occurring over short timescales [44].

Genotyping *R. equi* strains by PFGE showed high genetic diversity between the studied isolates. Two isolates (S170 and S181) from the same farm (AB) showed the same pulsotype; however, the same pulsotype was also found in isolates (S125, S132 and S177) from pigs from different farms (AE, AR and AS). Similar results were obtained by Pate et al., who evaluated the genetic diversity of *R. equi* isolated from pigs in Slovenia [45].

In our study, the strip diffusion method, which is widely applied in diagnostic laboratories, was used to assess antimicrobial susceptibility. The studied streptococcal strains showed the lowest MIC values for β -lactam antibiotics, aminoglycosides, fluoroquinolones and sulfonamides, while tetracyclines and macrolides presented the highest MIC values. There are only a few reports on the antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolates from pigs. The results of our study confirmed that β -lactam antibiotics are the best choice for treatment, which is consistent with previous studies in pigs and humans [7,46]. In

our study, macrolides and tetracyclines showed the highest MIC₅₀ and MIC₉₀ values among the dilution ranges tested, which is consistent with antibiotic resistance studies on *S. dysgalactiae* strains from pigs from Brazil, Austria and Korea [7,46,47]. It is noteworthy that macrolides and tetracyclines are commonly used to treat infections in livestock, and in our study, resistance to these classes of antibiotics was found in strains isolated from lymph nodes both with and without lesions. Interestingly, a study by Korean researchers on the antimicrobial susceptibility of human *S. dysgalactiae* strains showed a marked increase in the prevalence of erythromycin resistance: from 9.4% to 34.8% [48]. The results of our study appear to be an important public health warning as people with tonsillopharyngitis due to streptococcal infection who are allergic to β -lactam antibiotics are usually treated with macrolides as an alternative antimicrobial therapy. If macrolide resistance is confirmed, then tetracyclines and fluoroquinolones should be considered as a second choice [7,49].

Moreover, in this research, the occurrence of macrolide and tetracycline resistance genes among *S. dysgalactiae* strains was investigated. There are few reports of antimicrobial resistance in *S. dysgalactiae* swine strains. In comparison to data from a Korean study published in 2020, we obtained the same results regarding the lack of the *ermA* gene in the *S. dysgalactiae* strains studied [7]. In contrast, the *ermB* gene in this study was present in 7.8% of the strains tested, while in the study by Sang Oh et al., 18.2% of the strains carried this gene [7]. Among tetracycline resistance genes, our results differed from previous studies. In our study, the *tetM* gene was more dominant (42.2%) compared to the *tetO* gene (6.8%); in isolates from Korea, *tetO* was predominant (90.9%), and *tetM* was carried by 18.2% of strains [7]. However, similarly to our results, the *tetK* and *tetL* genes were not detected [7]. There is a noticeable discrepancy between the phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *S. dysgalactiae* isolates. This can be explained by the observation, as reported by Smith M. et al., that the bacterial resistance phenotype possessed is not always an accurate reflection of antimicrobial resistance genes [7,50]. In addition, the presence in the tested strains of other genes that were not detected in this study cannot be ruled out.

All tested *S. aureus* isolates showed susceptibility to some β -lactam antibiotics, aminoglycosides, macrolides, tetracyclines and sulfonamides. Of the five strains, two were resistant (40%), and three had an intermediate susceptibility (60%) to CTX. Comparing our results to previous studies, we did not find resistance to tetracyclines, penicillins, macrolides, or lincosamides, whereas resistance to all four groups was found among the *S. aureus* strains isolated from pigs at farmers' markets in the US [51]. The strains we tested were significantly more susceptible to antibiotics compared to the strains described in a Belgian swine survey in 2013, in which 98.6% of strains showed resistance to tetracycline, 96.2% to trimethoprim, 61.1% to ciprofloxacin, 57.8% to erythromycin and 45.5% to gentamicin [52]. In addition, these authors showed a significant increase in resistance to ciprofloxacin, from 32% to 61.1% year-on-year [52].

All tested *R. equi* strains were shown to be susceptible to macrolides, and the vast majority of strains were also susceptible to fluoroquinolones and aminoglycosides, which is consistent with data from the literature [53]. There are no publications that provide data on drug resistance in *R. equi* from pigs, making our findings impossible to compare. However, a high susceptibility to aminoglycosides and tetracyclines and a relative susceptibility to macrolides were noted for isolates obtained from horses [54]. The presence of *R. equi* strains classified as moderately sensitive to tetracyclines in our study may be related to the method we used because some research has suggested that the strip diffusion method may underestimate MIC values for this class of antibiotics [54]. Thus, it can be presumed that the tested strains were resistant to tetracyclines. The high resistance of *R. equi* strains to β -lactam antibiotics observed in our study was not surprising since this is not uncommon [55].

In Poland, pork is the most frequently consumed type of meat [56]; thus, it seems important to know the microbiological factors present in the lymph nodes. The characteristics of isolates, including the assessment of their drug resistance, makes it possible to determine their zoonotic potential and whether they pose a potential threat to consumer health. This

is particularly important considering that pork sausages that are not subject to thermal processing are produced in Poland and many regions of the world.

Research into the prevalence of *Mycobacteriaceae* in swine lymph nodes has been described previously [2].

4. Materials and Methods

4.1. Material Collection

During post-mortem inspection in slaughterhouses, mandibular lymph nodes were collected from 199 pigs. (In two cases, two samples were collected from 1 individual pig. In one case, seven samples were collected from 1 individual pig as general lesions were found throughout the carcass. Tracheobronchial, mediastinal, first rib, mesenteric and porta hepatitis lymph nodes were collected for examination. Lung and liver organ samples were also collected.) Lymph nodes, organs with lesions ($n = 95$) and randomly selected unchanged mandibular lymph nodes ($n = 113$) were then tested for the presence of the selected pyogenic bacteria. The material for the research was collected in two slaughterhouses in the Greater Poland region, while the animals came from 83 farms located in central Poland, with an average number of 117 individuals in a herd. The mean age of the pigs was 6.4 months. Of the 199 pigs tested, 99 were male and 100 were female. The collected material was stored in a freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ before analysis.

4.2. Bacterial Isolation and Identification

After thawing, the tissues were minced with sterile scissors and placed into bags with a BagPack (BagPage[®] 100) filtering membrane. Then, sterile 0.9% saline solution was added and homogenized using a stomacher at 12 strokes/1 s. The resulting suspension was poured into 15 mL tubes and centrifuged at $1500\times g$. In the next step, the supernatant was poured out, and the pellet was used for further analysis.

After homogenization, the supernatant was transferred to Columbia Agar supplemented with 5% sheep blood (CAB) (Graso Biotech, Starogard Gdański, Poland) using sterile cotton swabs. It was then smeared and cultured for 48 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under microaerophilic conditions. Isolates of the tested bacterial species were primarily identified based on their growth features, including the type of hemolysis on CAB; the cell morphology, including Gram staining; and the catalase activity. Moreover, for the identification of *R. equi*, the CAMP test with *S. aureus* ATCC[®]25923 reference strain was performed. The result of the CAMP test was read after 48 h of incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under aerobic conditions. The Microgen[®]Staph latex agglutination tests (Graso Biotech, Starogard Gdański, Poland) were performed to identify *S. aureus* isolates. The identification of *S. aureus* isolates was confirmed using the PCR technique, as described previously [57]. *Streptococcus* spp. isolates were identified at the species level based on a PCR assay using *Sdy519* and *Sdy920* primers designed for the highly divergent and species-specific region of the gene encoding 16S rRNA of *S. dysgalactiae* [58] or a PCR assay with the primer sets *SodA-F* and *SodA-R* for the *sodA* gene of *S. equi* [59]. The differentiation of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and *S. equi* subsp. *equi* was performed by detecting the *seeI* gene encoding superantigenic toxin of *S. equi* subsp. *equi*, as described by Alber et al. (2004). Additionally, the Microgen[®]Strep latex agglutination test (Graso Biotech, Starogard Gdański, Poland) was used to serotype the streptococci isolates. All studied isolates were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a tryptic soy broth (TSB) containing 20% glycerol (v/v) for future use.

4.3. DNA Extraction

The boiling method was used to extract DNA from all tested isolates. Colonies grown on CAB were suspended in 500 μL of nuclease-free water. The suspension was heated at $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, after which it was cooled on ice and centrifuged (6 min, $8000\times g$). The supernatant was collected, stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and used for further PCR studies.

4.4. Antimicrobial Susceptibility Testing

Using a strip diffusion method with Liofilchem[®] MIC Test Strips (Liofilchem, Via Scozia, Italy), the MIC values for eight antimicrobials were determined for the tested isolates: amoxicillin with clavulanic acid (AMC; 0.016–256 µg/mL), penicillin (PEN; 0.002–32 µg/mL), cefotaxime (CTX; 0.002–32 µg/mL), erythromycin (ERY; 0.016–256 µg/mL), doxycycline (DOX; 0.016–256 µg/mL), gentamicin (GEN; 0.016–256 µg/mL), ciprofloxacin (CIP; 0.002–32 µg/mL) and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT; 0.002–32 µg/mL). The bacterial suspension in saline (a density of 0.5 McFarland standard) was inoculated on Mueller–Hinton Agar supplemented with 5% sheep blood (Graso Biotech, Starogard Gdański, Poland). The plate was covered with strips and was incubated for 24 h at 37 °C under aerobic conditions. The testing conditions used in the study were in accordance with the CLSI guidelines [27] for the studied bacterial species. The MIC value was read at the point where the edge of the growth inhibition ellipse intersected the strip. Moreover, the MIC50 (antibiotic concentration required to inhibit the growth of 50% of isolates) and MIC90 (antibiotic concentration required to inhibit the growth of 90% of isolates) values were determined for each antimicrobial agent. Three reference strains, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC[®]12394, *S. aureus* ATCC[®]25923 and *R. equi* ATCC[®]6939, were also included in the study for quality control.

The MIC breakpoints used in this study are shown in Table 2. In the case of *Streptococcus* spp., the MIC breakpoints for PEN, CIP (as for enrofloxacin), ERY, DOX (as for tetracycline), GEN and SXT were based on the criteria recommended for *Streptococcus* spp., as defined by the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (CA-SFM) guidelines VET2021 [26]. For CTX, the criterium for cefpodoxime specific to *Streptococcus canis* according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines VET08 was adopted [27]. Moreover, the criterium for *Streptococcus* spp. isolates from cats against AMC was also adapted from CLSI VET08 [27]. For *S. aureus*, the criteria for PEN, CIP (for enrofloxacin), ERY, DOX (for tetracycline), GEN and SXT were as defined for *Staphylococcus* spp. in the CA-FSM guidelines VET2021 [26]. The MIC breakpoint for CTX was the same as that for cefpodoxime in the CLSI VET08 document for *S. aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in the case of dogs, and AMC was also adapted from the same guidelines as criteria for *Streptococcus* spp. categorization of canine isolates [28]. For *R. equi*, ERY and DOX were interpreted according to the criteria adopted for *R. equi* in CLSI document VET06 [29], while other antimicrobials were referenced to *Staphylococcus* spp. values according to the CA-FSM guidelines VET2021 and CLSI VET08 [26,27].

4.5. Detection of Antimicrobial Resistance Genes

The presence of genes commonly associated with erythromycin resistance (*ermA* and *ermB*) and tetracycline resistance (*tetK/L*, *tetM* and *tetO*) was assessed for the streptococci strains using PCR with the primers and conditions presented in Table 3. Universal primers that detect tetracycline resistance genes encoding ribosome protection proteins were used first. Then, in the case of the isolates that tested positive in this reaction, the specific primers for *tetM* and *tetO* were used. All PCR mixtures contained 1 µL of each primer (10 pmol/µL), 12.5 µL of DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 40 ng of DNA template and nuclease-free water up to 25 µL. Reaction products were recognized by electrophoresis in 1% (*w/v*) agarose gel in Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer with Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics, Düren, Germany), visualized and analyzed using a Gel Doc[™] EZ Imaging System with Image Lab Software (version 5.2.1) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Table 3. Primers and PCR conditions used in this study.

Primer Designation	Primer Sequence (5'-3')	Target Gene	Annealing Temperature (°C)	Amplicon Size (bp)	Reference
DI_F	GAYACICCGGICAYRTIGAYTT	<i>Tet</i> ^a	53 ^b	1100	[60]
DII_R	GCCCARWAIGGRTTIGGGIACYTC				
tetM_F	TAAATAGTGTCTTGGAG	<i>tetM</i>	54 ^c	656	[61]
tetM_R	CTAAGATATGGCTCTAACAA				
tetO_F	GGCGTTTGTATTATGTGCG	<i>tetO</i>	50 ^c	559	[62]
tetO_R	ATGGACAACCCGACAGAAGC				
TKL_F	CCTGTTCCCTCTGATAAA	<i>tetK/L</i>	50 ^b	1050	[63]
TL32_R	CAAACGGGTGAACACAG				
ermA_F	TCTAAAAAGCATGTAAAAAGAA	<i>ermA</i>	52 ^c	645	[64]
ermA_R	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT				
ermB_F	GAAAAGGTAACAACCAATA	<i>ermB</i>	52 ^c	639	[64]
ermB_R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTAC				

^a Universal primers that detect the tetracycline resistance genes that encode ribosome protection proteins. ^b PCR conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min; annealing for 1 min at variable temperatures; extension at 72 °C for 2 min; final extension at 72 °C for 5 min. ^c PCR conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 min; 30 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s; annealing for 45 s at variable temperatures; extension at 72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 2 min.

4.6. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

4.6.1. Analysis of *S. aureus* Isolates

The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) procedure was adapted from previous research [65,66] with some modifications. The *S. aureus* isolates collected from a 24 h culture on CAB were suspended in saline to achieve a density of 3.5 on the McFarland standard. The bacterial suspension was mixed with 2% CleanCut Agarose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The obtained agarose discs were incubated for 18 h at 37 °C in a lysis solution with 2 mg/mL of lysozyme (Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, Baden-Württemberg, Germany), 5 µg/mL of RNase (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and 50 µg/mL of lysostaphin (A&A, Gdańsk, Biotechnology). After the indicated time, the discs were transferred to the solution with 1 mg/mL of proteinase K (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland), where they were incubated for 24 h at 50 °C. The agarose discs were digested with *Sma*I (20 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) overnight at 25 °C. The restriction fragments were separated in 1.2% agarose gel (*w/v*). The separation program was a running time of 20, a temperature of 14 °C, a voltage gradient of 6 V/cm, an initial pulse time of 5 s and a final pulse time of 30 s. The reference strain *S. aureus* ATCC[®]25923 was also used in this study.

4.6.2. Analysis of *Streptococcus* spp. Isolates

PFGE was performed as described by Vela et al. (2003) [24] with some changes. Briefly, the overnight cultures of *Streptococcus* spp. isolates on CAB were suspended in saline to obtain a density of 4 according to the McFarland standard. An equal volume of bacterial suspension and 2% CleanCut Agarose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were mixed to prepare agarose discs. The agarose discs were incubated overnight at 37 °C with 1 mg/mL of lysozyme (Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, Baden-Württemberg, Germany) and then incubated for another 24 h at 50 °C with 500 µg/mL of proteinase K (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). To perform the restriction digest, a solution with 20 U/µL of *Sma*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was prepared and incubated overnight at 25 °C. A total of 1.1% (*w/v*) agarose gel was used for the electrophoresis with the following parameters: a running time of 21 h, a temperature of 14 °C, a voltage gradient of 6 V/cm, an initial pulse time of 1 s and a final pulse time of 30 s. The reference strain *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC[®]12394 was also used in this study.

4.6.3. Analysis of *R. equi* Isolates

PFGE was performed as previously described [67,68] with minor modifications. Briefly, overnight cultures of *R. equi* in brain–heart infusion (BHI) broth with 1% glycerol, 0.4% glucose and 0.2% TWEEN[®]85 were adjusted to OD₆₀₀ 0.65, and the cells were incorporated into 1.5% (*w/v*) agarose discs using Top Vision Low Melting Point Agarose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After 18 h lysis with 20 mg/mL of lysozyme (Sigma-Aldrich, Germany) and 50 µg/mL of RNase (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) at 37 °C, the discs were incubated overnight with 20 mg/mL of proteinase K (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) at 50 °C. Then, the agarose discs containing DNA were digested with 10 U/µL of *VspI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) overnight at 37 °C. For the electrophoresis, 1.1% (*w/v*) agarose gel was used with running conditions as follows: a running time of 22 h, a temperature of 14 °C and a voltage gradient of 6 V/cm. The program ran twice: during the first run (7 h), an initial pulse time of 6 s and a final pulse time of 15 s were used; during the second run (15 h), an initial pulse time of 23 s and a final pulse time of 40 s were used. The reference strain, *R. equi* ATCC[®]6939, was also used in this study.

The restriction fragments of the tested isolates were separated by clamped homogeneous electric field electrophoresis with a CHEF-DR II System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a 0.5× TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide for 15 min, destained in distilled water and visualized and photographed using a Gel Doc[™] EZ Imaging System with Image Lab Software (version 5.2.1) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). BioNumerics software version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used for the PFGE results analysis. The cluster analysis was performed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) using the Dice similarity coefficient with optimization and position tolerance set at 1%. The strains were clustered using an 80% homology cut-off, above which strains were assigned to the same cluster because they were considered to be closely related [69].

5. Conclusions

In summary, in this study, the most common pyogenic bacteria isolated from swine lymph nodes, including lymph nodes without lesions, were *S. dysgalactiae*, *R. equi* and *S. aureus*. The occurrence of pathogenic bacteria in lymph nodes without lesions is alarming because this prevents pathogen detection during meat inspection at slaughterhouses. In addition, it should be noted that some bacterial strains showed antimicrobial resistance and carried antibiotic-resistant genes. Thus, the presence of these potentially zoonotic pathogens should be considered when testing meat from slaughtered pigs. Moreover, pork can be a potential source of bacteria, thus causing a significant risk to human health. Therefore, it seems reasonable to monitor the occurrence of these bacteria in pig herds.

In addition, it should be highlighted that bacterial strains with the same PFGE profile occurred in pigs from the same herd, suggesting the possibility of pathogen transmission between animals.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics12061026/s1>. Table S1: Distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) of eight antimicrobial agents; MIC₅₀ and MIC₉₀ values for the studied *Streptococcus* spp. isolates from pigs (*n* = 48). Table S2: Distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) of eight antimicrobial agents; MIC₅₀ and MIC₉₀ values for the studied *Rhodococcus equi* isolates from pigs (*n* = 17). Table S3: Distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) of eight antimicrobial agents; MIC₅₀ and MIC₉₀ values for the studied *Staphylococcus aureus* isolates from pigs (*n* = 5). Figure S1: Location of slaughterhouses and farms of the studied pigs, from which pyogenic bacteria were isolated. Location of farms where pyogenic pathogens were isolated from pigs and location of slaughterhouses. Black dot—slaughterhouse; blue dot—*S. dysgalactiae*-positive farm; red dot—*S. aureus*-positive farm; yellow dot—*R. equi*-positive farm.

Author Contributions: Conceptualization, A.K., E.K. and A.D.; methodology, A.K., E.K. and A.D.; software, E.K. and I.S.; validation, E.K. and I.S.; formal analysis, I.S.; investigation, A.K., E.K. and A.D.; resources, A.K., E.K. and A.D.; writing—original draft preparation, A.K. and E.K.; writing—review and editing, M.R. and K.A.; supervision, M.R. and K.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cardoso-Toset, F.; Gómez-Laguna, J.; Amarilla, S.P.; Vela, A.I.; Carrasco, L.; Fernández-Garayzábal, J.F.; Astorga, R.J.; Luque, I. Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139130.
2. Kaczmarkowska, A.; Didkowska, A.; Brzezińska, S.; Klich, D.; Kwiecień, E.; Dolka, I.; Kociuba, P.; Rzewuska, M.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Anusz, K. Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0269912. [[CrossRef](#)]
3. Kawata, K.; Minakami, T.; Mori, Y.; Katsumi, M.; Kataoka, Y.; Ezawa, A.; Kikuchi, N.; Takahashi, T. rDNA sequence analyses of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53 Pt 6*, 1941–1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Komijn, R.E.; Wisselink, H.J.; Rijsman, V.M.C.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Bakker, D.; van Zijderveld, F.G.; Eger, T.; Wagenaar, J.A.; Putirulan, F.F.; Urlings, B.A.P. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.* **2007**, *120*, 352–357. [[PubMed](#)]
5. Cardoso-Toset, F.; Gómez-Laguna, J.; Gómez-Gascón, L.; Rodríguez-Gómez, I.M.; Galán-Relaño, A.; Carrasco, L.; Tarradas, C.; Vela, A.I.; Luque, I. Histopathological and microbiological study of porcine lymphadenitis: Contributions to diagnosis and control of the disease. *Porc. Health Manag.* **2020**, *6*, 36. [[CrossRef](#)]
6. Brandt, C.M.; Spellerberg, B. Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 766–772. [[CrossRef](#)]
7. Oh, S.I.; Kim, J.W.; Kim, J.; So, B.; Kim, B.; Kim, H.Y. Molecular subtyping and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates from clinically diseased pigs. *J. Vet. Sci.* **2020**, *21*, e57. [[CrossRef](#)]
8. Gottschalk, M. Streptococcosis. In *Disease of Swine*, 10th ed.; Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G.W., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, UK, 2012; pp. 841–855.
9. Costa, M.O.; Harding, J.C.S.; Huang, Y.; Nosach, R. *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* infection of pigs leads to shedding in faeces and a carrier state. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, e1503–e1509.
10. Baracco, G.J. Infections Caused by Group C and G Streptococcus (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*.
11. Kim, M.; Heo, S.T.; Oh, H.; Kim, M.; Jo, J.; Kim, Y.R.; Lee, K.H.; Yoo, J.R. Human zoonotic infectious disease caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus*. *Zoonoses Public Health* **2022**, *69*, 136–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Salasia, S.I.; Wibawan, I.W.; Pasaribu, F.H.; Abdulmawjood, A.; Lammler, C. Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia. *J. Vet. Sci.* **2004**, *5*, 263–265. [[PubMed](#)]
13. Lara, G.H.; Ribeiro, M.G.; Leite, C.Q.; Paes, A.C.; Guazzelli, A.; da Silva, A.V.; Santos, A.C.; Listoni, F.J. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Res. Vet. Sci.* **2011**, *90*, 185–188. [[CrossRef](#)]
14. Lin, W.V.; Kruse, R.L.; Yang, K.; Musher, D.M. Diagnosis and management of pulmonary infection due to *Rhodococcus equi*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 310–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Suzuki, Y.; Kubota, H.; Madarame, H.; Takase, F.; Takahashi, K.; Sasaki, Y.; Kakuda, T.; Takai, S. Pathogenicity and genomic features of vapN-harboring *Rhodococcus equi* isolated from human patients. *Int. J. Med. Microbiol.* **2021**, *311*, 151519. [[CrossRef](#)]
16. Samutela, M.T.; Kwenda, G.; Simulundu, E.; Nkhoma, P.; Higashi, H.; Frey, A.; Bates, M.; Hang’ombe, B.M. Pigs as a potential source of emerging livestock-associated *Staphylococcus aureus* in Africa: A systematic review. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *109*, 38–49. [[CrossRef](#)]
17. Martínez, J.; Jaro, P.J.; Aduriz, G.; Gómez, E.A.; Peris, B.; Corpa, J.M. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. *Vet. J.* **2007**, *174*, 160–164. [[CrossRef](#)]
18. Di Marco, V.; Mazzone, P.; Capucchio, M.T.; Boniotti, M.B.; Aronica, V.; Russo, M.; Fiasconaro, M.; Cifani, N.; Corneli, S.; Biasibetti, E.; et al. Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1209–1218. [[CrossRef](#)]

19. Martín-Hernando, M.P.; Höfle, U.; Vicente, J.; Ruiz-Fons, F.; Vidal, D.; Barral, M.; Garrido, J.M.; de la Fuente, J.; Gortazar, C. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis* **2007**, *87*, 360–367. [CrossRef] [PubMed]
20. Cardoso-Toset, F.; Luque, I.; Morales-Partera, A.; Galán-Relaño, A.; Barrero-Domínguez, B.; Hernández, M.; Gómez-Laguna, J. Survival of *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* in dry-cured Iberian pork shoulders and loins. *Food Microbiol.* **2017**, *61*, 66–71. [CrossRef]
21. Tang, Y.; Larsen, J.; Kjeldgaard, J.; Andersen, P.S.; Skov, R.; Ingmer, H. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *249*, 72–76. [CrossRef]
22. Tegegne, H.A.; Koláčková, I.; Florianová, M.; Gelbíčová, T.; Madec, J.Y.; Haenni, M.; Karpíšková, R. Detection and molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat in the retail market. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2021**, *26*, 233–238. [CrossRef]
23. Arbeit, R.D. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed.; Murray, P.R., Baron, E.J.O., Tenover, F.C., Tenover, R.H., Eds.; American Society for Microbiology: Washington, DC, USA, 1995; pp. 190–208.
24. Vela, A.I.; Goyache, J.; Tarradas, C.; Luque, I.; Mateos, A.; Moreno, M.A.; Borge, C.; Perea, J.A.; Domínguez, L.; Fernández-Garayzábal, J.F. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2498–2502. [CrossRef] [PubMed]
25. Monger, X.C.; Gilbert, A.A.; Saucier, L.; Vincent, A.T. Antibiotic Resistance: From Pig to Meat. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1209. [CrossRef] [PubMed]
26. CA-SFM Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology Guidelines: Recommandations Vétérinaires 2021. Available online: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/12/CASFM_VET2021.pdf (accessed on 14 February 2023). (In French).
27. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals*, 4th ed.; CLSI Supplement VET08; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
28. CLSI. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals*, 1st ed.; CLSI Supplement VET06; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.
29. Zientara, W. Production of live pigs in Poland—Conditions and prospects. *Annals PAAAE* **2019**, *21*, 101–110. [CrossRef]
30. Algammal, A.M.; Hetta, H.F.; Elkelish, A.; Alkhalifah, D.H.H.; Hozzein, W.N.; Batiha, G.E.; El Nahhas, N.; Mabrok, M.A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infect. Drug. Resist.* **2020**, *13*, 3255–3265. [CrossRef]
31. Koh, T.H.; Binte, A.R.N.; Sessions, O.M. Comparative genomic analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*, an occasional cause of zoonotic infection. *Pathology* **2020**, *52*, 262–266. [CrossRef] [PubMed]
32. Schrieber, L.; Towers, R.; Muscatello, G.; Speare, R. Transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* between child and dog in an Aboriginal Australian community. *Zoonoses Public Health* **2014**, *61*, 145–148.
33. Takai, S.; Sawada, N.; Nakayama, Y.; Ishizuka, S.; Nakagawa, R.; Kawashima, G.; Sangkanjanavanich, N.; Sasaki, Y.; Kakuda, T.; Suzuki, Y. Reinvestigation of the virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *Lett. Appl. Microbiol.* **2020**, *71*, 679–683. [CrossRef] [PubMed]
34. Vázquez-Boland, J.A.; Giguère, S.; Hapeshi, A.; MacArthur, I.; Anastasi, E.; Valero-Rello, A. *Rhodococcus equi*: The many facets of a pathogenic actinomycete. *Vet. Microbiol.* **2013**, *167*, 9–33. [CrossRef]
35. Deliwala, S.; Beere, T.; Samji, V.; McDonald, P.J.; Bachuwa, G. When Zoonotic Organisms Cross Over-*Trueperella pyogenes* Endocarditis Presenting as a Septic Embolic Stroke. *Cureus* **2020**, *12*, e7740. [CrossRef]
36. Witkowski, L.; Rzewuska, M.; Takai, S.; Kizerwetter-Świda, M.; Kita, J. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* in slaughtered swine, cattle and horses in Poland. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 98. [CrossRef] [PubMed]
37. Alves-Barroco, C.; Brito, P.H.; Santos-Sanches, I.; Fernandes, A.R. Phylogenetic analysis and accessory genome diversity reveal insight into the evolutionary history of *Streptococcus dysgalactiae*. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 952110. [CrossRef] [PubMed]
38. Katsumi, M.; Kataoka, Y.; Takahashi, T.; Kikuchi, N.; Hiramune, T. Biochemical and serological examination of beta-hemolytic streptococci isolated from slaughtered pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **1998**, *60*, 129–131. [CrossRef] [PubMed]
39. Ishihara, H.; Ogura, K.; Miyoshi-Akiyama, T.; Nakamura, M.; Kaya, H.; Okamoto, S. Prevalence and genomic characterization of Group A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from patients with invasive infections in Toyama prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* **2020**, *64*, 113–122. [CrossRef]
40. Sabat, A.J.; Budimir, A.; Nashev, D.; Sa-Leao, R.; van Dijk, J.M.; Laurent, F.; Grundmann, H.; Friedrich, A.; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20380. [CrossRef]
41. Broens, E.M.; Graat, E.A.; Van Der Wolf, P.J.; Van De Giessen, A.W.; De Jong, M.C. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs during transportation from farm to abattoir. *Vet. J.* **2011**, *189*, 302–305. [CrossRef]
42. Gómez-Sanz, E.; Torres, C.; Lozano, C.; Fernández-Pérez, R.; Aspiroz, C.; Ruiz-Larrea, F.; Zarazaga, M. Detection, Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, *7*, 1269–1277. [CrossRef]

43. Molla, B.; Byrne, M.; Abley, M.; Mathews, J.; Jackson, C.R.; Fedorka-Cray, P.; Sreevatsan, S.; Wang, P.; Gebreyes, W.A. Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of porcine origin. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3687–3693. [[CrossRef](#)]
44. Lo, Y.P.; Wan, M.T.; Chen, M.M.; Su, H.Y.; Lauderdale, T.L.; Chou, C.C. Molecular characterization and clonal genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of pig origin in Taiwan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *35*, 513–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pate, M.; Ocepek, M.; Zdovc, I.; Minato, C.; Ohtsu, Y.; Matsuoaka, M.; Honda, Y.; Hashimoto, L.; Sasaki, Y.; Kakuda, T.; et al. Intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs in Slovenia: Discovery of new plasmid types and assessment of genetic diversity by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Med.* **2009**, *54*, 111–117. [[CrossRef](#)]
46. Moreno, L.Z.; da Costa, B.L.; Matajira, C.E.; Gomes, V.T.; Mesquita, R.E.; Silva, A.P.; Moreno, A.M. Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from swine. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *86*, 178–180. [[CrossRef](#)]
47. Renzhammer, R.; Loncaric, I.; Ladstätter, M.; Piniör, B.; Roch, F.F.; Spergser, J.; Ladinig, A.; Unterweger, C. Detection of Various *Streptococcus* spp. and Their Antimicrobial Resistance Patterns in Clinical Specimens from Austrian Swine Stocks. *Antibiotics* **2020**, *9*, 893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kim, S.; Byun, J.H.; Park, H.; Lee, J.; Lee, H.S.; Yoshida, H.; Shibayama, A.; Fujita, T.; Tsuyuki, Y.; Takahashi, T. Molecular epidemiological features and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from Korea and Japan. *Ann. Lab. Med.* **2018**, *38*, 212–219. [[PubMed](#)]
49. Savini, V.; Catavittello, C.; Talia, M.; Manna, A.; Pompetti, F.; Di Bonaventura, G.; Di Giuseppe, N.; Febbo, F.; Balbinot, A.; Di Zaccaro, S.; et al. β -Lactam failure in treatment of two group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Pharyngitis patients. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 814–816. [[CrossRef](#)]
50. Smith, M.; Do, T.N.; Gibson, J.S.; Jordan, D.; Cobbold, R.N.; Trott, D.J. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Australian and Vietnamese pigs. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2014**, *2*, 162–167. [[CrossRef](#)]
51. Dressler, A.E.; Scheibel, R.P.; Wardyn, S.; Harper, A.L.; Hanson, B.M.; Kroeger, J.S.; Diekema, D.J.; Bender, J.B.; Gray, G.C.; Smith, T.C. Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* in pigs at agricultural fairs in the USA. *Vet. Rec.* **2012**, *170*, 495. [[CrossRef](#)]
52. Peeters, L.E.J.; Argudín, M.A.; Azadikhah, S.; Butaye, P. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus aureus* recovered from pigs farms. *Vet. Microbiol.* **2015**, *180*, 151–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Cisek, A.A.; Rzewuska, M.; Witkowski, L.; Binek, M. Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *Acta Biochim. Pol.* **2014**, *61*, 633–638. [[CrossRef](#)]
54. Berghaus, L.J.; Giguère, S.; Guldbeck, K.; Warner, E.; Ugorji, U.; Berghaus, R.D. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 314–318. [[CrossRef](#)]
55. Giguère, S.; Berghaus, L.J.; Willingham-Lane, J.M. Antimicrobial Resistance in *Rhodococcus equi*. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Stoś, K.; Rychlik, E.; Woźniak, A.; Oltarzewski, M. Red and Processed Meat Consumption in Poland. *Foods* **2022**, *11*, 3283. [[CrossRef](#)]
57. Sasaki, T.; Tsubakishita, S.; Tanaka, Y.; Sakusabe, A.; Ohtsuka, M.; Hirotaki, S.; Kawakami, T.; Fukata, T.; Hiramatsu, K. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 765–769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Riffon, R.; Sayasith, K.; Khalil, H.; Dubreuil, P.; Drolet, M.; Lagacé, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2584–2589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Alber, J.; El-Sayed, A.; Lämmle, C.; Hassan, A.A.; Weiss, R.; Zschöck, M. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **2004**, *51*, 455–458. [[CrossRef](#)]
60. Clermont, D.; Chesneau, O.; De Cespédès, G.; Horaud, T. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of tet(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 112–116. [[CrossRef](#)]
61. Nawaz, M.; Wang, J.; Zhou, A.; Ma, C.; Wu, X.; Moore, J.E.; Millar, B.C.; Xu, J. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 1081–1089. [[CrossRef](#)]
62. Gibreel, A.; Tracz, D.M.; Nonaka, L.; Ngo, T.M.; Connell, S.R.; Taylor, D.E. Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with Special Reference to tet (O)-Mediated Tetracycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3442–3450. [[CrossRef](#)]
63. Pang, Y.; Bosch, T.; Roberts, M.C. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. *Mol. Cell. Probes* **1994**, *8*, 417–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Toomey, N.; Bolton, D.; Fanning, S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res. Microbiol.* **2010**, *161*, 127–135. [[CrossRef](#)]
65. Hennekinne, J.A.; Kerouanton, A.; Brisabois, A.; De Buyser, M.L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 321–329. [[CrossRef](#)]

66. Szaluś-Jordanow, O.; Chrobak, D.; Pyrgiel, M.; Lutyńska, A.; Kaba, J.; Czopowicz, M.; Witkowski, L.; Kizerwetter-Świda, M.; Binek, M.; Frymus, T. PFGE and AFLP genotyping of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from goats with Morel's disease. *Arch. Microbiol.* **2013**, *195*, 37–41. [[PubMed](#)]
67. Cohen, N.D.; Smith, K.E.; Ficht, T.A.; Takai, S.; Libal, M.C.; West, B.R.; DelRosario, L.S.; Becu, T.; Leadon, D.P.; Buckley, T.; et al. Epidemiologic study of results of pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Rhodococcus equi* obtained from horses and horse farms. *Am. J. Vet. Res.* **2003**, *64*, 153–161. [[CrossRef](#)]
68. Witkowski, L.; Rzewuska, M.; Cisek, A.A.; Chrobak-Chmiel, D.; Kizerwetter-Świda, M.; Czopowicz, M.; Welz, M.; Kita, J. Prevalence and genetic diversity of *Rhodococcus equi* in wild boars (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Poland. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Tenover, F.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 2233–2239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

RESEARCH ARTICLE

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

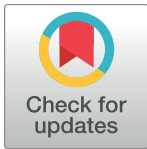
Aleksandra Kaczmarkowska¹✉*, Anna Didkowska¹‡, Sylwia Brzezińska²‡, Daniel Klich³‡, Ewelina Kwiecień⁴‡, Izabella Dolka⁵‡, Piotr Kociuba⁶‡, Magdalena Rzewuska⁴‡, Ewa Augustynowicz-Kopec²‡, Krzysztof Anusz¹‡

1 Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Warsaw, Poland, **2** Department of Microbiology, National Tuberculosis Reference Laboratory, National Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute, Warsaw, Poland, **3** Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Warsaw, Poland, **4** Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Warsaw, Poland, **5** Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Warsaw, Poland, **6** Department of Environmental Protection and Landscape Preservation, Institute of Mathematics, Informatics and Landscape Architecture, The John Paul II Catholic University of Lublin (KUL), Lublin, Poland

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ AD, SB, DK, EK, ID, PK, MR, EAK and KA also contributed equally to this work.

* aleksandra_kaczmarkowska@sggw.edu.pl



OPEN ACCESS

Citation: Kaczmarkowska A, Didkowska A, Brzezińska S, Klich D, Kwiecień E, Dolka I, et al. (2022) Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? PLoS ONE 17(7): e0269912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912>

Editor: Selvakumar Subbian, Rutgers Biomedical and Health Sciences, UNITED STATES

Received: October 30, 2021

Accepted: May 31, 2022

Published: July 15, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912>

Copyright: © 2022 Kaczmarkowska et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are in the manuscript and also available upon request to the Ethics committee (lke@sggw.edu.pl).

Abstract

The *Mycobacterium avium* complex (MAC) comprises a widespread group of slowly-growing bacteria from the *Mycobacteriaceae*. These bacteria are responsible for opportunistic infections in humans and animals, including farm animals. The aim of the study was to determine whether it is possible to predict the presence of *M. avium* in pig lymph nodes based on the size and type of lesions found during post-mortem examination at a slaughterhouse. Lymph nodes were collected from 10,600 pigs subjected to such post-mortem examination. The nodes were classified with regard to their quality, and the number of tuberculosis-like lesions; following this, 86 mandibular lymph nodes with lesions and 113 without visible macroscopic lesions were selected for further study. Cultures were established on *Löwenstein-Jensen* and *Stonebrink media*, and a commercial GenoType *Mycobacterium* CM test was used to identify and differentiate *M. avium* species. The prevalence of *M. avium* was 56.98% in the lymph nodes with lesions and 19.47% in the unchanged ones. Statistical analysis indicated that visual assessment of lesions in the mandibular lymph nodes, in particular the number of tuberculous lesions, is a highly-efficient diagnostic tool. Similar results were obtained for estimated percentage area affected by the lesion, i.e. the ratio of the changed area of the lymph node in cross-section to the total cross-sectional area of the lymph node; however, this method is more laborious and its usefulness in slaughterhouse conditions is limited. By incising the lymph nodes and assessing the number of tuberculosis-like lesions, it is possible to limit the inclusion of meat from pigs infected with *M. avium* into the human food chain.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is a group of globally-occurring opportunistic bacteria with zoonotic potential that are transmitted mainly by livestock and birds. MAC infections in humans represent an increasingly pressing problem, and there is a need for special measures intended to prevent their spread [1]. The complex is responsible for various diseases, including localized infections such as cervical lymphadenitis in immunocompetent patients, and disseminated pulmonary infections in immunodeficient ones [2–4].

Some of the most commonly-occurring species in pigs are *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, and *M. avium* spp. *paratuberculosis* [5]. They infect mainly the respiratory and intestinal tract, and lead to economic losses among pig farmers [6, 7].

According to the United Nations Food and Agriculture Organization, pork remains the most widely-consumed meat in the world. As such, it is critically important to ensure it is of the highest microbiological quality. This poses a significant challenge, as the pathogenesis of MAC infection in pigs remains not fully understood [8, 9]. Carcasses are typically subjected to post-mortem examination, during which, attention should be paid to the presence of gross lesions suggesting mycobacteria infection. These lesions can be detected in lymph nodes, most commonly intestinal ones, in which they take the form of tuberculosis-like lesions [8]. In both humans and pigs, the predominant target organ of MAC is the liver [10, 11].

During the morphological inspection of carcasses at slaughterhouses, tuberculosis-like gross lesions are most commonly observed in the lymphatic organs, such as the mesenteric lymph nodes, and less often in the mandibular lymph nodes and Peyer's patches or tonsils [1]. It is suspected that those lesions frequently go unrecognized [12], and some molecular detection solutions are being introduced for foodborne risk assessment [13].

Current European Union legislation recommends visual inspection of the lymph nodes without incision [14], which makes it impossible to identify potential pathological lesions. This three-stage post-mortem examination increases the chance of identifying lesions in the lymph nodes, which is one of the objectives of the examination. Purely visual examination, without incision, runs the risk of missing pathological lesions, which can enter the human food chain. Minced meat, with the addition of lymph nodes, seems to be particularly risky as a potential source of human infection with *M. avium* [15].

Thanks to their resistance to unfavorable conditions, mycobacteria can survive some disinfection or decontamination procedures used in food production, as well as thermal processing. Many studies have reported detection of mycobacteria in animal tissues and milk, thus confirming that food of animal origin can be a source of mycobacterial transmission to humans [16]. Research has also confirmed the presence of mycobacterial DNA and live bacteria in commercially-available food products such as raw pork, fermented salami-type products and heat-treated roast meat [17]. Considering the potential threat to public health posed by infected food, the aim of this study was to determine whether it is possible to predict the occurrence of *Mycobacterium avium* in swine lymph nodes based on the type and size of gross lesions found on them. An additional aim was to determine the frequency of tuberculosis-like lesions and atypical mycobacteria in pigs in the study area and assess whether there is a relationship between the incidence of *M. avium* and the sex of animals and the size of the farms where the animals were kept.

Materials and methods

Material

A total of 10,600 pig carcasses were subjected to post-mortem examination including the incision of submandibular and mesenteric lymph nodes. In 86 animals, anatomical lesions were

found in the mandibular lymph nodes but not in the mesenteric lymph nodes. The mandibular lymph nodes with lesions (n = 86) and a randomly-selected group of mandibular lymph nodes without lesions (n = 113) were then tested for the presence of *Mycobacterium* spp. The animals from which the material was collected were aged between 5.5 months and four years (mean age: 6.4 months). Of the 199 carcasses, 99 were male and 100 were female. The animals came from 83 farms located in central Poland, ranging in size from 2 to 3480 individuals; mean size 117 animals. The harvested mandibular lymph nodes were kept in a freezer at -20° C before analysis.

No ethical approval was required from the National Ethical Committee for Animal Experiments to conduct the tests because the lymph nodes were collected as a part of the post-mortem inspection of pigs in the slaughterhouse. No animal was intentionally sacrificed for this study.

Lesion classification and histopathology

The collected lymph nodes were all classified into three groups based on the type of lesion, and three groups based on the number of lesions; the classification was performed by a veterinarian with eight years of experience in a slaughterhouse. The nodes in which no macroscopic lesions were found were assigned to Group 0, those with pinhead-size, nodule-like individual lesions were placed in Group 1 (Fig 1), and those with numerous pinhead-size or diffuse lesions into Group 2 (Figs 2 and 3).

The collected material was also classified according to the nature of the lesions: group A—non-purulent lesions (Figs 1 and 2), group B—purulent lesions (Fig 3), group C—no lesions. A

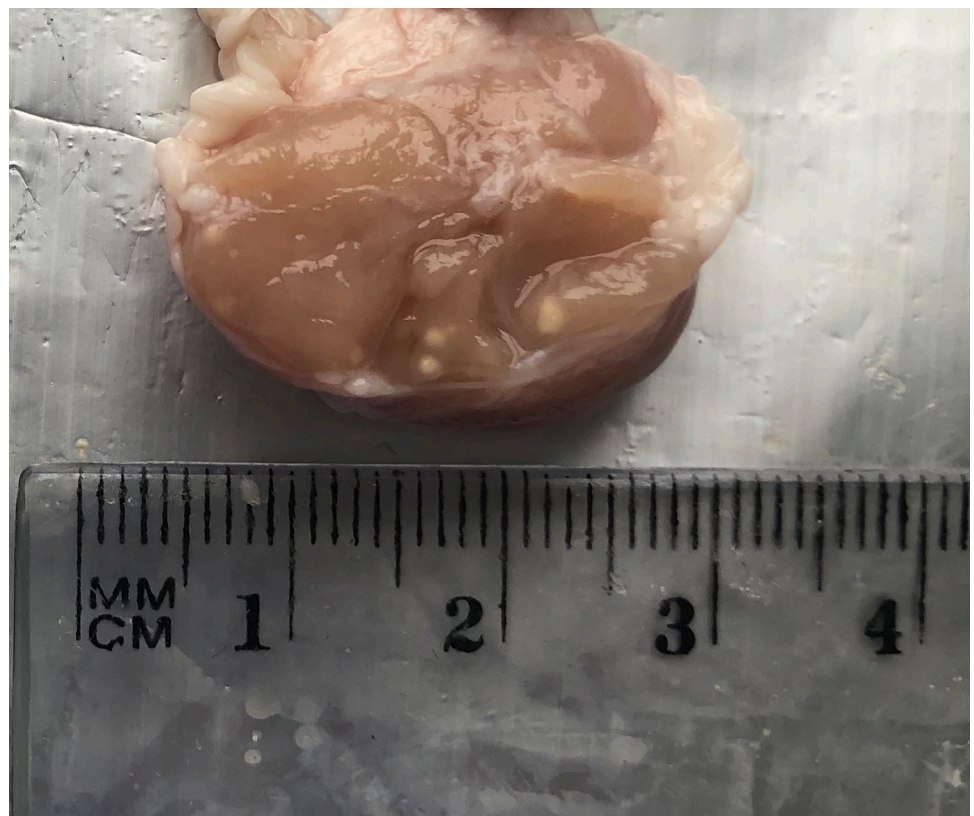


Fig 1. Mandibular lymph node with single lesions, non-purulent.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g001>



Fig 2. Mandibular lymph node with numerous pinhead-size lesions, non-purulent.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g002>

photogrammetric examination of the lymph nodes was also performed; briefly, the changed area of the node in cross-section was measured by image analysis and this was then expressed as a percentage of the entire cross-sectional area of the lymph node. Fragments of mandibular lymph nodes approximately 30 x 30 x 15 mm in size were collected into 4% formalin for histopathological examination. The histopathological examination only included a few of the selected lymph nodes with apparent lesions, i.e. some from groups A, B, 1 and 2: the nodes from groups C and 0 were not examined. The histopathological testing itself was based on standard hematoxylin and eosin staining to assess lymphocytic infiltration and Kinyoun staining to detect mycobacteria.

Mycobacterial isolation

Acid-fast mycobacteria were isolated from the material according to the recommendations of the Reference Microbiological Laboratory of the National Research Institute—National Veterinary Institute in Puławy, Poland. The material was pre-minced with sterile scissors and placed

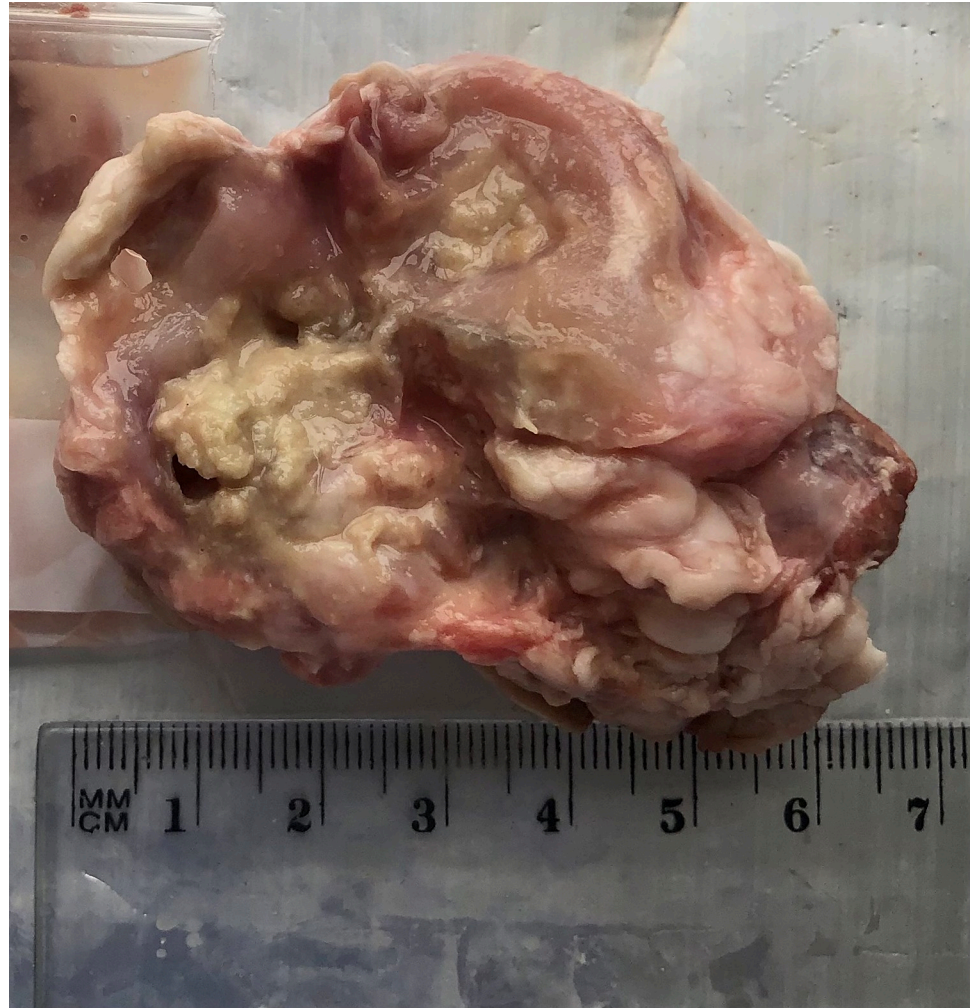


Fig 3. Mandibular lymph node with numerous pinhead-size lesions, purulent.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g003>

in bags with a filtering membrane (BagPage® 100). The material was then submerged in a 5% solution of oxalic acid (POCH, Poland) for decontamination and homogenized with a stomacher for three minutes at 12 strokes/second. The resulting suspension was poured into tubes. These were incubated for 10–15 minutes at 37°C, and then centrifuged for 10 minutes at 1500 x g. In the next step, the supernatant was removed, and sterile 0.9% NaCl was added to the maximum volume of the tube. The tubes were shaken and centrifuged for 10 minutes at 1500 x g. This operation was repeated twice. The sediment (5µl) was used for inoculation on solid media for mycobacterial cultures: Löwenstein-Jensen (MERCK, Germany) and Stonebrink (MERCK, Germany). The cultures were incubated at 37°C for 12 weeks. The media were checked for mycobacterial colony growth once a week. No growth after 12 weeks was considered a negative result.

DNA isolation

The loop of an inoculation loop filled with mycobacterial colonies isolated on Löwenstein-Jensen or Stonebrink media was suspended in 150 µl of water, and then incubated for 30 minutes in a heating block at 95°C. After incubation, the tubes were centrifuged for five minutes at 15000 x g. The supernatant was transferred into new tubes and used for testing.

Genotyping

Mycobacterium avium species were identified and differentiated using a commercial Geno-Type Mycobacterium CM test (Hain Lifescience, Germany). The isolated DNA was selectively replicated by polymerase chain reaction (PCR). The resulting amplicons were transferred onto DNA strips covered with highly-specific probes which were complementary to the amplified DNA sequences. The amplicons were bound to their complementary sites, while the unbound fragments were removed during washing. Following this, a conjugate labeled with alkaline phosphatase was added, and the mycobacterial species were identified based on the hybridization pattern of specific probes placed on the strips with the product of the multiplex PCR reaction. The result was read using a dedicated template attached by the manufacturer.

Statistical analysis

To identify the factors that can explain the presence of *M. avium*, a generalized linear binary model was employed. In the model, the presence of *M. avium* in the samples was used as a dependent variable. Each sample where the presence of *M. avium* was confirmed was marked as 1, while those where no *M. avium* presence was confirmed were marked as 0. The following independent variables were included in the analysis: 1) qualitative severity of the lesions in the lymph nodes, 2) quantitative severity of the lesions in the lymph nodes, 3) sex of the pigs, 4) herd size. The qualitative severity of the lesions fell into three categories: A–non-purulent lesions, B–purulent lesions, C–no lesions. The quantitative severity of the lesions fell into three categories: 0 –no lesions, 1 –single lesions, and 2 –numerous lesions. To find the best fit model, all model variants were run (i.e. the variables were included in all possible combinations, including the null model), and the models were compared using Akaike Information Criteria (AIC) according to Burnham and Anderson [18]. The model with the lowest AIC value was regarded the best fit. When the AIC difference was below 2, the simpler model (i.e. with lower k) was selected according to the *Ockham's razor rule*. A *post hoc* pairwise comparison of the frequency of *M. avium* in lymph nodes of given category was performed with the least significant difference test (LSD).

A logistic regression model was also run to verify whether the presence of *M. avium* in the samples could be predicted from the percentage of lesions in the lymph nodes. In the model, the presence of *M. avium* in the samples was the dependent variable and the percentage of lesions was the independent variable. The dependent variable was similar to that used in the generalized linear binary model.

The percentage of the lesion area was calculated using AutoCAD 2020 software. Photos of the lymph nodes were taken with a Sony Cyber-shot DSC-W830 camera with a linear scale, which was then used to scale the images to 1:1 scale. The surfaces of the lymph nodes and lesions were marked with a spline tool. For each lymph node, the total cross-sectional area and the area occupied by the lesions (in cm²) were calculated with the Area tool. To verify whether percentage cover of lesions or quantitative severity of lesions in lymph nodes can better predict the presence of *M. avium* in the samples, a similar logistic regression model was run on the same set of observations; the quantitative severity of lesions was used as the independent variable in both models. Both models were compared according to R², classification tables and AUC (area under the ROC curve).

Results

Lesion classification and histopathology

The lymph nodes collected for the study were classified into the following groups 0 (n = 113), 1 (n = 38), 2 (n = 48), A (n = 73), B (n = 13), and C (n = 113). Affected lymph nodes presented

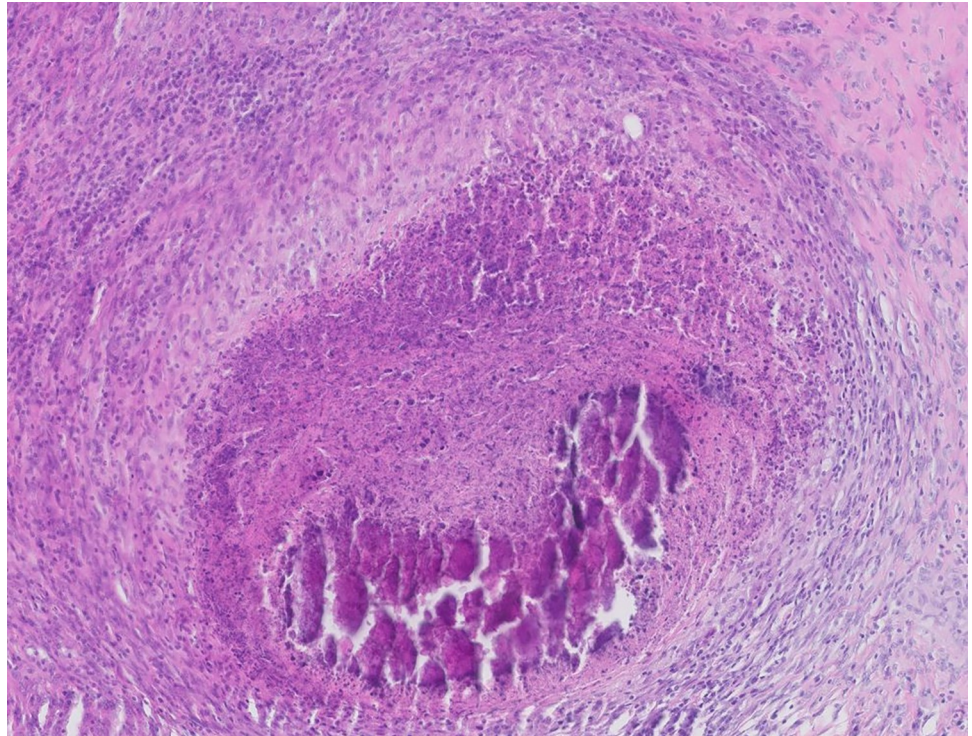


Fig 4. Histopathologic examination of mandibular lymph node. The nodes presented multifocal to coalescing coagulation necrosis, with areas of mineralization. The necrosis was separated by a thick layer of proliferating fibrous tissue. Sinusoids contain a large number of macrophages, partly with a granular brownish cytoplasmic pigment. Multifocally prominent lymph follicles are evident, with a large germinal center and prominent parafollicular lymphocyte proliferation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g004>

chronic, multifocal to diffuse, granulomatous or purulent-granulomatous inflammation with polynuclear giant cells (Fig 4). The majority of the lymph nodes contained thrombotic necrosis with mineralization or lytic necrosis, surrounded by fibrous proliferation. Sometimes *bodies similar to the Splendore-Hoeppli phenomenon were also detected, represented by luminous eosinophilic material* (Fig 5).

The incidence of tuberculosis-like lesions in pig lymph nodes was found to be 0.81%: i.e. 86 lymph nodes with tuberculosis-like lesions out of 10 600 examined carcasses.

Mycobacterial isolation

Of the samples taken from affected lymph nodes, bacterial growth was observed in 63 samples cultured on Löwenstein-Jensen medium, and in 36 samples on Stonebrink medium. Bacterial growth on both media was detected in 31 cases. For the lymph nodes without macroscopic lesions, bacterial growth on Löwenstein-Jensen or Stonebrink media was observed in 58 cases: Löwenstein-Jensen in 29 cases, Stonebrink medium in 29 cases, and for both media in 15 cases.

Genotyping

The incidence of *M. avium* was found to be 56.98% in the lymph nodes with lesions, and 19.47% in those without. The results are presented in Table 1.

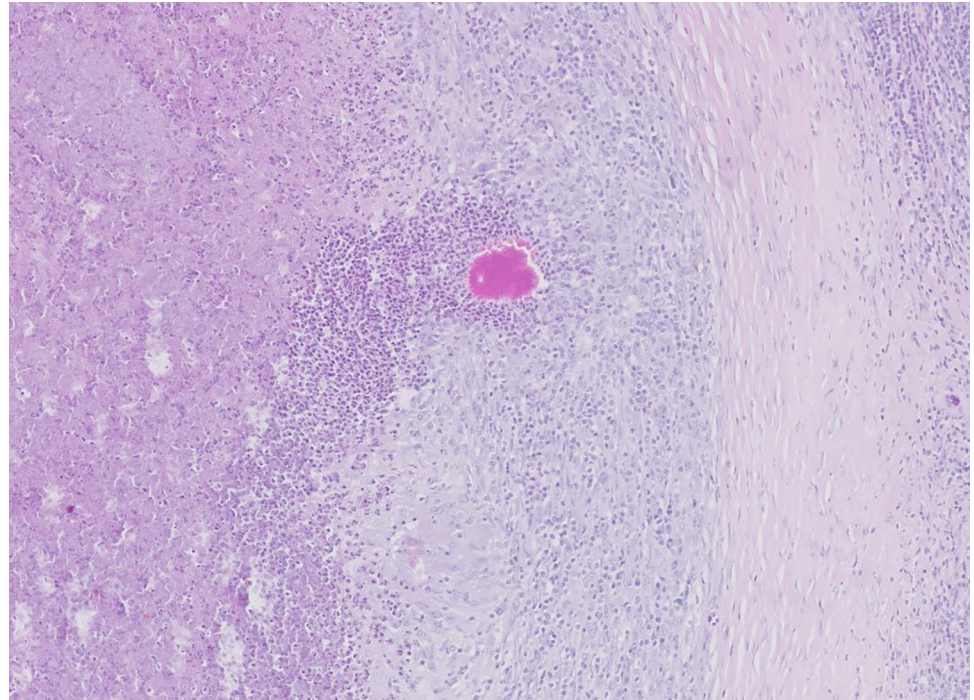


Fig 5. Histopathologic examination of mandibular lymph node with Splendore-Hoeppli-like material. Multifocal to coalescing granuloma formation can be seen. Granulomas consist of a central area of necrosis surrounded by a thick rim of partially epithelial macrophages and sometimes multinucleated giant cells. A visible demarcation formed by collagen-rich connective tissue is also present. Splendore-Hoeppli material can be observed, represented by a radiating club-shaped eosinophilic material.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g005>

Statistical analysis

The model selection resulted in the removal of all variables except for quantitative severity of lesions in lymph nodes. Neither the qualitative severity of lesions in lymph nodes, sex of the animals nor herd size significantly explained the presence of *M. avium*. The best model, based on quantitative severity of lesions in lymph nodes, was, however, statistically significant ($\chi^2 = 46.88$, $p < 0.001$). The severity of the lesions was significantly associated with the presence of *M. avium*. In addition, the categories “numerous lesions” and “single lesions” were associated with a significantly higher chance of *M. avium* than the “no lesions” category (Table 2): *M. avium* was 2.5 times more likely to be present in the lymph nodes with single lesions compared to nodes without lesions, and over 13 times higher in the lymph nodes with numerous lesions.

In the “no lesions” samples, the frequency of *M. avium* was 0.23, indicating that *M. avium* could still be present even if there were no lesions, but the probability was low. The frequency of *M. avium* in the “no lesions” samples differed significantly from the other two categories ($p = 0.020$ in comparison with “single sessions” and $p < 0.001$ in comparison with “numerous

Table 1. Number of submandibular lymph nodes from which *M. avium* was isolated.

Etiological factor	Lymph nodes with lesions	Lymph nodes without lesions
<i>M. avium</i>	49	22
<i>M. celatum</i>	3	4
<i>M. fortuitum</i>	1	0
<i>M. avium</i> + <i>M. chelonae</i>	3	0

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.t001>

Table 2. Effect of qualitative severity of lesions in lymph nodes on the presence of *M. avium* in the generalized linear binary model (* reference category).

Source	B	Standard error	Lower CI	Upper CI	p	Exp (B)
Intercept	-1.208	0.224	-1.646	-0.770	<0.001	
Quantitative (Numerous lesions)	2.569	0.419	1.747	3.390	<0.001	13.050
Quantitative (Single lesions)	0.950	0.393	0.180	1.720	0.016	2.586
Quantitative (No lesions)	0*					

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.t002>

sessions”). In the “single lesions” category, the frequency was found to be 0.44, which did not unequivocally confirm the presence of *M. avium*. However, this value was 0.8 in the “numerous lesions” category, indicating a high probability of species detection (Fig 6). The “single lesions” and “numerous lesions” categories were also found to differ significantly in the pairwise comparison ($p < 0.001$).

The logistic regression model indicated that the percentage of the lesion area in the lymph nodes could significantly predict the presence of *M. avium* ($\chi^2 = 15.33$, $p < 0.001$). *M. avium* infection was more likely where the lesion covered a greater area of the lymph node (Fig 7): the probability of *M. avium* being present exceeded 0.5 when over 10% of the lymph node area was affected.

The descriptive quantitative severity of lesions and measuring the percentage cover of lesions in lymph nodes yielded fairly similar results. Nevertheless, the model based on the quantitative severity of lesions demonstrated better model fitness: a higher Nagelkerke’s r-square value (0.325 and 0.126 respectively), higher percentage of total classified cases (77.1 and 69.4% respectively), and a greater percentage of correctly classified positive observations (56.7

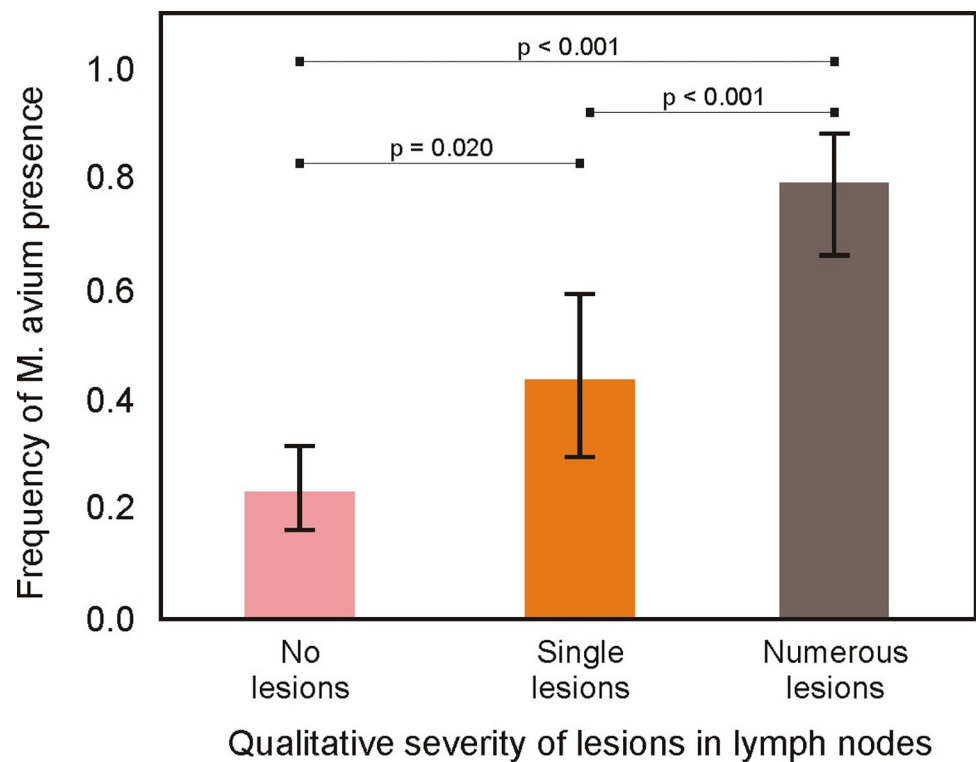


Fig 6. Frequency of *M. avium* presence (and 95% confidence intervals) with regard to the qualitative severity of lesions in lymph nodes, and pairwise comparison with least significant difference test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g006>

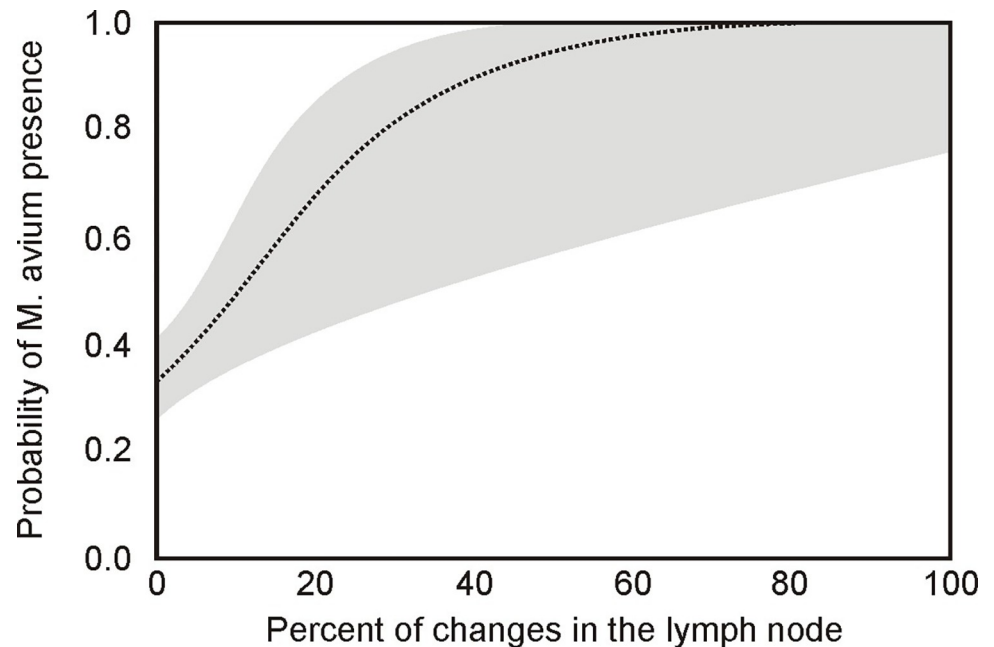


Fig 7. The probability of *M. avium* presence with 95% confidence intervals (shaded area) depending on the percentage cover of lesions in the lymph node.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912.g007>

and 23.3% respectively). The AUC, i.e. area under the ROC curve, was similar (0.74 and 0.734 respectively).

Discussion

Our study confirmed a statistically significant correlation between the size of gross lesions in pig submandibular lymph nodes and the presence of *M. avium*. Taking into consideration the increasing number of MAC infections in humans, and the possibility that the bacteria could enter the food chain, we speculated that a scientific algorithm based on visual inspection that could be carried out in slaughterhouses might be of value in managing the problem. This was confirmed by our statistical analysis, which demonstrated a high probability of isolating *Mycobacterium* spp. from the changed lymph nodes and a low probability of *M. avium* infection in their absence.

In pigs, *M. avium* is known to cause oral infections with localized gross lesions mainly in the head, mediastinum and digestive tract lymph nodes [19, 20]. Based on these findings, and our earlier observations on the frequency of lesions in pigs, we decided to investigate the submandibular lymph nodes, which are easily accessible and take little time to evaluate, i.e. about five seconds.

Our results indicate that preliminary assessment of macroscopic lesions based on visual inspection may be of value in detecting *M. avium*, and that assessing lesion size can be a rapid and cost effective means to achieve this. The only requirement is that the meat examiners receive adequate training. However, this being a new proposal, possibly the first, it does have some limitations. Firstly, regarding the subjective assessment of lesions in lymph nodes, our findings indicate a relatively high probability of *M. avium* being present in lymph nodes with no lesions observed. This indicates the need for a careful approach to visual inspection, and an individual not displaying lesions should not be automatically qualified as free from *M. avium*, but as “probably free”. Another limitation is that infection may occur naturally in pigs; as a

result, the lesions observed in the individuals were at different stages of development, or they may not have had time to develop at all. However, this may be an advantage of our methodology, as this method may be used during post-mortem inspection in slaughterhouses that do not receive experimentally-infected animals.

Visual inspection is an efficient screening method, while the sensitivity of other methods, such as cultures or molecular tests, still needs improvement. It also avoids the other limitations of laboratory testing, such as the long time needed to obtain results and the significant financial costs. It seems reasonable to use visual screening to select material for molecular testing, possibly using GenoType Mycobacterim CM. Such improved screening would support public health protection and avoid the great economic losses caused by mycobacterial infections [1]; in addition, detecting a large number of lesions in a specific location can be an important indicator for pig farmers.

Our findings indicate that calculating the lesion area is an efficient prognostic factor for the presence of *M. avium*. However, large areas of tuberculosis-like lesions can also be attributed to co-infection by *M. avium* and *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* or *Rhodococcus equi*. In some cases, it is impossible to isolate and culture any etiological factor from advanced lesions due to their strong calcification and devitalization of mycobacteria [21].

The method used in the present study to calculate the percentage area of a lesion is time-consuming and troublesome and requires specific hardware and software. In addition, it does not provide better results than the visual assessment of the number of the lymph node lesions. Nevertheless, it should be noted that the lower precision of the model regarding the assessment of percentage lesions could have been due to the smaller sample size, as not all the nodes were inspected for the lesions on their surface.

Moreover, in the descriptive quantitative method, the frequency of the “single lesions” category did not reflect the presence of *M. avium*. Only situations where no lesions or numerous lesions were observed proved to be clear indications of the possible presence of *M. avium*. For this reason, it seems justified to use a combination of both methods simultaneously, i.e. lesion number and node coverage, at least for the “single lesions” category. The lesion area can be visually assessed on site. The results of the logistic regression indicate a 50% risk of *M. avium* even when only 10% of the lymph node cross section is affected: single lesions that account for over 10% of the cross section area also demonstrate an increased risk of *M. avium*, which increases further with percentage cover. When 50% of the node section is affected, the presence of *M. avium* is nearly guaranteed. Therefore, estimating the area of the lesions seems a reliable and convenient method for assessing the risk of *M. avium* incidence.

Our histopathological analysis confirmed the presence of necrosis and calcification foci, these being lesions typical of late stage granulomatous inflammation caused by *M. avium* [10]. However, the examination did not reveal any significant differences between materials collected from different types of lesions; this confirms our hypothesis regarding the value of the macroscopic assessment of lymph nodes.

Our findings indicate that herd size has no influence on the incidence of *M. avium* in pig lymph nodes. This could be due to the fact that pig breeding in Poland is not consolidated, and the investigated animals mostly came from small farms of similar zoohygienic status. Nevertheless, it should be remembered that *M. avium* infections also occur at large farms with better zoohygienic conditions focused on intensive pig production [1, 7]. In addition, no correlation was observed between the incidence of *M. avium* and neither the nature of the lesions, nor the sex of the pigs. Similar findings have been noted for a population of wild boars from southern Spain, which also showed no links between the animal sex and infection rate [22].

The incidence of tuberculosis-like lesions in pig lymph nodes in the present study was found to be 0.81%. Similar results were achieved in a study conducted in two slaughterhouses

in the Netherlands, in which 0.75% of animals presented granulomatous lesions in the sub-mandibular nodes, and were located in mesenteric nodes in only one case. Our present findings indicate a much higher MAC isolation rate than in Dutch farms aimed at intensive production; this difference may be due to the susceptibility of the pig breed to infection, the nature of the animal husbandry system, the ecology of the bacteria [23], or the age of the pigs.

The prevalence of *M. avium* reached 56.98% in the lymph nodes with lesions, but only 19.47% in the unchanged ones. The relatively high incidence of *M. avium* in unchanged lymph nodes can be explained by the short life span of the pigs, and the fact that the infection occurred too late for the lesions to properly develop [24]. Similar *M. avium* isolation rates were published by Pate et al., who isolated the bacterium in 47.3% of pigs with changed lymph nodes and *R. equi* in 3.9%.

Conclusions

The most effective screening method for the presence of *M. avium* in pig lymph nodes is an assessment of the number of tuberculosis-like lesions present during post-mortem inspection. In addition, evaluating the percentage of the node area covered with lesions also appears to be a useful indicator. In both cases, the recommended method of assessment is visual inspection. For material in the “single lesions” category, we recommend the simultaneous use of both methods. It should however, be remembered that the latter method, i.e. estimating the area of the node covered with lesions, is difficult in slaughterhouse conditions, and that the nature of the lesion does not definitely confirm the presence of *M. avium*.

Acknowledgments

The authors would like to thank the owners of slaughterhouses who agreed to be sampled at their facility.

Author Contributions

Conceptualization: Aleksandra Kaczmarkowska.

Data curation: Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska.

Formal analysis: Aleksandra Kaczmarkowska, Daniel Klich, Piotr Kociuba.

Funding acquisition: Krzysztof Anusz.

Investigation: Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska.

Methodology: Aleksandra Kaczmarkowska, Daniel Klich.

Resources: Aleksandra Kaczmarkowska, Sylwia Brzezińska.

Software: Piotr Kociuba.

Supervision: Anna Didkowska, Izabella Dolka, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz-Kopeć, Krzysztof Anusz.

Validation: Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień.

Visualization: Aleksandra Kaczmarkowska.

Writing – original draft: Aleksandra Kaczmarkowska.

Writing – review & editing: Aleksandra Kaczmarkowska, Krzysztof Anusz.

References

1. Hulinova Stromerova N, Faldyna M. *Mycobacterium avium* complex infection in pigs: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018 Apr; 57:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.06.005> PMID: 30017080.
2. Despierres L, Cohen-Bacrie S, Richet H, Drancourt M. Diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* mycobacteria causing lymphadenitis, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jul; 31(7):1373–9. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1452-2> PMID: 22042560.
3. Kaevska M, Slana I, Kralik P, Reischl U, Orosova J, Holcikova A, et al. "*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*" in neck lymph nodes of children and their environment examined by culture and triplex quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan; 49(1):167–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.00802-10> PMID: 21084514; PubMed Central PMCID: PMC3020421.
4. Mukherjee R, Chatterji D. Glycopeptidolipids: immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope. *IUBMB Life*. 2012 Mar; 64(3):215–25. <https://doi.org/10.1002/iub.602> PMID: 22252955.
5. Rindi L, Garzelli C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol*. 2014 Jan; 21:375–83. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007> PMID: 24345519.
6. Pavlik I, Matlova L, Dvorska L, Bartl J, Oktabcova L, Docekali J, et al. Tuberculous lesions in pigs in the Czech Republic in the years 1990–1999: occurrence, causal factors and economic losses. *Vet Med (Praha)*. 2003; 48(5):113–125.
7. Wellenberg GJ, de Haas PE, van Ingen J, van Soelingen D, Visser IJ. Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and wasting in pigs. *Vet Rec*. 2010 Sep 18; 167(12):451–4. <https://doi.org/10.1136/vr.c4274> PMID: 20852249.
8. Hibiya K, Utsunomiya K, Yoshida T, Toma S, Higa F, Tateyama M, et al. Pathogenesis of systemic *Mycobacterium avium* infection in pigs through histological analysis of hepatic lesions. *Can J Vet Res*. 2010 Oct; 74(4):252–7. PMID: 21197224; PubMed Central PMCID: PMC2949337.
9. Kaczmarkowska A, Didkowska A, Kwiecień E, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. The *Mycobacterium avium* complex—an underestimated threat to humans and animals. *Ann Agric Environ Med*. 2021. <https://doi.org/10.26444/aaem/136398> PMID: 35352901
10. Hibiya K, Kasumi Y, Sugawara I, Fujita J. Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008 Jul; 31(4):347–66. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.05.001> PMID: 17629560.
11. Torriani FJ, McCutchan JA, Bozzette SA, Grafe MR, Havlir DV. Autopsy findings in AIDS patients with *Mycobacterium avium* complex bacteremia. *J Infect Dis*. 1994 Dec; 170(6):1601–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.6.1601> PMID: 7996004.
12. Agdestein A, Olsen I, Jørgensen A, Dønne B, Johansen TB. Novel insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs and possible implications for human health. *Vet Res*. 2014 Apr 17; 45(1):46. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-46> PMID: 24742183; PubMed Central PMCID: PMC4021465.
13. Kriz P, Kaevska M, Slana I, Bartejsova I, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in lymph nodes and diaphragms of pigs from one infected herd in the Czech Republic. *J Food Prot*. 2014 Jan; 77(1):141–4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-036> PMID: 24406012.
14. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls.
15. Klanicova-Zalewska B, Slana I. Presence and persistence of *Mycobacterium avium* and other nontuberculous mycobacteria in animal tissues and derived foods: a review. *Meat Sci*. 2014 Dec; 98(4):835–41. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.08.001> PMID: 25170820.
16. Sevilla IA, Molina E, Tello M, Elguezabal N, Juste RA, Garrido JM. Detection of Mycobacteria by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets. *Front Microbiol*. 2017 Jun 9; 8:1030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01030> PMID: 28649235; PubMed Central PMCID: PMC5465283.
17. Klanicova B, Slana I, Vondruskova H, Kaevska M, Pavlik I. Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies in meat products. *J Food Prot*. 2011 Apr; 74(4):636–40. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-332> PMID: 21477480.
18. Burnham KP, Anderson DR. Model selection and multimodel inference: a practical information—theoretic approach. 2nd ed. New York: Springer; 2002.
19. Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, et al. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and

- '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Sep; 52(5):1505–1518. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1505> PMID: 12361252.
20. Matlova L, Dvorska L, Bartl J, Bartoš M, Ayele WY, Alexa M, et al. Mycobacteria isolated from the environment of pig farms in the Czech Republic during the years 1996 to 2002. *Vet Med Czech*. 2003; 48(12):343–357.
 21. Matlova L, Dvorska L, Ayele WY, Bartos M, Amemori T, Pavlik I. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J Clin Microbiol*. 2005 Mar; 43(3):1261–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1261-1268.2005> PMID: 15750094; PubMed Central PMCID: PMC1081227.
 22. García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Martínez R, Carranza J, Cerrato R, García-Sánchez A, et al. Non-tuberculous mycobacteria in wild boar (*Sus scrofa*) from Southern Spain: epidemiological, clinical and diagnostic concerns. *Transbound Emerg Dis*. 2015 Feb; 62(1):72–80. <https://doi.org/10.1111/tbed.12083> PMID: 23895110.
 23. Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Amarilla SP, Vela AI, Carrasco L, Fernández-Garayzábal JF, et al. Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-Like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. *Plos one*. 2015; 10(9):e0139130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139130> PMID: 26418681
 24. van Ingen J, Wisselink HJ, van Solt-Smits CB, Boeree MJ, van Soolingen D. Isolation of mycobacteria other than *Mycobacterium avium* from porcine lymph nodes. *Vet Microbiol*. 2010 Jul 29; 144(1–2):250–3. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.047> PMID: 20097017.



The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

Aleksandra Kaczmarkowska^{1,A-F}, Anna Didkowska^{1,B-E}, Ewelina Kwiecień^{2,B-D},
Ilona Stefańska^{2,B-D}, Magdalena Rzewuska^{2,C,E}, Krzysztof Anusz^{1,C,E}

¹ Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Warsaw, Poland

² Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Warsaw, Poland

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation, D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F – Final approval of article

Kaczmarkowska A, Didkowska A, Kwiecień E, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals. *Ann Agric Environ Med*. 2022; 29(1): 22–27. doi: 10.26444/aaem/136398

Abstract

Introduction and objective. The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is a group of acid-resistant bacteria within the *Mycobacteriaceae*. Their cell walls have a specific structure impervious to many disinfectants. Mycobacteria are widespread in the environment and can also be found in food. This aim of the article is to review the current state of knowledge about the sources of infection, symptoms and treatment of MAC diseases in humans and animals, and summarizes the available methods for identifying the bacteria. It pays a special attention to the zoonotic potential of MAC bacteria and possible routes of transmission between humans and animals, including possible food-borne routes.

Brief description of the state of knowledge. MAC bacterial infections occur both in immunocompetent people and those with functional predispositions and compromised immunity, particularly during HIV infection or immunosuppressive treatment. The incidence of MAC infections in humans is growing, with the most common form of infection being pulmonary disease (MTC-PD); however, there are conflicting reports on the role of *Mycobacterium avium* paratuberculosis (MAP) in the development of Crohn's disease. MAC bacteria can also attack livestock, household pets, and wild animals. Unfortunately, treatment is lengthy and often fails due to microbiological relapse; there is also increasing evidence of MAC bacteria are developing multi-drug resistance.

Conclusions. Although new antibiotics are being created to inhibit the growth and division of *Mycobacterium avium*, there is clearly a need for further research into the virulence factors associated with MAC bacteria. Further studies should also examine the role of MAP in the etiopathogenesis of Crohn's disease.

Key words

biofilm, Crohn's disease, MAC, multi-drug resistance, MAP, MOTT, Mycobacteriosis, pets

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is a group of slow-growing bacteria of the *Mycobacteriaceae*, classified as MOTT, i.e. Mycobacteria Other Than Tuberculosis. MOTT are found globally and are widespread in the environment; they are also responsible for opportunistic infections in humans, livestock and wild animals. Such non-tuberculous *mycobacterial* diseases present a major threat to public health, especially in developed countries [1]. The rapid increase in MAC infections worldwide is associated with the growing number of immunocompromised patients [2]. In addition, humans and animals are subject to a continuous increase in environ and milk, as well as in heat-treated animal products [4, 5]. In humans, skin contact with MAC bacteria, consumption of contaminated food, or even aerosols, can result in a range of symptoms, such as lymphadenitis, lung infections, and infections of the skin and soft tissue [6].

OBJECTIVE

The aim of this review article is to present the current state of knowledge about MAC infections in humans and animals, the virulence factors of MAC bacteria and potential sources of infection, as well as future research on new drugs. The review describes the etiological factors of mycobacteriosis, prevalence of these diseases, ways of identification, pathogenesis and immunology of infection, clinical signs and treatment in both humans and animals. A summary of the most important information and current trends in this area is also presented.

STATE OF KNOWLEDGE

Etiological factor. Mycobacteria are gram-positive acid-resistant bacilli capable of surviving in host phagolysosomes. The *Mycobacterium* genus demonstrate hydrophobicity, impermeability, and slow growth; they are also resistant to disinfectants and antibiotics, which has been attributed to the presence of a lipid-rich outer membrane enriched with long-chain mycolic acids [7]. Over 180 species of mycobacteria have been identified to-date [8]. The genus *Mycobacterium* includes *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), *M. leprae* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) [9],

Address for correspondence: Aleksandra Kaczmarkowska, Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-776, Warsaw, Poland
E-mail: aleksandra_kaczmarkowska@sggw.edu.pl

Received: 21.03.2021; accepted: 05.05.2021; first published: 25.05.2021

including MAC, which are widespread in the environment. Historically, the MAC consisted of two species: *M. avium* and *M. intracellulare*. This division was based on pathogenicity in birds, with *M. avium* being pathogenic and *M. intracellulare* non-virulent. However, in September 2018, a new taxonomic division was proposed, comprising *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. bouchodurhonense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. ituriense*, *M. lepraemurium*, *M. marseillense*, *M. paraintracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. timonense*, *M. lukis*, and *M. yongonense* [10].

The most clinically-important subspecies of *M. avium* are believed to be *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *avium* (MAA) and *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS), and *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI). Of these, MAH, a ubiquitous environmental saprophyte, causes chronic lung disease and is an etiological agent of lymphadenitis in pigs. MAH also has a wide range of hosts: cases of disseminated MAH infection have been described in other mammals, including dogs, cats, cattle, goats, domestic rabbits, cervidae and horses [11, 12, 13, 14]. MAA and MAS are most often isolated from birds, in which their symptoms and course resemble tuberculosis [3]. MAP is responsible for Johne's disease, which mainly affects ruminants. *M. chimaera* has also been isolated from patients after heart valve surgery, where it caused infections at the site of surgery, as well as endocarditis, both with a high mortality rate [15].

Prevalence. The majority of MAC species are found in natural waters, water supply systems, and soils [16, 17, 18], as well as in raw [19], cooked and fermented meat products [4], pasteurized milk [20] or other dairy products [21]. Fresh or frozen fruit and vegetables can also be a source of infection [22]. NTMs are oligotrophs that are capable of growing in low carbon environments, and thus surviving in nutrient-poor environments. In addition, thanks to their oligotrophicity and capacity for biofilm production, the bacteria can grow in drinking water distribution systems and water supply networks [7]. This can pose a serious threat: humans can become infected by inhaling aerosols containing NTMs in the shower or in the swimming pool [23]. Interestingly, MAC can persist in amoebas: wild amoebas can provide an ideal environment for bacteria to multiply, and can promote their persistence in macrophages [3, 24, 25].

Identification. Microbiological identification involves mainly isolation and culture of the bacteria on selective media in conventional or automatic systems. Conventional approaches include the use of Löwenstein-Jensen (with malachite green), Ogawa (with sodium glutamate) and Stonebrink (sodium pyruvate) media. Bacterial growth lasts from four to twelve weeks and the results are based on visual evaluation [26]. Automatic systems (Bactec MGIT 960, Bactec 460 Tb) [27, 28] automatically record the growth of mycobacteria using a liquid media with known composition. The presence of bacteria is typically confirmed after around five to twelve days of culture. After multiplication of the bacteria on the media, a common identification method is Ziehl-Neelsen staining [29]. The obtained strains can also be used in further, more advanced molecular identification methods.

Serological diagnostics are most commonly performed by detecting specific antibodies using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). This approach is mainly used to detect

anti-MAP antibodies [30]. The test is fast and inexpensive, has a relatively high sensitivity and specificity, and serum or milk samples are easy to obtain [31]. *Mycobacterium* infection can also be detected by the agar gel immunodiffusion test (AGID) [32]: the antigen and antibodies diffuse through a semi-solid agar medium, forming a precipitation where they interact. Typically, a positive result would be indicated by the presence of one or more visible lines in the gel. The AGID has many advantages: it is inexpensive, easy to perform and does not require any specialized auxiliary equipment; however its main disadvantage is its relatively low sensitivity [33].

When identifying *Mycobacterium* species, molecular techniques have a higher sensitivity than serological methods and the results are typically available within 24–48 hours. Molecular methods also offer the further advantage that they can be used to directly identify a species or subspecies, and to detect drug resistance. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a fast and practical identification technique that can be found in a range of variants, such as Ligase Chain Reaction (LCR), Strand Displacement Amplification (SDA), Nucleic Acid Sequence – Based Amplification (NASBA) [34], and Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragments Length Polymorphism PCR-RFLP [35]. Commercial linear probe assays (LPA) are also used to identify the most commonly-occurring NTM strains at species or subspecies level [36]. Several commercial hybridization probes are available, including AccuProbe (Genprobe, San Diego, California), INNO-LiPA (Innogenetics, Ghent, Belgium) or GenoType *Mycobacterium* assay (Hain, Lifescience, Germany) [6].

In 2012, a reference genotyping technique was introduced, known as MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Numbers of Tandem Repeat), based on the analysis of a variable number of tandem repetitions, [37]. The *Mycobacterium* genome contains repeated sequences of several to several dozen base pairs, the number of which varies between strains of the same species. The largest group of VNTR motifs comprises 46–100 nucleotide MIRU sequences. Of the 41 loci that have been identified so far, the 15 with the highest variability are used in mycobacteria genotyping. Briefly, in MIRU-VNTR analysis, individual loci are amplified using appropriate oligonucleotide starter sequences, and the amplicons are then separated in agarose gel. The number of MIRU motif repetitions calculated for each locus allows the results to be catalogued as a 15-digit MIRU-VNTR code [38]. Nowadays, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) is gaining significance in MAC identification: a mass spectrometry-based approach which enables identification of microorganisms by comparing their protein content with reference spectra in a database [39, 40].

Pathogenesis and immunology of infection. The exact pathogenesis of MAC infections and their virulence factors are not yet fully understood. However, evidence suggests that after passing through the oral cavity, the bacteria interact with the gastrointestinal mucosa: *in vitro* studies have confirmed that MAC are able to bind to enterocytes [41]. Such binding may be facilitated by the presence of adhesion proteins on the surface of the bacteria. After passing through the mechanical barriers, mycobacteria are recognized by mononuclear macrophages. This interaction leads to phagocytosis and the release of reactive metabolites, resulting in the initiation of intracellular signaling and the release of cytokines and

chemokines; these are responsible for further activation of the host immune response and chemotaxis of immune cells. MACs employ several mechanisms to survive in adverse conditions inside macrophages: they produce agents that inhibit the mechanisms associated with an oxidative burst (e.g. superoxide dismutase or heat shock proteins), or inhibit the fusion of phagosome and lysosome [42].

The recognition of MAC by macrophages mainly acts through toll-like receptor 2 (TLR2) [43]; this leads to the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukins IL-1 β , IL-12, IL-18, tumour necrosis factor α (TNF α), as well as chemokines such as the C-X-C motif chemokine 10 (CXCL-10) [42]. Chemokines and TNF α cause taxis of inflammatory cells such as lymphocytes, macrophages and dendritic cells, to the inflammation site. The activated macrophages, together with the living mycobacteria, migrate to lymph nodes; here, the antigen is presented to T helper cells by the major histocompatibility complex class II (MHC II). This mechanism induces a specific immune response in the host [42]. The ability of macrophages to kill mycobacteria is enhanced by the presence of Th1 lymphocytes, which secrete IFN- γ and IL-2. In addition, mycobacteria can also be recognized by the MHC II independent pathway thanks to cluster of differentiation 1 (CD1) [42]. Such recognition is specific to $\gamma\delta$ T lymphocytes, which are highly reactive towards mycobacteria and capable of killing them [42].

The immune response develops for four to six weeks after infection. Eventually, the bacteria stop multiplying and become trapped in granulomas formed as a result of the host immune response, thus isolating the pathogen. However, this isolation provides the mycobacteria with a niche in which they can survive for a long time by modulating the immune response. The granuloma consists mainly of blood-derived macrophages, epithelial cells (differentiated macrophages) and multinuclear giant cells (also known as Langhans giant cells), which are surrounded by T lymphocytes and fibroblasts [6]. In the middle of the granuloma, a caseous necrosis can occur, in which the decayed cells are located.

Pathogenesis and clinical signs in humans. MAC infections occur mainly in people with functional predispositions or compromised immunity [44]. NTM infections are most commonly associated with secondary immunodeficiency caused by Human Immunodeficiency Virus and TNF- α antagonist therapy, as well as by pulmonary diseases, such as cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease, and by immunosuppressive treatment after transplantation or other systemic diseases [6, 45]. Gastro-oesophageal reflux disease (GERD), vitamin D deficiency, rheumatoid arthritis or low body mass index are also risk factors for NTM infection [2]. However, the disease may also develop in immunocompetent people [8, 46, 47].

The most frequently detected NTM causing infection in humans is MAH [6]. Infection usually occurs by inhalation, via contaminated aerosols, or through injured skin [6]. The most common form of infection caused by MAC complex worldwide is MAC-PD pulmonary disease [48,49], which has two clinical forms: fibrous-cavernous and nodular. The former is usually associated with lung diseases already developing in the body, such as lung tuberculosis or chronic obstructive pulmonary disease (COPD); this variant often affects older men and demonstrates rapid progression [8]. The nodular form is characterized by bilateral bronchial dilatation

with numerous nodules (Lady Windermere syndrome). It usually occurs in non-smoking post-menopausal women and is characterized by a slow progression [2, 18]. Clinical indications of NTM-PD may be indistinguishable from those of tuberculosis or other respiratory diseases, including lung cancer. The general symptoms are fatigue, fever, and weight loss, while the respiratory symptoms are coughing, haemoptysis and dyspnea [49].

MAC is also known to be responsible for a lung disease resembling hypersensitivity pneumonitis. It was first described at the end of the last century in patients who had used rehabilitation pools or spa baths before the symptoms occurred. Initially, it is accompanied by flu-like symptoms, followed by coughing, dyspnea, fever and night sweats [6]. Another relatively common form of disease caused by MAC, particularly among children, is peripheral lymphadenopathy. The infection most likely occurs through the digestive tract [6]. In humans, MAC can also cause gastrointestinal, skin and soft tissue infection [2, 50].

There are conflicting reports on the role of MAP in the pathogenesis of Crohn's disease. The fact that Crohn's disease follows a similar course to John's disease, and MAP have been isolated from peripheral blood mononuclear cells in 50–100% of patients with Crohn's disease [51] suggests that MAP may play a role in the origin of the disease [51, 52, 53, 54]. Crohn's disease can attack any part of the gastrointestinal tract from the mouth to the anus and is often manifested by abdominal pain, loss of energy and weight, mouth ulcers and joint pain. It is commonly associated with diarrhea interspersed with mucus, pus or blood, and about 40% of patients need an ileostomy or colostomy [18].

Pathogenesis and clinical signs in animals. MAC bacteria are also known to cause disease in many animal species, such as dogs [55], cats [56], pigs [42], cattle [57], horses [12] and birds [58]. MAC infections are rarely diagnosed in dogs; however, the presence of the disease is generally regarded to be associated with immunodeficiency. Some breeds are more susceptible to MAC infection, particularly miniature schnauzers [59] and bassets [60]. In miniature schnauzers, this MAC susceptibility has been attributed to a recessive inherited defect in CARD9 adaptive protein [59, 61]. However, most of the described cases of canine mycobacteriosis concern MAP infections, which can cause long-lasting diarrhea and vomiting [62, 63]. Indeed, MAP-specific DNA was found in intestinal biopsy in 19% of dogs with chronic vomiting and diarrhea, while in dogs without gastrointestinal diseases, MAP DNA was not detected [63]. Occasionally, *M. avium* may cause skin lesions in dogs [64]. Given the zoonotic potential of a MAC-infected dog, it can pose a health risk to humans [59], especially to immunocompromised owners.

In cats, infections with MA complex bacteria occur as infrequently as in dogs. The most common clinical signs include weight loss, lethargy and anorexia [56, 65]. However, one study reported a case of CNS symptoms in a cat during empyema-complicated meningitis caused by MAH [13].

In pigs, MAH is the most frequently-isolated pathogen, while MAA is rarely detected. Although MAH infection usually has a subclinical course in pigs, it is nevertheless an economic problem: the pathological lesions are usually located in the mesenteric or mandibular lymph nodes [66], and these are rejected as unfit for human and animal consumption during *post-mortem* examination, together

with other infected tissues. New studies show that *M. avium* complex can occur in lymph nodes that demonstrate no visible changes during the veterinary sanitary examination, and such carcasses are a potential source of human infection [67]; this is particularly the case for minced meat, which can contain lymph nodes [4]. *M. avium* isolates of human origin have been found to closely resemble those of pig origin [68], suggesting the existence of epidemiological links between infections in pigs and infections in humans, or of infections from common sources [68]. Pigs commonly become infected from sources in the external environment, such as litter, feed, water or soil, following contamination with the faeces of wild birds or small land mammals [6]; infection typically occurs through the alimentary route [42, 69].

The tissue changes caused by MAC bacteria in cattle are indistinguishable from those caused by MTC bacteria, which may make diagnosis difficult. Granulomatous lesions are mainly located in the lymph nodes of the gastrointestinal and respiratory systems, although there have been cases of systemic disease [57, 70, 71]. Ruminants are most often infected by MAP, resulting in chronic inflammation of the intestines, called Johne's disease or paratuberculosis. Johne's disease is a progressive intestinal disease that impairs nutrient absorption due to thickening of the intestinal wall [72, 73]. Infected individuals are exhausted by diarrhea, which can lead to the death of the animal. MAP infections hence lead to big economic losses, especially in dairy herds [72, 73].

Horses are relatively resistant to MAC infections, with documented cases referring more to MAA [74] and MAH [12] infections. In the course of the disease, horses often suffer from diarrhea, mastitis and neck stiffness, as well as dyspnea and chronic cough. However, since these symptoms can occur in many other diseases, a diagnosis of mycobacterial infection is difficult: diagnostics require a biopsy of the rectum or distal part of the colon, followed by staining for acid-resistant mycobacteria and bacteriological culture of granulomatous lesions [74].

The main etiological factor of mycobacteria in birds is MAA. In such cases, the bird usually becomes sick first, and then acts as the main reservoir of bacteria. Mycobacterioses are a common problem in poultry as well as domestic birds [58, 75]. The disease is rare in intensive poultry breeding due to improved breeding practices. Transmission usually occurs by the oral route, and airborne infections are less common [76]. Symptoms in birds include emaciation, apathy and diarrhea, along with a distinct atrophy of the chest muscles. *M. avium* infection initially involves the intestine, and then spreads to the liver, spleen, bone marrow, lungs, air sacs, and gonads [77]. Later stages of the disease are characterized by the appearance of non-calcified nodules [77]. In some cases, skin lesions can also be observed [76]. So far, no evidence of direct transmission of atypical mycobacteria between birds and humans has been shown, but it cannot be excluded that diseased animals may be a source of infection for humans in their environment [75]. Studies conducted in the Murcia region, Spain, confirm that *M. avium* plaitstudy was regular contact between children and hens [78].

Treatment. The main treatment options for diseases caused by MAC bacteria in humans and animals are macrolide antibiotics such as clarithromycin or azithromycin [79, 80, 81]. The 2007 American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA) guidelines recommend that

treatment should be based on macrolides in combination with rifampicin and ethambutol. Additionally, streptomycin or parenteral amikacin can be administered [8]. Recently suggested alternatives include bedaquiline, which has shown high efficacy against *M. avium*, and Liposomal Amikacin for Inhalation [82]. In humans and animals, treatment of an MAC-caused disease requires prolonged antibiotic therapy, i.e. continuing for at least 12 months after negative cultures with continuous drug use, and even after successful completion, recurrence has been found to recur in 32% – 48% of cases, usually due to MAC-reinfection [3]. A similar treatment protocol based on a combination of ethambutol with multiple antimicrobial agents, including rifampicin, clarithromycin, moxyfloxacin and doxycycline, is used in companion animals [79]; however, cats tend to respond better than dogs [79].

Due to the growing incidence of multidrug resistance among MAC bacteria [6,75], there is a constant need for new antibiotics. Studies have been conducted on the inhibitory effects of $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, GaCl_3 , gallium meso tetraphenylporphyrine (GaTP) and gallium nanoparticles (GaNP) on intra- and extra-cellular MAC bacteria [83]. MAC bacteria also show resistance to chemical disinfectants and ultraviolet radiation [18], mainly due to the structure of their cell wall and the impermeability of their cell membrane [6]. In addition, MAC bacteria are capable of producing enzymes that break down or inactivate antimicrobial agents [82]. Another resistance mechanism observed in *M. avium* is the development of biofilms in the environment, water distribution systems and the human respiratory tract, especially in people with cystic fibrosis or bronchial dilatation, which further reduces the effectiveness of antimicrobial agents [84]. Moreover, the biofilm allows *M. avium* to survive traditional disinfection procedures and confers resistance against chlorine and acidic pH [82]. Biofilm production allows MAC to reduce its interaction with the drug by generating an impermeable biofilm layer. In addition, mutations in the bacterial genome cause primary or induced resistance to therapeutic preparations such as macrolides or rifampicin [6].

CONCLUSIONS

M. avium is one of the most commonly-isolated NTM species worldwide and a potential zoonotic agent. Although the transmission of MAC bacteria from animals to humans has not been confirmed, the number of infections caused by MAC in both humans and animals has been increasing. Such infections are difficult to treat due to the production of various resistance factors that protect the bacteria from antibiotics. The search continues for new drugs that will be effective against MAC infections; however, there is a need to identify all the virulence factors associated with infection to better understand its mechanism. In addition, further research on the etiopathogenesis of Crohn's disease is needed to determine whether MAP plays a role in its development.

REFERENCES

- Choi SR, Britigan BE, Switzer B, et al. In Vitro Efficacy of Free and Nanoparticle Formulations of Gallium(III) meso-Tetraphenylporphyrine against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* and Gallium Biodistribution in Mice. *Mol Pharm*. 2018; 15(3): 1215–1225. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01036>
- Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, et al. The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Front Immunol*. 2020; 11: 303. doi: 10.3389/fimmu.2020.00303.
- Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* complex. *Front Med (Lausanne)*. 2017; 4: 27. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00027>
- Klancicova B, Slana I, Vondruskova H, et al. Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies in meat products. *J Food Prot*. 2011; 74(4): 636–640. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-332>
- Gerrard ZE, Swift BMC, Botsaris G, et al. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk. *Food Microbiol*. 2018; 74: 57–63. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.004
- Slany M, Ulmann V, Slana I. Avian Mycobacteriosis: Still Existing Threat to Humans. *Biomed Res Int*. 2016; 4387461: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/4387461>
- Falkinham JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol*. 2009; 107(2): 356–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x>
- Kwon YS, Koh WJ, Daley CL. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Tuberc Respir Dis*. 2019; 82(1): 15–26. <https://doi.org/10.4046/trd.2018.0060>
- Rindi L, Garzelli C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet and Evol*. 2014; 21: 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.007>
- van Ingen J, Turenne CY, Tortoli E, et al. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68(11): 3666–3677. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003026>
- Klotz D, Barth SA, Baumgartner W, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a domestic rabbit. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24(3): 596–598. <https://doi.org/10.3201/eid2403.171692>
- Kinoshita Y, Takechi M, Uchida-Fujii E, et al. Ten cases of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infections linked to equine abortions in Japan, 2018–2019. *Vet Med Sci*. 2020; 00: 1–5. doi: 10.1002/vms3.411
- Madarame H, Saito M, Ogihara K, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* meningoencephalitis in a cat. *Vet Microbiol*. 2017; 204: 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.008>
- Scherrer S, Stephan R, Zumthor JP, et al. Morphological and Molecular Characterization of a New *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* S-Type Strain Genotype in Goats. *Front Vet Sci*. 2019; 6(250). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00250>
- Kohler P, Kuster SP, Bloemberg G, et al. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *Eur Heart J*. 2015; 21(40): 2745–2753. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv342>
- Lahiri A, Kneisel J, Kloster I, et al. Abundance of *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis* in soil and dust in Germany – implications for the infection route. *Lett Appl Microbiol*. 2014; 59(1): 65–70. doi: 10.1111/lam.12243
- Honda JR, Virdi R, Chan ED. Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2029. doi: 10.3389/fmicb.2018.02029. PMID: 30214436; PMCID: PMC6125357.
- Whiley H, Keegan A, Giglio S, et al. *Mycobacterium avium* complex: the role of potable water in disease transmission. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(2): 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05298.x>
- Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Amarilla SP, et al. Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-Like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. *PLoS One*. 2015; 10: e0139130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139130>
- Sgarioni SA, Hirata RD, Hirata MH, et al. Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014; 45(2): 707–711. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000200046>
- Sevilla IA, Molina E, Tello M, et al. Detection of *Mycobacteria* by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets. *Front Microbiol*. 2017; 8: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01030>
- Dziedzinska R, Makovcova J, Kaevska M, et al. Nontuberculous Mycobacteria on Ready-to-Eat, Raw and Frozen Fruits and Vegetables. *J Food Prot*. 2016; 79(8): 1452–1456. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-030>
- Thomson, R, Tolson C, Carter R, et al. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(9): 3006–3011. <https://doi.org/10.1128/JCM.00899-13>
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, et al. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*. 1997; 65(9): 3759–3767. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.9.3759-3767.1997>
- Steinert M, Birkness K, White E, et al. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(6): 2256–2261. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2256-2261.1998>
- Mayahi M, Mosavari N, Esmaeilzadeh S, et al. Comparison of four different culture media for growth of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolated from naturally infected lofts of domestic pigeons. *Iran J Microbiol*. 2013; 5(4): 379–382.
- Kabongo Kayoka PN, Obi CL, Nakajima C, et al. Novel *Mycobacterium avium* Complex Species Isolated From Black Wildebeest (*Connochaetes gnou*) in South Africa. *Transbound Emerg Dis*. 2017; 64(3): 929–937. <https://doi.org/10.1111/tbed.12460>
- Kehrmann J, Schoerding A K, Murali R, et al. Performance of Vitek MS in identifying nontuberculous mycobacteria from MGIT liquid medium and Lowenstein-Jensen solid medium. *Diagn Microb Infect Dis*. 2016; 84(1): 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.007>
- Nemati M. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the mesenteric lymph nodes of goats by PCR and culture. *J Livest Sci Technol*. 2015; 3(2): 56–60.
- Hemati Z, Haghkhah M, Derakhshandeh A, et al. Novel recombinant Mce-truncated protein based ELISA for the diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in domestic livestock. *PLoS One*. 2020; 15(6): e0233695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233695>
- Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R, et al. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *J Vet Diagn Invest*. 2011; 23(1): 77–83. <https://doi.org/10.1177/104063871102300111>
- Kumthekar S, Manning EJ, Ghosh P, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* confirmed following serological surveillance of small ruminants in Grenada, West Indies. *J Vet Diagn Invest*. 2013; 25(4): 527–530. <https://doi.org/10.1177/1040638713490688>
- Gumber S, Eamens G, Whittington RJ. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet Microbiol*. 2006; 115(1–3): 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.003>
- Handa U, Mundi I, Mohan S. Nodal tuberculosis revisited: a review. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(1): 6–12. <https://doi.org/10.3855/jidc.2090>
- Nonr-Neamatollahie A, Ebrahimzadeh N, Siadat SD, et al. Distribution of non-tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR-RFLP. *Saudi J Biol Sci*. 2017; 24(6): 1380–1386. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.001
- Huh HJ, Kim SY, Shim HJ, et al. GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* and Determination of Clarithromycin and Amikacin Resistance. *J Clin Microbiol*. 2019; 57(8): 00516–00519. <https://doi.org/10.1128/JCM.00516-19>
- Jonsson J, Hoffner S, Berggren I, et al. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PLoS ONE*. 2014; 9(4): e95159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095159>
- Mediavilla-Gradolph MC, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, et al. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterial Species Isolated from Clinical Specimens. *BioMed Res Int*. 2015; 1–6. doi: 10.1155/2015/854078
- Alcolea-Medina A, Fernandez MTC, Montiel N, et al. An improved simple method for the identification of *Mycobacteria* by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization mass spectrometry). *Sci Rep*. 2019; 9(1): 20216. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56604-7>
- Neuschlova M, Vladarova M, Kompanikova J, et al. Identification of *Mycobacterium* Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1021: 37–42. https://doi.org/10.1007/5584_2017_26
- Sangari FJ, Goodman J, Petrofsky M, et al. *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes.

- Infect Immun. 2001; 69(3): 1515–1520. <https://doi.org/S10.1128/IAI.69.3.1515-1520.2001>
42. Hulinova Stromeřova N, Faldyna M. Mycobacterium avium complex infection in pigs: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018; 57: 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.06.005>
 43. Ferraz JC, Melo FBS, Albuquerque MFP, et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(11): 1387–1397. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006001100002>
 44. Heidary M, Nasiri MJ, Mirsaedi M, et al. Mycobacterium avium complex infection in patients with human immunodeficiency virus: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2019; 234(7): 9994–10001. <https://doi.org/10.1002/jcp.27859>
 45. van Ingen J, Griffith DE, Aksamit TR, et al. Pulmonary diseases caused by non-tuberculous mycobacteria. *European Respiratory Monograph*, 2012; 58: 25–37. <https://doi.org/10.1183/1025448x.10022511>
 46. Shah NM, Davidson JA, Anderson LF, et al. Pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare is the main driver of the rise in non-tuberculous mycobacteria incidence in England, Wales and Northern Ireland, 2007–2012. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 195. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1521-3>
 47. Stout JE, Koh WJ, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis*. 2016; 45: 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.006>
 48. Cowman S, van Ingen J, Griffith DE, Loebinger MR. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2019; 54(1): 1900250. doi: 10.1183/13993003.00250-2019
 49. Wassilew N, Hoffmann H, Andrejak C, et al. Pulmonary Disease Caused by Non-Tuberculous Mycobacteria. *Respiration*. 2016; 91(5): 386–402. <https://doi.org/10.1159/000445906>
 50. Dyer J, Weiss J, Steiner WS, et al. Primary cutaneous Mycobacterium avium complex infection following squamous cell carcinoma excision. *Cutis*. 2016; 98(6): E8–E11.
 51. McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, et al. Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 9(12): 1523–1534. <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1093931>
 52. Davis WC. On deaf ears, Mycobacterium avium paratuberculosis in pathogenesis Crohn's and other diseases. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(48): 13411–13417. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i48.13411>
 53. Naser SA, Sagrarsingh SR, Naser AS, et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(23): 7403–7415. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7403>
 54. Sechi LA, Dow CT. Mycobacterium avium ss. paratuberculosis Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn's Disease. *Front Immunol*. 2015; 6: 96. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00096>
 55. Kim MC, Kim J, Kang W, et al. Systemic infection of Mycobacterium avium subspecies hominissuis and fungus in a pet dog. *J Vet Med Sci*. 2016; 78(1): 157–60. doi: 10.1292/jvms.15-0285
 56. Yoshida S, Araki T, Asai T, et al. Phylogenetic uniqueness of Mycobacterium avium subspecies hominissuis isolated from an abnormal pulmonary bovine case. *Infect Genet Evol*. 2018; 62: 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.013>
 57. Sattar A, Zakaria Z, Abu J, et al. Isolation of Mycobacterium avium and other nontuberculous mycobacteria in chickens and captive birds in peninsular Malaysia. *BMC Vet Res*. 2021; 17(1): 13. doi: 10.1186/s12917-020-02695-8
 58. Ghielmetti G, Giger U. Mycobacterium avium: an Emerging Pathogen for Dog Breeds with Hereditary Immunodeficiencies. *Curr Clin Micro Rpt*. 2020; 7: 67–80. <https://doi.org/10.1007/s40588-020-00145-5>
 59. Kontos V, Papadogiannakis EI, Mantziaras G, et al. A Case of Disseminated Mycobacterium avium Infection in a Dog in Greece. *Case Rep Vet Med*. 2014; 1–3. 2014.
 60. Barandiaran S, Martínez Vivot M, Falzoni E, et al. Mycobacterioses in dogs and cats from Buenos Aires, Argentina. *J Vet Diagn Invest*. 2017; 29(5): 729–732. <https://doi.org/10.1177/104063871713795>
 61. Miller MA, Davey SC, van Helden LS, et al. Paratuberculosis in a domestic dog in South Africa. *J S Afr Vet Assoc*. 2017; 88(0): e1–e5. <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1441>
 62. Glanemann B, Schönenbrücher H, Bridger N, et al. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. *J Vet Intern Med*. 2008; 22(5): 1090–1094. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0147.x>
 63. Sharp E, Taylor S, O'Halloran C. Unusual presentation of canine Mycobacterium avium infection. *Vet Rec*. 2019; 184(26): 800. <https://doi.org/10.1136/vr.105311>
 64. Paharsingh I, Suepaul R, Gyan L, et al. Disseminated Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection and ascites in an FIV-positive cat. *Vet Clin Pathol*. 2020; 00: 1–5. doi: 10.1111/vcp.12897
 65. Polaček V, Vidanović D, Božić B, et al. The Role of Myofibroblasts in Granulomatous Lymphadenitis in Pigs Naturally Infected with M. avium subsp. hominissuis. *Mac Vet Rev*. 2018; 41(1): 47–53. <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2017-0030>
 66. Agdestein A, Olsen I, Jørgensen A, et al. Novel insights into transmission routes of Mycobacterium avium in pigs and possible implications for human health. *Vet Res*. 2014; 45(1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-46>
 67. Shin JI, Shin SJ, Shin MK. Differential Genotyping of Mycobacterium avium Complex and Its Implications in Clinical and Environmental Epidemiology. *Microorganisms*. 2020; 8(1): 98. doi: 10.3390/microorganisms8010098
 68. Hiller A, Oorburg D, Wisselink H, et al. Prevalence of Mycobacterium avium in Slaughter Pigs Based on Serological Monitoring Results and Bacteriological Validation. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(9): 4027–4038. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094027>
 69. Komatsu T, Inaba N, Kondo K, et al. Systemic mycobacteriosis caused by 'Mycobacterium avium subspecies hominissuis' in a 14-month-old Japanese black beef steer. *J Vet Med Sci*. 2017; 79(8): 1384–1388. doi: 10.1292/jvms.17-0204
 70. Scherrer S, Landolt P, Carroli N, et al. Molecular Characterization of Mycobacterium avium subsp. hominissuis of Two Groups of Lymph Nodes, Being Intradermal Tuberculin or Interferon-Gamma Test Positive and Negative, Isolated from Swiss Cattle at Slaughter. *Front Vet Sci*. 2018; 5: 32. doi: 10.3389/fvets.2018.00032
 71. Bates A, O'Brien R, Liggett S, et al. Control of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection on a New Zealand pastoral dairy farm. *BMC Vet Res*. 2019; 15(1): 266. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2014-6>
 72. Rasmussen P, Bakema HW, Mason S, et al. Economic losses due to John's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2021; 104(3): 3123–3143. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19381>
 73. Ryhner T, Wittenbrink M, Nitzl D, et al. Infection with Mycobacterium avium subspecies avium in a 10 year old Freiburger mare. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2009; 151(9): 443–447. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.151.9.443>
 74. Ledwoń A, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopec E, et al. Drug Susceptibility of Non-tuberculous Strains of Mycobacterium Isolated from Birds from Poland. *Pol J Microbiol*. 2018; 67(4): 487–492. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-057>
 75. Shivaprasad HL, Palmieri C. Pathology of mycobacteriosis in birds. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2012; 15(1): 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.11.004>
 76. Dhama K, Mahendran M, Tiwari R, et al. Tuberculosis in Birds: Insights into the Mycobacterium avium Infections. *Vet Med Int*. 2011; 712369. <https://doi.org/10.4061/2011/712369>
 77. Garcia-Marcos PW, Plaza-Fornieles M, Menasalvas-Ruiz A, et al. Risk factors of non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in children: a case-control study. *Eur J Pediatr*. 2017; 176(5): 607–613. <https://doi.org/10.1007/s00431-017-2882-3>
 78. Lam A, Foster D, Martin P, et al. Treatment of Mycobacterium avium infection in a dog. *Aust Vet Pract*. 2012; 42(2): 234–239.
 79. Moon SM, Park HY, Kim SY, et al. Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Resistance Mutations Associated with Macrolide-Resistant Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(11): 6758–6765. <https://doi.org/10.1128/AAC.01240-16>
 80. Fukushima K, Kitada S, Komukai S, et al. First line treatment selection modifies disease course and long-term clinical outcomes in Mycobacterium avium complex pulmonary disease. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 1178. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81025-w>
 81. Busatto C, Vianna JS, Silva LV da Junior, et al. Mycobacterium avium: an overview. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019; 114: 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.004>
 82. Chin KL, Sarmiento ME, Alvarez-Cabrera N, et al. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections: current state and future management. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020; 39(5): 799–826. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03771-0>
 83. Falkinham JO. Mycobacterium avium complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiol*. 2018; 4(3): 428–438. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.428>

lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

Warszawa, 15 października 2023 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień, Anna Didkowska, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

mój wkład w jej powstanie polegał na zbieraniu materiału do badań, współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 55%.

Podpis

Aleksandra Kaczmarkowska

Dr Ewelina Kwiecień

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, **Ewelina Kwiecień**, Anna Didkowska, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 15%.

Podpis

Ewelina Kwiecień

Dr Anna Didkowska

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień, **Anna Didkowska**, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis

**Anna
Didkowska**

Elektronicznie
podpisany przez
Anna Didkowska
Data: 2023.10.16
17:11:35 +02'00'

Dr Ilona Stefańska

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień, Anna Didkowska, **Ilona Stefańska**, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis 

Dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. SGGW

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień, Anna Didkowska, Ilona Stefańska, **Magdalena Rzewuska**, Krzysztof Anusz:

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

mój wkład w jej powstanie polegał na współdziałaniu w opracowaniu koncepcji i planu badania, nadzorowaniu prawidłowości prowadzonego badania oraz korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 10%.

Podpis



Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień, Anna Didkowska, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, **Krzysztof Anusz**:

The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badania, nadzorowaniu prawidłowości prowadzonego badania oraz korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 10%.

Podpis

KIEROWNIK KATEDRY

/ Prof. dr hab. Krzysztof Anusz /

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
INSTYTUT MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159
tel./fax: 22 59-36071; tel.: 22 59-36070

lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

Warszawa, 15 października 2023 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na zbieraniu materiału do badań, współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badania, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 52%.

Podpis

Aleksandra Kaczmarkowska

Dr Anna Didkowska

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, **Anna Didkowska**, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopec, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, współdziałale w badaniach mikrobiologicznych, opracowaniu wyników i pisaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 10%.

Podpis

Anna

Didkowska

Elektronicznie
podpisany przez
Anna Didkowska
Data: 2023.10.16
17:14:44 +02'00'

Dr Sylwia Brzezińska
Zakład Mikrobiologii
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
ul. Płocka 26
01-138 Warszawa

Warszawa, 15 października 2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

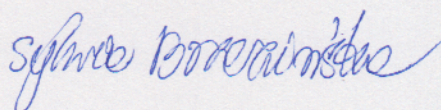
Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, **Sylwia Brzezińska**, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień,
Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of
Mycobacterium avium?

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach molekularnych oraz interpretacji
wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis



Warszawa, 15 października 2023 r.

Dr Daniel Klich

Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

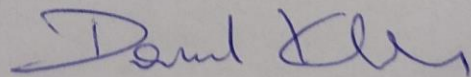
Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, **Daniel Klich**, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w wykonaniu doświadczeń oraz współudziale w opracowaniu statystycznym wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.



Podpis

Dr Ewelina Kwiecień

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, **Ewelina Kwiecień**, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w wykonaniu badań mikrobiologicznych.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis

Ewelina Kwiecień

Dr hab. Izabella Dolka

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159c

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień,
Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of
Mycobacterium avium?

mój wkład w jej powstanie polegał na współdziałaniu w interpretacji wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 1%.



Podpis

mgr Piotr Kociuba

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Ochrony Środowiska Przyrodniczego i Krajobrazu
Instytut Matematyki, Informatyki i Architektury Krajobrazu
Wydział Nauk Przyrodniczych i Technicznych
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Konstantynów 1 H
20-708 Lublin

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień,
Izabella Dolka, **Piotr Kociuba**, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of
Mycobacterium avium?

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w wykonaniu doświadczeń i opracowaniu wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 2%.

Podpis

Piotr Kociuba

Dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. SGGW

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, **Magdalena Rzewuska**, Ewa Augustynowicz – Kopeć, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis



Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz - Kopec

Warszawa, 7 września 2023r.

Zakład Mikrobiologii

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

ul. Płocka 26

01-138 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

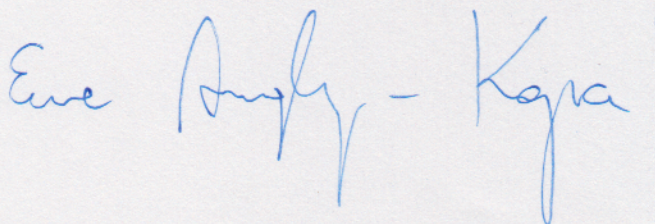
Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, **Ewa Augustynowicz – Kopec**, Krzysztof Anusz:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis



Prof. dr hab. Krzysztof Anusz
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

Warszawa, 15 października 2023 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz – Kopeć, **Krzysztof Anusz**:

Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badania, nadzorowaniu prawidłowości prowadzonego badania oraz korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 10%.

Podpis

KIEROWNIK KATEDRY

/ Prof. dr hab. Krzysztof Anusz /

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
INSTYTUT MEDYCYN WETERYNARYJNEJ
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159
tel./fax: 22 59-36071; tel.: 22 59-36070

lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

Warszawa, 15 października 2023 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Ewelina Kwiecień, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, zbieraniu danych literaturowych oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 70%.

Podpis

Aleksandra Kaczmarkowska

Dr Anna Didkowska

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, **Anna Didkowska**, Ewelina Kwiecień, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

mój wkład w jej powstanie polegał współdziałanie opracowaniu koncepcji manuskryptu, zbieraniu danych literaturowych oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 10%.

Podpis

Anna

Didkowska

Elektronicznie
podpisany przez
Anna Didkowska

Data: 2023.10.16
17:14:02 +02'00'

Dr Ewelina Kwiecień

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, **Ewelina Kwiecień**, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

mój wkład w jej powstanie polegał współudziale w pisaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis

Ewelina Kwiecień

Dr Ilona Stefańska

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Ewelina Kwiecień, **Ilona Stefańska**, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

mój wkład w jej powstanie polegał współdziałanie w pisaniu manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis

Ilona Stefańska

Dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. SGGW

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8

02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Ewelina Kwiecień, Ilona Stefańska,

Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz:

The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

mój wkład w jej powstanie polegał na korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis



Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Warszawa, 15 października 2023 r.

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Ewelina Kwiecień, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, **Krzysztof Anusz**:

The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu oraz korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5%.

Podpis

KIEROWNIK KATEDRY

/ Prof. dr hab. Krzysztof Anusz /

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
INSTYTUT MEDYCYN WETERYNARYJNEJ
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159
tel./fax: 22 59-36070; e-mail: 22 59-36070

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

.....

(podpis autora pracy)