דו"ח מסכם לתכנית מחקר מס' 20-14-0032

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

הפחתת הזיהומים בסלמונלה ובקמפילובקטר שמקורם בענף הלול (מיזם סלק)

Mitigation of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination in poultry

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

פרופ' שלמה סלע (סלדינגר), המחלקה לחקר איכות מזון ובטיחותו, המכון לחקר אחסון איכות תוצרת חקלאית ומזון, מינהל המחקר החקלאי shlomos@agri.gov.il

ד"ר אבישי לובלין, חטיבת העופות, מכון וטרינרי ע"ש קמרון. Avishail@moag.gov.il

ד"ר לאה ולינסקי, מנהלת היחידה לאפידמיולוגיה מולקולרית, המעבדות המרכזיות של משרד הבריאות. Lea.Valinsky@moh.health.gov.il

ד"ר יעל לאור, מרכז מחקרי נווה יער מינהל המחקר החקלאי laor@volcani.agri.gov.il

ד"ר אוהד גל-מור, מנהל המעבדה לחקר מחלות זיהומיות בשיבא

Ohad.Gal-Mor@sheba.health.gov.il

Shlomo Sela (Saldinger), Department of Food Quality and Safety, Institute for Postharvest and Food Sciences, ARO, P.O. Box 15159, Rishon LeZiyyon 75288096

Email: shlomos@volcani.agri.gov.il

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר שלמה סלע

טבת התש"פ

30.12.2019

השותפים במיזם

חברי וועדת ההיגוי

ד"ר סרחיו דולב, יו"ר	מנהל המחלקה לפיקוח על מוצרים מהחי, שו"ט
ד"ר ריבה בן עזרא, ס. יו"ר	יחידה וטרינרית, שירות המזון הארצי, משרד הבריאות
ד"ר מיכאל פירק	המעבדה לבריאות העוף ומעבדה צפונית, המועצה לענף הלול
ד"ר רם כץ	מערך בריאות עופות, רופא ראשי בפועל, שו"ט
פרופ' דני אלעד	החטיבה לבקטריולוגיה, מכון וטרינרי
ד"ר יוני יינון	יחידה וטרינרית, שירות המזון הארצי, משרד הבריאות
גב' דנה שך	מיקרוביולוגיה-טכנולוגיה של מזון, שירות המזון הארצי
ד"ר ורד אגמון	מנהלת (לשעבר) מעבדות מרכזיות משרד הבריאות
ד"ר ישראל יוסלביץ	מרכז מקצועי בכיר (מטילות), יח' עופות, שה"מ
ד"ר אורית שמואלי	נציגת המדען הראשי

חברי הוועדה המקצועית:

פרופ' שלמה סלע (סלדינגר)*, ד"ר יוליה קרופיצקי	מינהל המחקר החקלאי, וולקני
ד"ר אבישי לובלין, ד"ר שרה מכאני, ד"ר יגאל פרנושי, ד"ר אילנה מלר, ד"ר אינה ליסיאנסקי, ד"ר מיכל פרי-מרקוביץ, ד"ר עשאל רוט	מכון ווטרינרי, משרד החקלאות
ד"ר סינתיה סטוצאנה, ד"ר שחר יאיר	המעבדה לבריאות העוף, מועצת הלול
ד"ר לאה ולינסקי, ד"ר אסף רוקני, ד"ר מאיה דיוידוביץ-כהן, ד"ר ענבל מרמשטיין	
ד"ר יעל לאור	מינהל המחקר החקלאי, וולקני
פרופ' אוהד גל-מור	מרכז רפואי שיבא ואוניברסיטת ת"א
* יו"ר הוועדה. ראשי קבוצות המחקר מודגשים בקו תחתון	

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. פרופ' דניאל אלעד, מכון ווטרינרי
2. ד"ר סרחיו דולב, השירותים הווטרינריים
3. ד"ר שלמה בלום, מכון הווטרינרי
4. ד"ר משה שמש, מכון וולקני
5. ד"ר ריבה בן עזרא השירותים הווטרינריים

תוכן עניינים

עמוד

השותפים במיזם 2

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי 3

תקציר מנהלים 5

רקע כללי 8

מטרות המחקר 8

פרק 1. מיפוי מקורות ודרכי הזיהום בסלמונלה ובקמפילובקטר בשלוחת הפטם ובמטילות וזיהוי השלבים הקריטיים בשרשרת הייצור במשחטה 9

פרק 2. השוואה גנטית בין תבדידי קמפילבוקטר משלבים שונים של שרשרת הייצור של העופות וכן ממקורות הומניים ע"י שימוש בריצוף גנומי לזיהוי מקור ההדבקה באדם. 22

פרק 3. פיתוח אמצעי הדברה ביולוגית 30

פרק 4. הערכת התרומה של פרש לולים לזיהום הסביבה החקלאית 38

פרק 5. הבנת התפתחות מנגנוני עמידות לאנטיביוטיקה בסלמונלה, התפשטותם בקרב שלוחות ענף הלול בישראל ומציאת דרכים למניעתם 45

דיון מסכם 51

ביבליוגרפיה 54

רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים 55

הפצת הידע בכנסים 55

נספח 57

תקציר מנהלים

תחלואה שמקורה במזון מהווה בעיה בריאותית משמעותית בארץ ובעולם וגורמת נטל כלכלי כבד. סלמונלה וקמפילובקטר הם שני הפתוגנים החיידקיים המובילים הגורמים לזיהומים המועברים במזון ובכך מהווים איום לבטיחות המזון ולבריאות הציבור. סלמונלה וקמפילובקטר הם פתוגנים זואונוטיים, המועברים לבני אדם מבעלי חיים שונים, כאשר העוף נחשב למאגר מרכזי שלהם. למין סלמונלה אנטריקה (*Salmonella enterica*) למעלה מ-2600 זנים (סרוברים), מהם רבים מוכרים כמחוללי מחלה באדם, אולם רובם אינם גורמים למחלה בעוף, אלא רק נישאים במערכת העיכול שלו. בשנים האחרונות, התרחשה הגחה של קלון (טיפוס) חדש, השייך לסרובר אינפנטיס שהתפשט מאוד בישראל, אשר מאופיין בטווח עמידויות רחב לאנטיביוטיקה. לאחרונה אנו עדים להתפרצויות של זנים עמידים גם מסרוברים נוספים. חיידק הקמפילובקטר (*Campylobacter*) הינו הפתוגן הנפוץ ביותר, מבין החיידקים הגורמים לתחלואה ממזון, במדינות מפותחות וגם בישראל. המינים הנפוצים ביותר הינם *C. jejuni.* (75-80%) ו- *C. coli* (20-25%) המהווים ביחד כ99% מכלל התבדידים מבני אדם. שיעורי התחלואה בעולם וגם בישראל ממשיכים לעלות למרות ניסיונות התערבות ברמה הלאומית.

מניעת זיהומים במזון הינה מטלה מאתגרת במיוחד, שכן שרשרת ייצור המזון הינה ארוכה ומורכבת והמזון עלול להזדהם בכל שלב בשרשרת המזון, מהמשק החקלאי ועד לצלחת. האחריות והטיפול במניעת זיהומי מזון בישראל נחלקת בין משרד החקלאות, האחראי לשלבי גידול העוף והעיבוד במשחטה, משרד הבריאות האחראי על בטיחות מוצרי העוף לאחר השחיטה וכמובן, בעלי הלולים, המגדלים, המובילים, המשחטות, מפעלי המזון והקמעונאים. מאחר שהאחריות על בטיחות המזון מוטלת על מספר רב של גורמים, הנחת יסוד העומדת בבסיסו של מיזם זה היא כי מורכבות שרשרת הייצור של העוף ומוצריו דורשת גישה הוליסטית רב מערכתית לצורך הבנת מקורות הזיהום והתמודדות עם בעיית הסלמונלה והקמפילובקטר בשלבים קריטיים של שרשרת הייצור. הנחת יסוד נוספת של מיזם זה היא כי אפילו הקטנה חלקית של זיהומים במשק העופות תתרום לשיפור בטיחות המזון לאדם ותוביל להקטנה משמעותית בתחלואה באדם. בהתאם לכך, הוקם מיזם סל"ק (סילוק **סל**מונלה/**ק**מפילובקטר) שמטרתו היא הפחתת הזיהומים בסלמונלה ובקמפילובקטר שמקורם בענף הלול. במיזם זה חברו חוקרים מהאקדמיה, משרד הבריאות ומשרד החקלאות, יחד עם בעלי תפקיד בתחום הרגולציה והדרכת המקצוע, במטרה להתמודד עם נושא מורכב זה באופן מערכתי ורב-תחומי. מטרות המחקר היו: א. למפות את מקורות ודרכי הזיהום בסלמונלה ובקמפילובקטר בשלוחת הפטם, הודים ובמטילות; ב. לבחון ולהשתמש בריצוף גנומי להבנת מקור ההדבקה של קמפילובקטר באדם ודרך התפשטותו בלול; ג. לפתח הדברה ביולוגית ע"י חיידקים אנטגוניסטים; ד. לבחון את מידת ההישרדות של סלמונלה בפרש עופות מיוצב בערימה או מטופל בתהליך קומפוסטציה ושרידותו בקרקע לאחר יישום הפרש; ה. למפות ולאפיין את נוכחותם ותפוצתם של חיידקי סלמונלה וקמפילובקטר עמידים לאנטיביוטיקה ולזהות את הימצאותם של אלמנטים גנטיים כדי לפתח אמצעי ניטור והתמודדות יעילים.

במהלך המחקר, בוצעו סדרות דיגום ב-5 לולי פטם (פעמיים, בשתי עונות שונות), 5 לולי מטילות ו-2 לולי הודים. נמצאו מקורות סביבתיים לזיהום סלמונלה בכל לולי הפטם וההודים ובמרבית לולי המטילות. מקורות אלה כללו בוץ, סוליות נעליים של עובדים, צמיגי משאיות תערובת וכן מכרסמים. לא נמצאו מקורות חיוביים לקמפילובקטר לפני אכלוס בלולי הפטם. מעקב אחר דינמיקת ההתפשטות של קמפילובקטר בלולי פטם והודים לבשר הראה כי האפרוחים מגיעים ללא החיידק ובמהלך הגידול מופיע החיידק, בחלק מהלולים, ומגיע לרמת נשאות של 90% ויותר. פטמים שהגיעו למשחטה נקיים מהפתוגן, היו מזוהמים בסיום התהליך מה שיכול להעיד על זיהום צולב במשחטה. מעקב אחר כמות חיידקי הקמפילובקטר, בשלבים שונים לאורך שרשרת העיבוד במשחטה, הראה ירידה משמעותית במספר החיידקים בתהליך ההמלחה (הכשרה) ולכן מחזק את התרומה של ההמלחה להקטנת זיהומי הפטם בקמפילובקטר. יחד עם זאת, במרבית הבדיקות, טבחות העוף עדיין היו מזוהמות בפתוגן גם בסיום תהליך העיבוד.

לצורך הבנת מקור ההדבקה וההתפשטות של קמפילובקטר בלול ובחינת מעבר אפשרי לאדם, בוצע ריצוף גנומי של תבדידי *C. jejuni* מסקר לולים קודם שנערך ע"י מועצת הלול וכן מתבדידים שבודדו במחקר הנוכחי. סה"כ נערכה אנליזה ביואינפורמטית על רצפי גנום של 125 תבדידים שונים מלולים שונים, לפני ואחרי שחיטה וכן מתבדידים שבודדו לאורך מחזורי הגידול בלול. אנליזה של whole-genome MLST הראתה שקיים מיגוון רחב של גנוטיפים, כאשר בכל לול נמצא גנוטיפ מסוים. רצפי הגנום אפשרו לזהות גנים לאלימות במרבית התבדידים. בניגוד לממצאים, שתוארו לעיל לגבי הסוג (genus) קמפילובקטר, סיווג הזנים שבודדו, לפני ואחרי שחיטה, לא הצביע על אפשרות של זיהום צולב במהלך השחיטה. ייתכן שהסיבה לכך היא כי המין *C. jejuni* רגיש יותר ממינים אחרים של קמפילובקטר לטיפול במלח, נושא אשר יהיה צורך לבררו במחקר המשך. השוואה בין זני ה-*C. jejuni* מהעוף לזנים שבודדו מחולים בשנים קודמות, הראתה דימיון אך לא זהות ולכן לא ניתן היה לקבוע אלו גנוטיפים של *C. jejuni* עברו מהעוף לאדם ומה מקור ההדבקה המדויק (מאיזה לול). כדי לאמוד את מידת התרומה של ענף הלול לתחלואה באדם, יהיה צורך להרחיב את המחקר ולערוך סיווג בשיטת wgMLST גם לתבדידים מחולים בישראל שבודדו בתקופה מקבילה.

בניסיון למצוא טיפול להקטנת הנשאות בסלמונלה במהלך גידול העוף, בוצעה סריקה רחבה של תבדידים מפרש של עופות לא נגועים בסלמונלה ונמצאו מספר תבדידים בעלי פעילות אנטגוניסטית לסרוברים שונים של סלמונלה. לתבדידים אלה, יש פוטנציאל לשמש כתכשיר לבקרה ביולוגית של סלמונלה בלול. בחינת פעילות החיידקים האנטגוניסטים נבדקה על נשאות של אפרוחים בסלמונלה אינפנטיס, הסרובר הנפוץ ביותר, כיום, בעופות ואחד מהסרוברים הנפוץ בחולים בארץ. נמצא כי הטיפול הביולוגי הקטין את הנשאות של סלמונלה אינפנטיס בשני סדרי גודל. קידום השימוש בטיפול ביולוגי ידרוש בחינת הפעילות במודל אפרוחים גם כנגד סרוברים נוספים של סלמונלה וכן בחינת היישום בלולים. טיפול בחיידקים אנטגוניסטים בוצע גם לבחינה של הקטנת נשאות של סלמונלה בחלקי עוף וביצים, אולם השפעת הטיפולים שנבדקו על מספרי החיידקים הייתה מועטה.

מאחר שפרש לולים נגועים בסלמונלה משמש במקרים רבים למטרות דישון חקלאי, תיתכן חדירה של סלמונלה לשרשרת המזון על ידי מעבר של הפתוגן מהקרקע לצמח, כפי שתועד בספרות. כדי לבדוק את חיוניות חיידקי הסלמונלה בסביבה החקלאית, מחוץ לעוף, נערכה בדיקה של הישרדות של סלמונלה אינפנטיס בתנאי סביבה שונים במודל מעבדתי של זבל שאולח בפתוגן. כמו כן, נערך מיפוי בזמן ובמרחב של תנאי מפתח להישרדות הפתוגן בערימת פרש/קומפוסט, בכדי לחזות את משך ההישרדות הצפוי בפרקטיקה קיימת (ערימה) או חלופית (שרוול קומפוסטציה). הטמפרטורה נמצאה כגורם קטילה ראשי, אך גם הבדלים ב- pH ובתכולת המים יכולים להאריך את הזמן הדרוש לקטילה של הפתוגן. כאשר הקטילה היא תרמית (50-60°C), לא נצפה גידול מחדש באף אחד מהתנאים שנבחנו. בטמפרטורות נמוכות יותר, גידול מחדש של סלמונלה לאחר יבוש והרטבה, מעלה את החשש ממקרים של ערימות זבל יבשות יחסית, בהם לא התקבלו 'טמפרטורות קטילה' (מעל 45°C) והורטבו לאחר מכן באירוע גשם. כאשר מיושם לקרקע זבל (טרי\מיוצב) מאולח, יש חשש לשרידות הפתוגן לתקופה העולה על שלושה חודשים. מוצע להתחשב בממצאים אלה, כאשר מנסחים חסמים אגרוטכניים בהקשר ליישום זבל מיוצב חלקית. בנספח המצורף לדוח זה, מובאות המלצות למקבלי ההחלטות לגבי אופן הטיפול בפרש לולים המיועד ליישום כדשן בשדה.

בנוסף לזיהומי מזון העלולים לגרום לתחלואה, חיידקי סלמונלה עלולים לשאת גנים לעמידות לאנטיביוטיקה. עמידות לאנטיביוטיקה היא בעיה בריאותית גלובלית וחיידקי סלמונלה עמידים, הוכרזו על ידי ארגון הבריאות העולמי לאחרונה כאחת מקבוצות הסיכון המשמעותיות הדורשות טיפול דחוף ברמה העולמית. ידוע כיום כי גנים לעמידות לאנטיביוטיקה יכולים לעבור אופקית, בתוך המאכסן או בסביבה, בין חיידקים שונים ולכן חשוב לאסוף מידע על עמידות לאנטיביוטיקה גם בחיידקי סלמונלה. סקר עמידות ל-13 אנטיביוטיקות בעלות רלוונטיות קלינית, שנערך בקרב 188 בידודי סלמונלה מענף הלול מ-11 סרוברים שונים, העלה כי כ- 60% מבידודי הסלמונלה בענף הלול הינם בעלי עמידות רחבת טווח, כלומר עמידים לשלוש אנטיביוטיקות או יותר. הגנים המקודדים לעמידות זוהו ע"י ריצוף גנומי של 19 תבדידים. נמצאו ואופיינו שני איים גנומים חדשים וניידים המקנים לחיידק עמידות רחבת טווח. מספר סרוברים, כמו אינפנטיס וקנטאקי, מאופיינים בתדירות גבוהה במיוחד של תבדידים בעלי טווח עמידות רחב. ניסויי טרנספורמציה הדגימו העברה של עמידויות בין סרוברים שונים של סלמונלה ובין סלמונלה לא. קולי.

לסיכום, מיזם זה לראשונה בישראל איגד חוקרים מתחומי ידע ומחקר שונים, יחד עם אנשי מקצוע ממועצת הלול, משרד החקלאות ומשרד הבריאות בניסיון לרכז מאמצים, בגישה הוליסטית של one-health לצורך הבנה ושיפור ההתמודדות עם סלמונלה וקמפילובקטר בענף הלול. היבטים מסוימים לא נחקרו בעבודה זו, בשל מגבלה תקציבית ויש להם מקום במחקרי המשך, יחד עם השאלות שעלו במהלך המחקר. אנו מאמינים כי יישום והתייחסות רב-מערכתית לממצאי המיזם יגבירו את הבנתנו לגבי השפעת הזיהומים בענף הלול על בריאות האדם ויובילו להפחתת נגיעות העופות בסלמונלה ובקמפילובקטר ובכך יתרמו לשיפור בטיחות המזון בישראל.

רקע כללי

סלמונלה וקמפילובקטר הם פתוגנים זואונטים נישאי מזון המהווים איום גלובלי לבטיחות המזון ובריאות הציבור (1-8). בישראל, פתוגנים אלה אחראיים למעלה מ-90% מהתחלואה האנטרית מחיידקים שמקורם במזון. רוב ההדבקות בבני אדם בעולם מקורם בזיהום המגיע מעופות. תכניות התערבות בענף הלול בישראל, שכללו חיסונים, הצליחו לגרום לירידה בשיעור התחלואה בסלמונלה אך שיעור התחלואה עדיין גבוה עד פי 4 מהשיעור המדווח בארה"ב (8-11). במקביל, תועדו זני סלמונלה, שמקורם בענף הלול, בעלת עמידות רחבת טווח לאנטיביוטיקה (12,13) אשר גרמו לתחלואה. כיום, נערכים השו"ט לתוכנית ניטור ארצית לסלמונלה בכל הלולים.

שיעורי התחלואה בקמפילובקטר ממשיכים לעלות בעולם למרות ניסיונות התערבות ברמה הלאומית (5,14). שיעורי התחלואה בישראל עלו דרמטית בין השנים 1999-2010 (15), כאשר חלק גדול של התחלואה הוא בתינוקות, בשנתיים הראשונות לחייהם (16). ממחקרים שנעשו בארצות אחרות עולה כי המקור האחראי לחלק הארי של התחלואה בקמפילובקטר הוא זיהום שמקורו במוצרי עוף. בארץ נערכו מעט מאוד מחקרים על מקורות המזון האחראיים לתחלואה בקמפילובקטר. ב-2015 נעשה סקר קמפילובקטר ע"י מעבדות מועצת הלול (17), בו נמצא כי 91% מלולי הפטם נגועים בקמפילובקטר. בשנה האחרונה החל השו"ט לבצע תוכנית ניטור קבועה במשחטות לסלמונלה וקמפילובקטר. בסוף שנת 2017 החלו גם השו"ט ומועצת הלול לבצע תוכנית ניטור סלמונלה בשלוחת המטילות בדומה לתוכנית הניטור האירופאית. עפ"י תוצאות תוכנית הניטור בשנת 2018 אחוז לולי המטילות החיוביים לסלמונלה עומד על 17.9%.

לצורך הפעלת תכנית מיגור לאומית של סלמונלה וקמפילובקטר בענף הלול קיים צורך להבין את מקורות הזיהום בלול ואת דרכי העברה של שני הפתוגנים בתוך הלול וכן לפתח גישות יעילות להקטנת נשאות העוף ולטיפול בפתוגנים בפרש עופות המיועד לדישון חקלאי. הקטנת הנגיעות של ענף הלול בפתוגנים אלה תתרום להורדת התחלואה באדם בסלמונלה ובקמפילובקטר, בישראל.

מטרות המחקר (כפי שהופיעו בהצעת המחקר המקורית ללא שינויים)

א. למפות את מקורות ודרכי הזיהום בסלמונלה ובקמפילובקטר בשלוחת הפטם, הודים ובמטילות.

ב. לבחון ולהשתמש בריצוף גנומי להבנת מקור ההדבקה של קמפילבוקטר באדם ודרך התפשטותו בלול.

ג. לפתח הדברה ביולוגית לסלמונלה ע"י חיידקים אנטגוניסטים.

ד. להעריך את התרומה של פרש לולים לזיהום הסביבה החקלאית.

ה. למפות ולאפיין את נוכחותם ותפוצתם של חיידקי סלמונלה וקמפילובקטר עמידים לאנטיביוטיקה ולזהות את הימצאותם של אלמנטים גנטיים כדי לפתח אמצעי ניטור והתמודדות יעילים.

פרק 1. מיפוי מקורות ודרכי הזיהום בסלמונלה ובקמפילובקטר בשלוחת הפטם ובמטילות וזיהוי השלבים הקריטיים בשרשרת הייצור במשחטה

חוקר ראשי : אבישי לובלין (מכון ווטרינרי קמרון)
מרכזת המחקר: רותם אמיתי טאוב
חוקרים שותפים: אסף ברקוביץ', יגאל פרנושי, שרה מכאני (פרשה לגמלאות), ישראל ריבשטיין, אינה ליסנינסקי, אירנה גרשמן, עדי בכר, עשהאל רוט (מכון ווטרינרי קמרון, בית דגן).
רוני קינג (רשות הטבע והגנים, ירושלים).
מיכל פרי מרקוביץ (מערך בריאות העוף בשו"ט, בית דגן).
רופאים של אינטגרציות שסייעו בבצוע המחקר בלולים : דודי ריש, יעד דהן, זהר גבע.
רופאי משחטות שסייעו בבצוע המחקר במשחטות : מיכאל כץ, רמי ציבן, יעקב גנדלר, דיאב פאהום, אירנה רדניצקי (מהנדסת אבטחת איכות משחטת הוד חפר).

1. תקציר

מיפוי מקורות ודרכי הזיהום בסלמונלה וקמפילובקטר בלולי פיטום, הודים לבשר ומטילות, הכרת גרף התפשטות קמפילובקטר בלהקה וזיהוי השלבים הקריטיים בשרשרת הייצור במשחטה יאפשרו מציאת דרכים יעילות להפחתת הנגיעות בעופות ובכך להורדת התחלואה הנגרמת מהפתוגנים בבני האדם.
במהלך המחקר, נדגמו ב-5 לולי פטם,
2 לולי הודים לבשר ו-5 לולי מטילות מקורות סביבתיים אביוטיים וביוטיים להעברת הפתוגנים ב-2 נקודות זמן בפטמים (לפני אכלוס הלול, לפני שיווק הלהקה), ובשתי העונות, הקרה והחמה, וב-3 נקודות זמן בהודים (לפני אכלוס בית האימון, לפני אכלוס הסככות ולפני שיווק הלהקה), וגרף התפשטות קמפילובקטר עם גיל הלהקה (פטמים הודו והודים בלבד). בכל הלולים נמצא מקור זיהום יציב לסלמונלה ולמעשה בכולם נמצאה סלמונלה כבר לפני האכלוס. ברוב הלולים נמצאו דגימות חיוביות לשני הפתוגנים לקראת השיווק, כאשר סך כל הדגימות החיוביות לכל אחד מהפתוגנים היה גבוה במידה משמעותית בסוף חיי הלהקה בהשוואה להתחלה. בהשוואת הסרוואריים של סלמונלה נמצאו שינויים בחלוקת הסרוואריים בין מועדי הדיגום, ובפטמים נראתה השתלטות של סרוואר וירג'יניה במקום אינפנטיס הנפוץ בשנים האחרונות. ב-2 לולי פטם מ-5 הנבדקים בהם הלהקה הגיעה למשחטה נקיה או כמעט נקיה מקמפילובקטר נערכו גם דיגום במשחטה ובהם נמצאו כל העופות חיוביים לקמפילובקטר לקראת סיום תהליך הייצור (זיהום צולב במשחטה). בנוסף נקבעה עקומת הריבוי של קמפילובקטר בלולי פטם והודים. ב-4 מ-5 לולי הפטם החל שיעור קמפילובקטר שהעופות מפרישים דרך הביב לעלות החל מהשבוע השני לפחות. בלולי ההודים נמצאו 2 הפתוגנים גם לפני האכלוס. שיעור הקמפילוקבטר המופרש בהודים עלה כבר משבוע 2 לרמה משמעותית של מעל 90% שנשארה יציבה עד סוף הגידול. בסקר ב-5 משחטות יצוא לזיהוי השלבים הקריטיים (7 להקות פטמים, 4 להקות הודים ולהקת רביה כבדה אחת), באמצעות ספירת חיידקי קמפילובקטר במי שטיפה (תרנגולות) או ספוגיות (הודים) ב-6 נקודות לאורך קו השחיטה, נמצאה ספירה גבוהה בתחילת קו השחיטה וספירות נמוכות מאוד לקראת סוף הקו לאחר פעולות המלחה וצינון הטבחות. ירידה משמעותית בספירות נראתה לאחר שלב ההמלחה, כאשר צינון העופות לא הביא לירידה נוספת. הספירות בהודים היו

נמוכות יותר מאשר בפטמים בגלל שיטת הדיגום השונה בה בהודים נדגם שטח עור מוגבל לעומת פטמים בהם כל פני שטח העור נשטפים.

2. מבוא

חיידקי סלמונלה וקמפילובקטר הם שני הפתוגנים המובילים מבחינת זיהומי מזון, מעל 90% מהרעלות מזון ממקור בקטריאלי נגרמות על ידם. מבין שניהם קמפילובקטר הנו משמעותי יותר, שיעור התחלואה מהחיידק בישראל הוא מהמובילים בארצות המתועשות (1). החיידק גורם לשלשולים ובאחוז קטן (0.1%) מן החולים יתפתחו בהמשך סיבוכים, כולל: תסמונת המעי הרגיז, תסמונת Guillain-Barré, תסמונת hemolytic uremic ו- reactive arthritis (2). בישראל יש עלייה בנגיעות קמפילובקטר בשנים האחרונות בעיקר בילדים (3), מאידך קיימת גם תחלואה גבוהה בסלמונלוזיס ו- 20-25 מקרי מוות בשנה (4, 5). תחלואה בסלמונלוזיס בישראל מאופיינת בהתפרצויות ובהגחה של זנים חדשים מעת לעת כגון הגחה של זן חדש אנדמי לישראל לפני כעשור שנים, סלמונלה אינפנטיס (*S*. Infantis) (6).

אחד ההבדלים המשמעותיים בין שני הפתוגנים הנו דרכי ההעברה. סלמונלה מועבר ועלול להדביק אפרוחים בדרך האנכית במעבר טרנס-אווריאני שמזהם ביצי רביה, או זיהום ביצי מאכל בעיקר על ידי ס. אנטריטידיס , שהופך אותן למקור זיהום משמעותי לבני אדם (7, 8), וגם בדרך האופקית (9). סלמונלה נפוצה מאוד בבעלי חיים מבויתים כמו עופות משק, בקר ואחרים, חיות בית שמסתובבות גם בלולים כמו חתולים וכלבים, ציפורי בר וזוחלים, וכן חיות בר אחרות (10) וחרקים (11). כמו-כן סלמונלה עשוי לעבור דרך כל שרשרת המזון ממזון העופות, דרך גורמים בלול כמו ציוד, כלי מים ואוכל, אבק (10), להגיע גם לעופות במשחטה ולזהם מוצרי בשר עוף (12). בהשוואה לסלמונלה, מרבית המחקרים שוללים מעבר אנכי של קמפילובקטר לאפרוח או שהוא גורם מינורי בלבד בהעברתו בעופות (13), אם-כי יש גם דעות הפוכות לפיהן יש משמעות להעברה אנכית של החיידק (13). השאלה כיצד הוא מופיע כמעט בכל להקות הפיטום בגיל 3-2 שבועות ומעלה ומגיע לשיעור מעל 90% בלהקות לקראת שיווקן נשארה פתוחה עד היום. במחקרים אפידמיולוגיים של הדבקות ספוראדיות בקמפילובקטר בבני אדם, מרבית המקרים נשארו לא מוסברים (15, 16) , אם-כי זבובים למשל נחשדו כמקור הדבקה אפשרי (17).

שאלה נוספת שמתבקשת היא גורל קמפילובקטר שמגיע מהלול למשחטה והזיהום של מוצרי עופות שמגיעים לרשתות השיווק. בסקר בישראל בשנים 2015-16 בו נדגמו עופות שהגיעו לשחיטה נמצא שיעור של 89% חיוביים במערכת העיכול ו-64% חיוביים על פני העור (18). בסקר מאוחר יותר של המועצה לענף הלול דווח על מעל 93% מעופות פיטום נגועים בקמפילובקטר (19).

3. מטרות המחקר

1. למפות את מקורות דרכי הזיהום בסלמונלה ובקמפילובקטר בלולים.
2. לעקוב אחר דינמיקת ההתפשטות של קמפילובקטר בלולי פיטום והודים לבשר.
3. לבחון מהי רמת הזיהום בקמפילובקטר בנקודות מרכזיות לאורך קו השחיטה.

4.0 פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

4.1 מיפוי מקורות ודרכי הזיהום בסלמונלה וקמפילובקטר בשלוחת פטם, הודו ומטילות

במסגרת המחקר נבדקו מקורות העברה לקמפילובקטר וסלמונלה ב- 5 לולי פטם ו-2 לולי הודו לבשר. כל להקה נבדקה בשני מועדים: בין הלהקות ולקראת שיווק. כל לול פטם נבדק בעונה החמה והקרה. לולי הודים נבדקו לפני אכלוס בית האימון, לפני ההעברה לסככות ולפני השיווק, בנוסף נבדקו מקורות העברה לסלמונלה ב-5 לולי מטילות בתחילת הטלה ובהמשך חיי הלהקה בעונה ההפוכה. בכל דיגום נדגמו גורמים ביוטיים (חרקים, מכרסמים ויונים, בהתאם ללכידה) ואביוטיים (דגימות סביבתיות בלול ומחוץ ללול, נייחות ונידות, כולל דגימות לבוש ונעליים של עובדי הלול). הבדיקות נערכו בשיטת מיקרוביולוגיה קלאסית לסלמונלה ולקמפילובקטר ו-RT-PCR לקמפילובקטר מנוזל העשרה.

בוצעו 2 סדרות (4 אירועי דיגום) של דיגומים ב-5 לולי פטם בעונות הפוכות. בוצעו 3 אירועי דיגום ב-2 לולי הודים (2 אתרים לכל להקה, בית-אימון וסככות). בוצעה סדרת דיגום ב-5 לולי מטילות. הלולים פרוסים במקומות שונים בארץ. כל לולי הפטם היו לולים תעשייתיים גדולים השייכים לשתי אינטגרציות עופות גדולות עם תהליכי עבודה ברורים ומסודרים. לול הודים אחד היה שייך לאינטגרציה והשני למגדלים פרטיים. לולי המטילות הם ברובם לולים משפחתיים קטנים. ממצאי לולי הפטם מוצגים באיור 1, ממצאי לולי ההודים באיור 2, ולולי המטילות באיור 3, כל התרשימים מוצגים בהמשך. בכל 12 הלולים נמצאו מקורות זיהום חיידק הסלמונלה שנמצא גם אחרי חיטוי הלול ובעת הכנתו ללהקה חדשה. מבין הגורמים האביוטיים והביוטיים שנבדקו לפני אכלוס בלולי הפטם והודו לבשר שנבדקו, דגימת הבוץ הייתה חיובית לסלמונלה במספר הפעמים הרב ביותר (90% ו-100% בהתאמה). דגימת הבוץ נלקחה ממרבצי בוץ שנמצאו בקרבה למבנה הלול בתוך החווה. מקורו לעיתים בשפך של הנוזלים לאחר ניקוי מהלול ולעיתים ממקור נזילה של אמצעי הקירור במבנה. ברחבי הלול נמצאו גורמים אביוטיים נוספים חיוביים וכן מספר גורמים ביוטיים חיוביים כמו צואת כלבים וצואת סוסים. לקראת שיווק נמצאו יותר דגימות סלמונלה חיוביות. בסיווג תבדידי הסלמונלה (בוצע במעבדת משרד הבריאות) נמצא תמיד יותר מסרוואר אחד של סלמונלה (טבלה מס' 1). במקרים רבים סרוואר מסוים שנמצא לפני האכלוס נמצא גם אחרי האכלוס. בלולי המטילות נמצא שיעור סלמונלה נמוך יחסית. בכל 3 השלוחות שנבדקו נמצאו שינויים בהתפלגות הסרווארים בין המועד לפני אכלוס לבין המועד לפני שיווק, ושינויים גם בין העונה הקרה לעונה החמה. בפטמים חלוקת הסרווארים העיקריים די דומה כאשר אין הפרדה לעונות, אולם עם ההפרדה נראה ממצא בולט של עלייה משמעותית בסרוואר וירג'יניה בלולי פיטום וירידה בסרוואר אינפנטיס (הממצא מוכר גם מניתוחי סרווארים של אנשים בישראל בשנתיים האחרונות), כפי שמתואר בטבלה מס' 2. בהודים תמונת הסרווארים שונה ומופיעים סרווארים שלא נראו בפטמים כמו orion ו-hadar. גם במטילות מופיעים סרווארים שלא נראו בשלוחות האחרות כולל enteritidis המשמעותי אם-כי שני הסרווארים השולטים במטילות (ohio, kentucky) קיימים גם באחרים.

בכל הבדיקות לפני האכלוס בלולי הפטם לא בודד קמפילובקטר. במהלך שנת המחקר השלישית בדקנו את הדגימות גם בתרבית קלאסית וגם בהרצת DNA ב-RT-PCR שהופק ישירות מנוזל ההעשרה

מתוך מטרה להעלות את רגישות הבדיקה. סה"כ היו 757 דגימות שנבדקו בשתי השיטות בשני הניסויים (בוצעו מעל 3200 בדיקות קמפילובקטר בשני הניסויים במהלך המיזם). טבלה מס' 3 מציגה את ההשוואה בין שתי שיטות הבדיקה. ב-86% מהבדיקות נמצאה התאמה אם-כי RT-PCR זיהה 90 בדיקות (25% מהבדיקות החיוביות) שתרבית לא זיהתה, ערך גבוה למדי, שבגללו עברנו לשימוש ב-RT-PCR. בידוד זיהה 15 בדיקות (5% מהבדיקות החיוביות) ש-RT-PCR לא זיהה.

טבלה 1: שבעה הסרוואראים השולטים של סלמונלה בשלוחות ובאתרים השונים (% מסה"כ).

להקה	פטמים לול לא מאוכלס	פטמים לול לפני שיווק	הודים לול לא מאוכלס (בית אימון)	הודים לול לא מאוכלס (סככות)	מטילות דיגום ראשון	מטילות דיגום שני
סרוואר שכיחות %	Virginia 34.2%	Virginia 34.8%	Orion 42.9%	Hadar 57.1%	Ohio 53.3%	Kentucky 50.0%
	Muenchen 21.1%	Infantis 18.5%	Kentucky 35.7%	Bredeney 7.1%	Kedougou 13.3%	Kedougou 25.0%
	Infantis 18.4%	Muenchen 16.3%	Infantis 7.1%	Kentucky 7.1%	Corvallis 6.7%	Mbandaka 12.5%
	Java 7.9%	Montevideo 8.7%	Java 7.1%	Orion 7.1%	Enteritidis 6.7%	Ohio 12.5%
	Montevideo 5.3%	Java 7.6%	Newport *7.1%*	Infantis 7.1%	Altona 6.7%	
	Edinburg 5.3%	Kentucky 3.3%		Newport 7.1%	Tennessee 6.7%	
	Ohio Kedougou 2.6%	Rough:r:1,5 3.3%		Indikan 7.1%	Manhattan 6.7%	

טבלה 2: שינוי היחסים בין סלמונלה אינפנטיס וסלמונלה וירג'יניה בלהקות פיטום שנצפו במחקר.

לול	מס' תבדידים בעונה הראשונה		מס' תבדידים בעונה השניה*	
	סלמונלה אינפנטיס	סלמונלה וירג'יניה	סלמונלה אינפנטיס	סלמונלה וירג'יניה
1	11	0	0	21
2	3	4	0	2
3	0	0	0	0
4	0	0	0	7
5	5	1	0	5
סה"כ	**19**	**5**	**0**	**35**

* בד"כ כשנה לאחר העונה הראשונה.

טבלה 3: ההתאמה בין בדיקות קמפילובקטר בשיטות בידוד חיידק ו-RT-PCR מהעשרה.

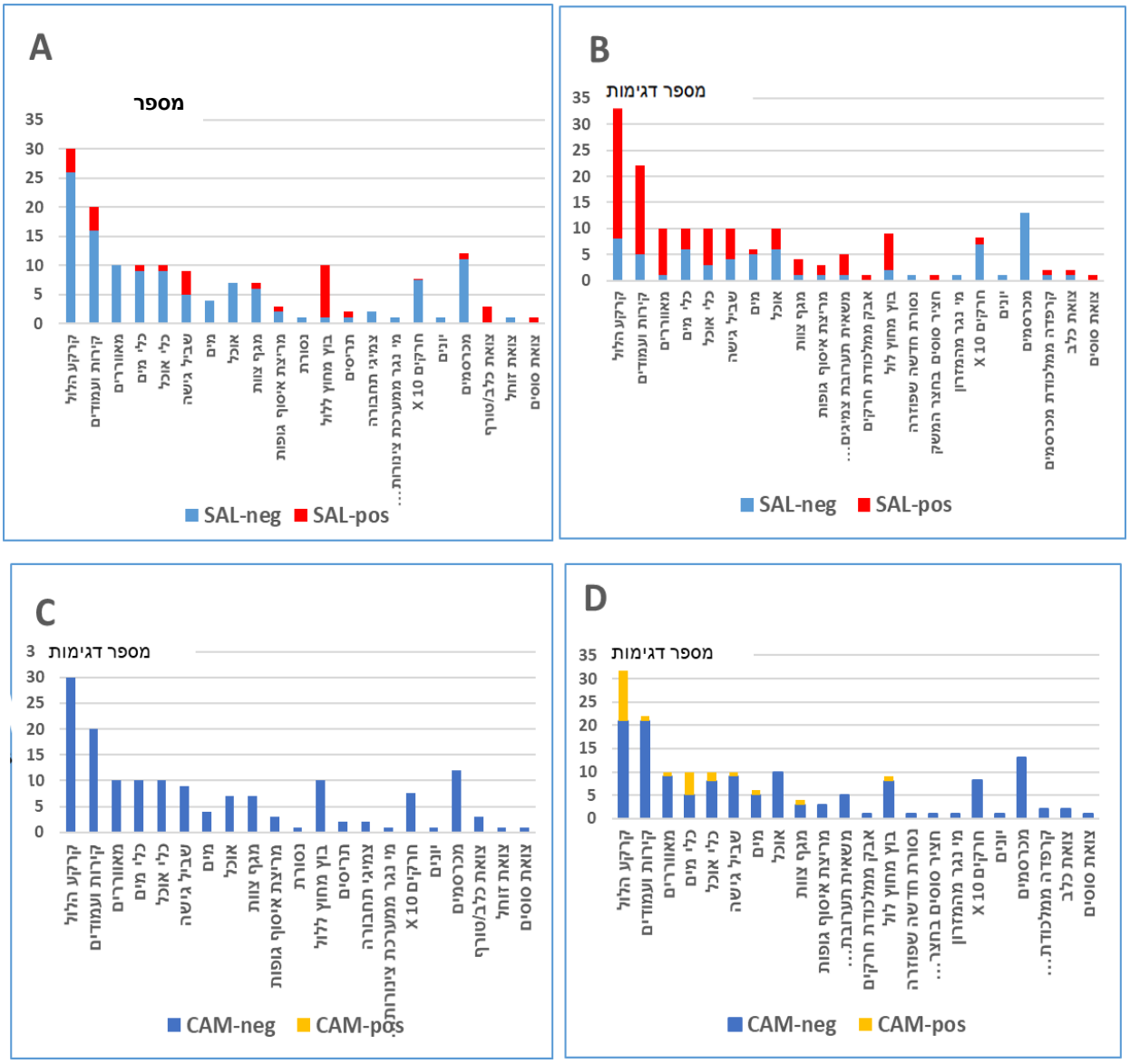
		בידוד חיידק מתרבית		
		+	-	סה"כ
RT-PCR מהעשרה	+	271	90	361
	-	15	381	396
	סה"כ	286	471	757

ב-7/10 מסדרות הדיגום בלולי הפטם נמצא קמפילובקטר בלול בבדיקה לקראת שיווק. בלולי ההודו לבשר נמצאו בדיקות קמפילובקטר חיוביות ב-3 מתוך 4 האתרים לפני האכלוס (גם בתי אימון וגם סככות). מספר הבדיקות החיוביות לקמפילובקטר שנמצאו לקראת שיווק היתה גבוהה מאוד. במפתיע, רוב תבדידי הקמפילובקטר שבודדו בלולי הפטם וההודו לבשר היו קמפילובקטר קולי (כאשר ידוע שרוב התבדידים מבני אדם הנם ג'ג'וני). מאידך, בתבדידי המשחטות נמצא שיעור גבוה של קמפילובקטר ג'ג'וני.

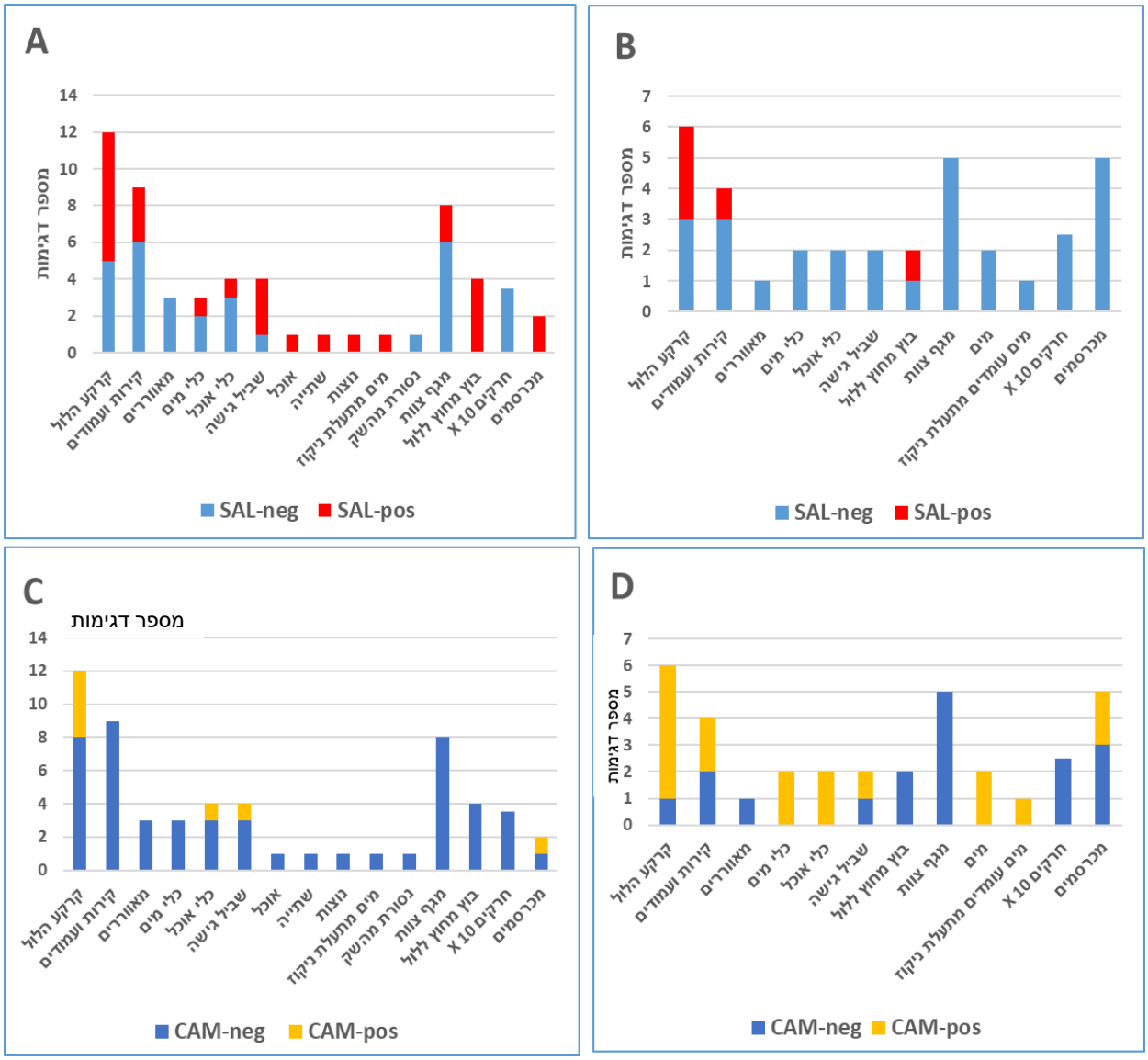
4.1.2 דינמיקת ההתפשטות של קמפילובקטר בלולי פיטום והודים לבשר

המעקב כלל דיגום שבועי של מטושי ביב מ-75 עופות מאכלוס ועד שיווק (סה"כ 5 דיגומים ללהקה) בפטם ודיגום שבועי בתדירות יורדת לאור התוצאות בלולי הודו לבשר (2 להקות הודו).

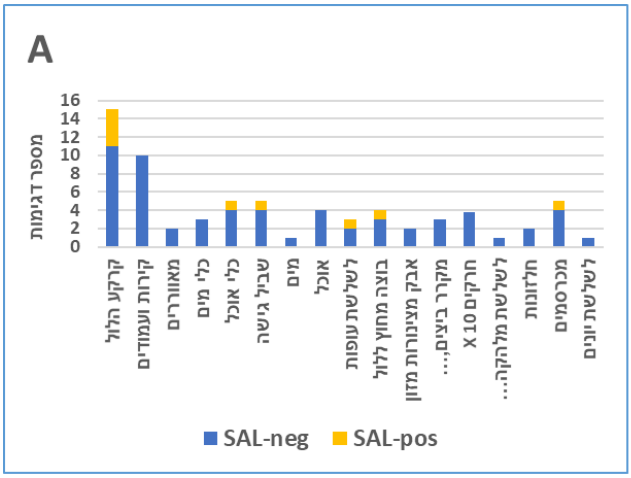
ב-5 לולי פטם נעשתה סדרת דיגומים בתדירות של אחת לשבוע. חזרנו לאותם לולים של הדיגום הסביבתי (להקות אחרות) לדיגום מטושי ביב נוסף לקראת שיווק בעונה ההפוכה. בלולי ההודים נבדקו שתי להקות מהשלב של לפני אכלוס ועד שלב השיווק (2 אתרים, בית אימון וסככות). בלולי פטם 3 ו-4 נמצא מספר נמוך עד אפס של קמפילובקטר, לכן המשכנו לעקוב אחר להקות אלו במשחטה ושם נמצאו בדיקות חיוביות מטבחות שמקורן בלהקות אלו, כלומר הן הזדהמו בתהליך השחיטה (היו כמעט שליליות במקרה אחד ושליליות במקרה האחר בכניסה למשחטה). בסדרת הדיגומים של לול פטם מס' 1 נמצאה עלייה משמעותית של שיעור קמפילובקטר עד 84% חיוביים. בבדיקה החוזרת נמצאו רק 8%.חיוביים. בלול 2 נמצאה עקומת עלייה לא מקובלת, ככל הנראה עקב שימוש באנטיביוטיקה במהלך הגידול עם 35% חיוביים בלבד בסוף הגידול בסדרה ראשונה ו-80% חיוביים בשנייה. בלול מס' 5 בסדרה ראשונה 60% חיוביים ובשנייה 70%. ממצאי להקות הפטם מוצגים באיור 4A. בלולי ההודים נראתה עקומת עליית קמפילובקטר מהירה כבר מגיל צעיר וכן שמירה על רמת נגיעות גבוהה לאורך כל הגידול עד השיווק (97% ו-100% לקראת שיווק בלולי הודים 1 ו-2 בהתאמה), כמתואר באיור 4B.

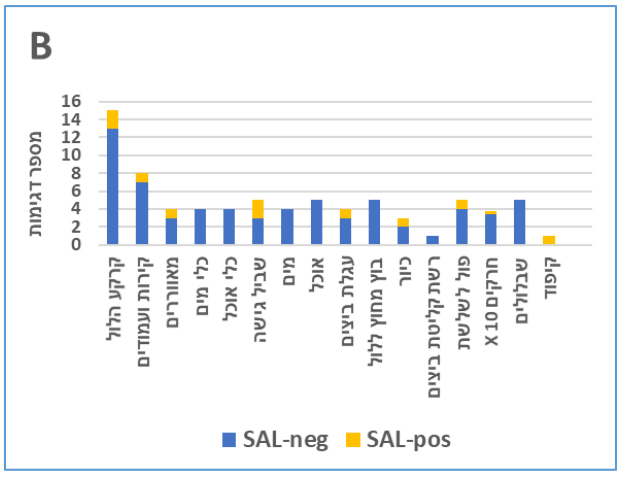


איור 1: כלל הדגימות הסביבתיות לסלמונלה (שליליות וחיוביות) ב-10 להקות פטם (5 לולים) לפני אכלוס הלול (A), לפני שיווק העופות (B), ולקמפילובקטר בלהקות אלו לפני אכלוס (C) ולפני שיווק (D).

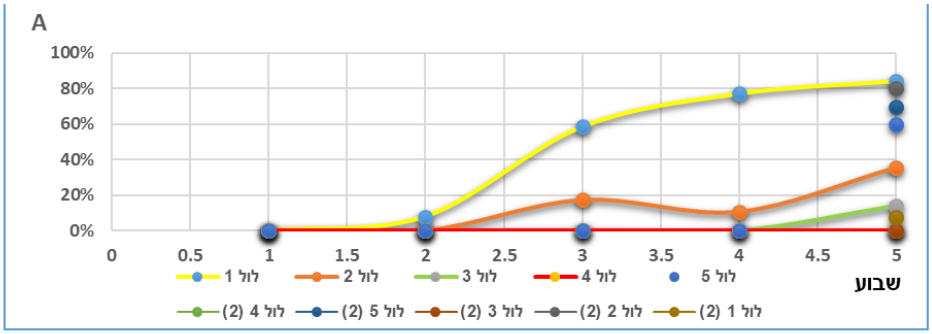


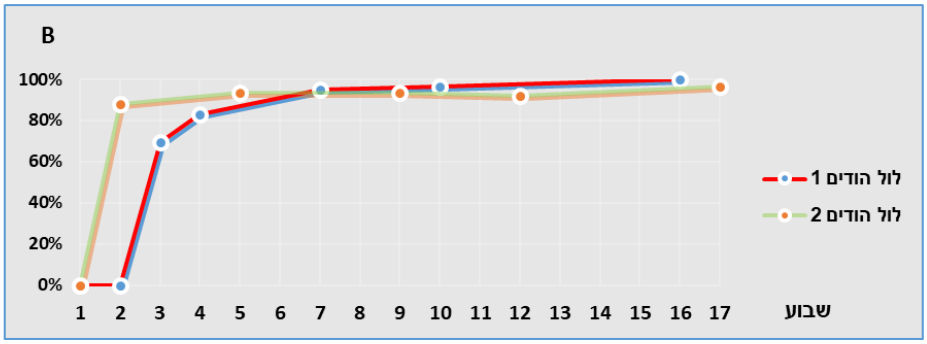
איור 2: כלל הדגימות הסביבתיות לסלמונלה (שליליות וחיוביות) ב-2 להקות הודים לבשר ב-4 אתרים (בתי אימון, סככות) לפני אכלוס הלול (A), ב-2 אתרים (סככות) לפני שיווק העופות (B), ולקמפילובקטר בלהקות אלו לפני אכלוס (C) ולפני שיווק (D).





איור 3: כלל הדגימות הסביבתיות לסלמונלה (שליליות וחיוביות) ב-5 להקות מטילות ביצי מאכל בשתי עונות שנה (A,B)





איור 4: שינוי השיעור של פטמים (A) והודים לבשר (B) שמפרישים קמפילובקטר במשטחי ביב עם גיל הלהקה (שבועות).

4.1.3 <u>בחינת רמת הזיהום בקמפילובקטר בנקודות מרכזיות לאורך קו השחיטה</u>

נבחנו 5 משחטות כשרות ליצוא שהן למעשה כל משחטות היצוא בישראל היום או כמעט כולן. בכל שחיטה נבדקה אותה להקה, לא הראשונה. נבדקו 7 להקות פטם, 4 להקות הודו, ועוד להקת רביה כבדה ("מטילות זקנות" של ביצי רביה). בכל אחת מ-6 נקודות נדגמו 10 עופות. פטמים נשטפו בשקית עם מי שטיפה (בופר פפטון) בעוד שמהודים נדגמו ספוגיות מעור הגב והירך. נקודות הדיגום: 1. אחרי שחיטת העוף, לפני מריטה. 2. אחרי מריטת נוצות. 3. אחרי פתיחה והרחקת אברי פנים. 4. אחרי

שטיפה ראשונה, לפני מיכל השרייה לפני המלחה. 5. אחרי המלחה ואחרי שטיפה שלאחר ההמלחה (הדחה). 6. אחרי צינון האוויר בחדר קירור.

התהליך המעבדתי כלל זריעת מי שטיפה ומיהולים עשרוניים עד 1:100 על מצעים סלקטיביים לקמפילובקטר. זאת לאחר ביצוע וולידציה פרלימינרית בה נמצא שרק חיידק זה גדל על המצע.

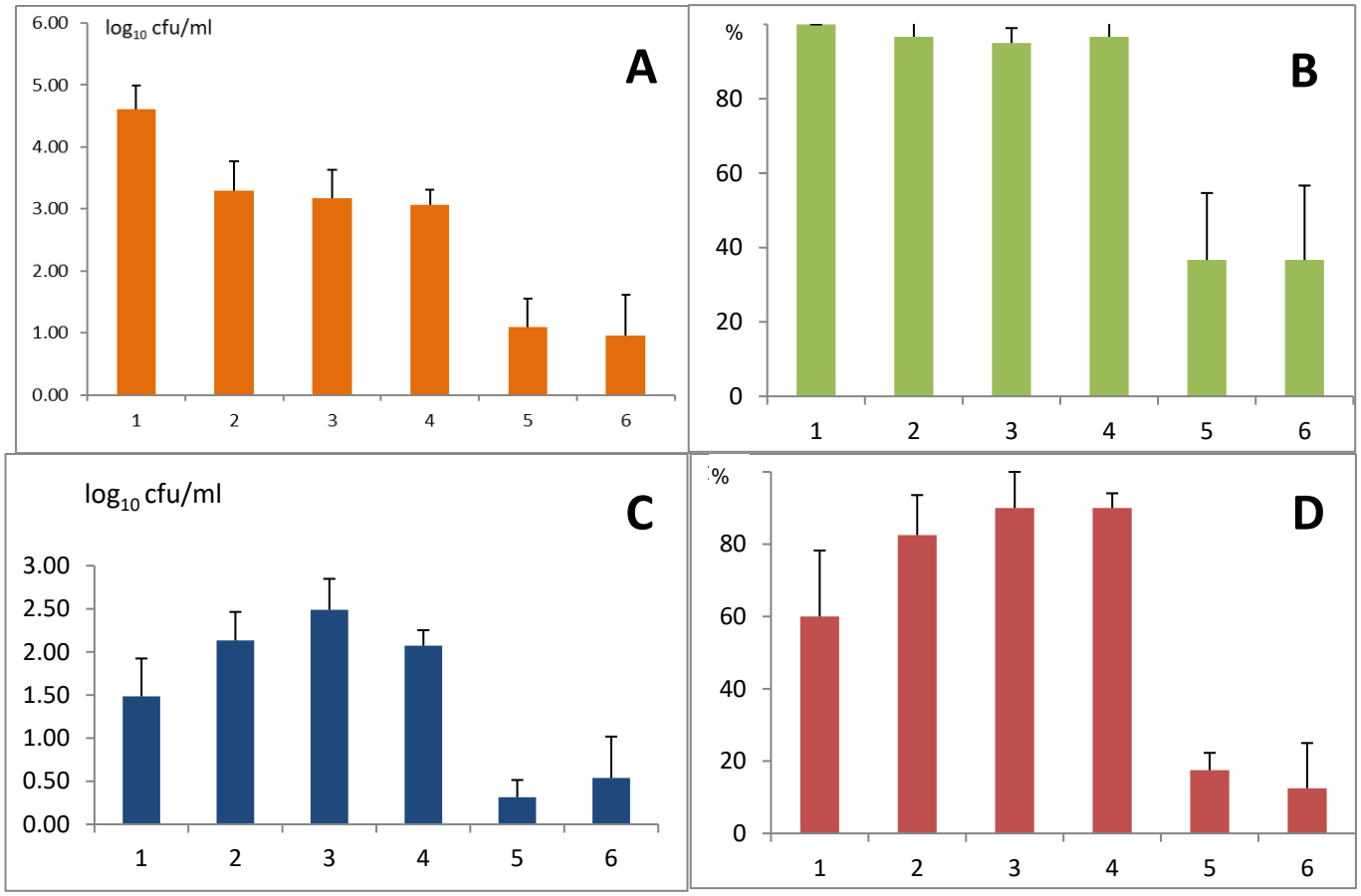
RAPID'Campylobacter Agar, BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France.

הדגרה 48 שעות, 42ºC, 7.5% CO_2, ספירת המושבות. בנוסף נעשתה העשרה במרק BOLTONS ENRICHMENT BROTH BLOOD FREE, לוודא שאכן מדובר בקמפילובקטר נלקחו מושבות לבדיקה במערכת :MALDI-TOF mass spectrometry, בכל המקרים המושבות אובחנו כחיידק קמפילובקטר נקי.

נבדקו 6 נקודות לאורך מסלול העיבוד של טבחות העופות, כאשר תמיד נדגמה אותה להקה. בכל נקודה נלקחו מי שטיפה מ-10 פטמים או ספוגיות מ-10 הודים. בכל נקודת דיגום נקבע מספר החיידקים למ"ל מי שטיפה ואחוז הדגימות החיוביות לקמפילובקטר, ונעשה ממוצע כל המשחטות באותה שלוחה. הממצאים מוצגים באיור 5. בבדיקות ההעשרה, ברוב המשחטות בהן בנקודות 5 ו-6 לא מצאנו חיידקים, בהעשרה כן צמחו חיידקים מה שמראה שיש סף תחתון לספירה שכנראה נובע מכך שכל החיידקים שעל העור נמהלים ב-400 מ"ל מי שטיפה (בפטמים) וכיוון שנדגם רק 0.5 מ"ל מהם למצע, כל כמות שמתחת 800 חיידקים על כל שטח העוף לא תימצא אלא רק לאחר העשרה. ב-3 משחטות לא נמצאו חיידקים גם בהעשרה בנקודה 6 וב-2 מהן גם בנקודה 5.

בפטמים, כל הלהקות שנבדקו התחילו עם ספירת חיידקים גבוהה בתחילת הקו, הספירה ירדה בערך בלוג אחד וחצי ב-3 הנקודות הבאות, ללא הבדל ביניהן, וירידה נוספת בעוד 2 לוגים בערך ב-2 הנקודות האחרונות. על-פי זאת, פתיחת העופות והרחקת אברי פנים (נקודה 3) לא העלתה את ספירת החיידקים, בניגוד למה שחשבנו, מאידך המלחה הפחיתה משמעותית את כמות החיידקים בטבחה (נקודה 5 בהשוואה ל-4), אולם תהליך הקירור לא הפחית את הכמות מעבר להמלחה (נקודה 6 בהשוואה ל-5) ובעצם משאיר חיידקי קמפילובקטר במוצר הסופי שנארז ונשלח לרשתות השיווק. תמונה דומה נראתה בשיעור הדגימות החיוביות שירד מ-90-100% ב-4 הנקודות הראשונות לכ-40% בשתי האחרונות, ללא הבדל בין נקודות 5 ו-6 (איור 5A, B).

בהודים תמונה די דומה למעט ערכים נמוכים יותר בנקודה 1 בהשוואה לנקודות 2-4, אולם ללא הבדל סטטיסטי כפי שנראה מתוך שגיאות-התקן. גם בהם נקודות 5 ו-6 נמוכות מנקודות 1-4 ללא הבדל ממשי ביניהן. כל הספירות בהודים נמוכות יותר מבפטמים כיוון ששיטת הדיגום שונה: ספוגיות שדוגמות שטח מוגבל ולא טלטול העוף כולו בשקית אליה אמורים להישטף מרבית החיידקים שעל העור. לכן אין להשוות את הערכים האבסולוטיים בין שתי השלוחות אלא רק את היחסיות בין נקודות הדיגום שדומה בשתיהן. גם בשיעור הדגימות החיוביות התמונה דומה (איור 5C, D).



איור 5 : ריכוז חיידקי קמפילובקטר (CFU/ml , ערך לוגריתמי) במי שטיפה של טבחות פטמים (A) ו-% הטבחות החיוביות (B), ובמי שטיפה של ספוגיות מטבחות הודים (C) ו-% הטבחות החיוביות (D) (ממוצע + שגיאת-תקן).

5. דיון ומסקנות

בכל הלולים שנבדקו נמצאו חיידקי סלמונלה בלולים הלא מאוכלסים ובשיעור גבוה יותר בלולים לפני שיווק. על-פי ממצאי תכנית הניטור של השו"ט שיעור לולי המטילות שנמצאו חיוביים לסלמונלה כללית עומד על 17.9% בשנת 2018, בלולי פיטום והודים לא נעשה עד כה ניטור קבוע. המצאות מקור יציב לזיהום סלמונלה בתוך או מחוץ למבנה הלול הינה בעיה משמעותית בממשק הלול. מרבית דגימות הבוץ, בסביבת הלול, נמצאו נגועות בחיידק. בנוסף נמצאו גם גורמים אביוטיים 'ניידים' חיוביים, כגון נעלי עובדי הלול. וגם גורמים ביוטיים כמו מכרסמים. חוסר היכולת לטהר לחלוטין את חיידק הסלמונלה בתוספת בטיחות ביולוגית לא מספקת והאפשרות של העברה אנכית של הפתוגן מאפשרות לחיידק לחדור שוב ושוב למבנה הלול ולזהם את העופות. ללא ריצוף גנטי, לא ניתן לדעת האם אותו תבדיד שנמצא לפני אכלוס אחראי להדבקה של הלול בדמות התבדיד שנמצא לקראת שיווק. יש מקום למחקר נוסף שיבחן את פרוטוקולי הניקיון של הלולים. השינוי בסרווארים שראינו בעיקר בין עונות ובין סביבות חיים שונות כמו בהודים שמתניידים מבית האימון לסככות מעידים על משמעות לעונתיות ולגיאוגרפיה על שכיחות הסרווארים של סלמונלה. קמפילובקטר לא בודד לפני האכלוס בלולי הפטם, ייתכן ונכנס למצב viable but non culturable (20) או שכמותו נמצאת מתחת לסף הרגישות של הבדיקה, או שהוא

מגיע רק עם האפרוחים. לפני שיווק בודד קמפילובקטר בכל הלולים ממקורות שונים. רק בעזרת ריצוף גנטי ניתן יהיה לראות האם אותו תבדיד הוא המדביק ומתפזר ברחבי הלול או שיש מספר רב של תבדידים. בטיחות ביולוגית היא פקטור חשוב שמשפיע על רמת החשיפה וההעברה הן של סלמונלה והן של קמפילובקטר. במחקרנו התרשמנו כי לולי פטם קטנים יותר שמטפל בהם אדם אחד היו יותר נקיים מקמפילובקטר בהשוואה ללולים בהם צוות העובדים גדול יותר. מעניינת גם העובדה שמרבית תבדידי קמפילובקטר היו ק. קולי, כאשר ידוע כי מרבית התבדידים מבני אדם הם ק. ג'ג'וני (3) וגם ידוע כי בשר עוף הוא מקור הזיהום העיקרי של האדם (21). זה מעלה שאלות כמו השוואת דינמיקת ההעברה של שני המינים מעופות לאדם, השוואת השרידות של שניהם וכיו"ב, שאלות שהן פתח למחקר נוסף. בהתייחס לדינמיקה של קמפילובקטר בלולים, ברוב לולי הפטם לא נראתה תמונה קלאסית של עליית שיעור קמפילובקטר במהלך גידול הלהקה והשונות בין עקומות העלייה גדולה. לעיתים לא נמצא קמפילובקטר כלל ולעיתים מספר החיוביים קפץ לאחוז גבוה בתוך שבוע. על-פי הספרות קיימת השפעה של עונת השנה על הנגיעות בקמפילובקטר למשל בגלל פיזורו באמצעות זבובים (17) ולכן ייתכן ועונת הדיגום משמעותית אם-כי לא ראינו הבדל או מגמה בין העונות. הדיגומים שהוספו במשחטה יכולים להצביע כי גם להקה שמגיעה לא נגועה או נגועה ברמה נמוכה עלולה להזדהם במהלך תהליך השחיטה. בלולי ההודים נצפתה עלייה מרשימה של חיוביים לקמפילובקטר ושמירה על שיעור חיוביים גבוה במהלך הגידול כולו. ייתכן שזה נובע מבטיחות ביולוגית נמוכה יותר, מרגישות גבוהה יותר שלהם לקמפילובקטר בהשוואה לתרנגולות או ממחזור הגידול הארוך שלהם שמתפצל בין שתי סביבות חיים. בבדיקת נקודות הדיגום במשחטה התקבלו סדרי גודל של 4-5 לוגים עשרוניים במ"ל מי שטיפה בתחילת הקו ו-1 לוג בסיומו. על-פי מחקרם של Vinueza-Burgosa וחוב' (22), בעבודתם התקבלו ערכים של 3-4 לוגים עשרוניים לגרם עור בתחילת המסלול ו- 1.5-3 לוגים בסיום. בחישוב גס, בפטם ששוקל 2.5-2.7 ק"ג (כמקובל בשחיטה ועל-פי נתוני משקל הפטמים שקבלתי במשחטות השונות), שטח פני העור על-פי חישוב גיאומטרי כ-6000 ס"מ מרובע. גם בחישוב על-פי נוסחה שנקבעה לצרכים קליניים בעופות שממירה את משקל הגוף לשטח פנים (23) מתקבל ערך קרוב של כ-5500 ס"מ מרובע. על-פי זה, אם במי שטיפה קבלנו בממוצע כ-50000 חיידקים למ"ל (הממוצע בין 4-5 לוגים) אזי ב-400 מ"ל מי שטיפה בשקית אליהם נשטפו מרבית החיידקים שעל העור יש $2X10^7$ חיידקים, בחלוקת ערך זה לשטח העור 6000 ס"מ מרובע מתקבל ערך של כ-3000 חיידקים לס"מ עור, שהם כ-3 לוגים עשרוניים כמו במחקר שצוין (בהנחה שס"מ מרובע עור שוקל כ-1 גרם). פעולת ההמלחה שנדרשת על-פי ההלכה היהודית מצמצמת את רמת הקמפילובקטר אך לא לחלוטין מממצאי ניסוי המשחטות נתן לחשוב על מס' המלצות כמו ניטור משטחי העבודה לקמפילובקטר במהלך יום העבודה ובין הלהקות הנשחטות וניקוי וחיטוי נוספים במידת הצורך. בנקודה 5 העופות שוהים בצ'ילר הדחה לאחר המלחה. גם אם ההמלחה מפחיתה את מספר החיידקים ואת שיעור העופות החיוביים, השהייה המשותפת בצ'ילר עלולה לגרום להדבקה חוזרת של כאלו שכבר התנקו, לכן הערכים לא מתאפסים. נתן לחשוב על פתרונות כמו יותר שטיפות בצ'ילרים עם החלפות מי שטיפה נקיים בכל צ'ילר, או על שטיפה באמצעות מתזי מים ולא השרייה בצ'ילר.

<u>מסקנות</u>

1. מרבית הלולים בשלוחות הפטם, ההודים לבשר והמטילות נגועים בסלמונלה בלול ובסביבתו גם בלול הריק.
2. נדרש חיטוי אינטנסיבי יותר של הלול בין להקות, סילוק אבק ויבוש מקורות מים עומדים, וכן הדברת מכרסמים מוגברת, לצמצום סלמונלה סביבתי ככל האפשר. יש להקפיד גם על חיטוי נעלי עובדי הלול ומניעה ככל האפשר של כניסת בעלי חיים למתחם.
3. ניתן למצוא סרוואריים שונים של סלמונלה בעונות שונות גם באותו לול מה שעשוי לרמז על מקורות סביבתיים ניידים לחיידק כגון מקורות ביוטיים, ובאזורים גאוגרפיים שונים.
4. במרבית לולי הפטם וההודו לבשר שיעור קמפילובקטר עולה עם גיל הלהקה והלהקות מגיעות למשחטה עם שיעור נגיעות גבוה.
5. במשחטה גם עופות שליליים לקמפילובקטר עשויים להזדהם במהלך עיבוד הטבחות. מומלצת הקפדה על ניקיון וחיטוי אזורי העבודה במשחטה בין הלהקות.
6. מלח הנו גורם משמעותי בצמצום רמת קמפילובקטר בטבחות וגם שיעור הטבחות המזוהמות, קירור הטבחות במרבית המקרים לא מצמצם את הרמה מעבר לפעולת ההמלחה ומשאיר אותה ברמה די קבועה, במיעוט הלהקות לא יימצא קמפילובקטר בסיום עיבוד הטבחות.

6. ביבליוגרפיה

1. EFSA, ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015; 13(1):3991, 162 pp.. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal. 2015.
2. Keithlin, J., Sargeant J, Thomas MK, Fazil A. Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *BMC Public Health* 2014; 14:1203.
3. Weinberger, M, Lerner L, Valinsky L, Moran-Gilad, J, Nissan, I, Agmon, V, Peretz C. Increased Incidence of *Campylobacter* spp. Infection and High Rates among Children, Israel. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(11): 1828–31.
4. Weinberger M, Yaron S, Agmon V, Yishai R, Rosenberg A, Peretz C. Curtailed short-term and long-term survival following infection with non-typhoid *Salmonella* in Israel. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2):278-84.
5. Zaidenstein R; Peretz C; Nissan I; Reisfeld A; Yaron S; Agmon V; Weinberger M. The epidemiology of extraintestinal non-typhoid *Salmonella* in Israel: the effects of patients' age and sex. *Euro J Clin Microbiol & Infect Dis*. 2010; 29(9):1103-09.
6. Gal-Mor, O., L. Valinsky, M. Weinberger, S. Guy, J. Jaffe, Y.I. Schorr, A. Raisfeld, V. Agmon, I. Nissan. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:1754-7.
7. Davies, R., Breslin, M. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella* enterica serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathology* 2004: 33(2): 133-44.

8. *Gast, R. K*, Regmi P., Guraya R. Jones D.R., Anderson, K.E., Karcher D.M. Contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens of four commercial genetic lines in conventional cages and enriched colony housing Poultry Science 2019, 98(10) , 5023–7,
9. Waldner L L., MacKenzie K. D. , Köster W. White A.P. From Exit to Entry: Long-term Survival and Transmission of *Salmonella*. Pathogens. 2012 1(2): 128–155
10. OIE, *Salmonella* (non-typhoidal), 20/2/2018. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal).
11. Soto-Arias J.P., Groves R. L., Barak J.D.. Transmission and retention of Salmonella enterica by phytophagous hemipteran insects. *Appl Environ Microbiol.* 2014: 80(17): 5447-56.
12. Heyndrickx M., Vandekerchove D., Herman L., Rollier I., Grijspeerdt K., De Zutter L. Routes for *salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect.* 2002 129(2):253-65.
13. Callicott KA1, Friethriksdóttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisaillon JR, Gunnarsson E, Berndtson E, Hiett KL, Needleman DS, Stern NJ. Lack of evidence for vertical transmission of Campylobacter spp. in chickens. Appl Environ Microbiol. 2006: 72(9):5794-8.
14. Cox, NA, Richardson LJ, Maurer, et al. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. *Journal of Food Protection*, 2012; 75 (10):1896–902.
15. Kessel AS, Gillespie IA, O'Brien SJ, Adak GK, Humphrey TJ, Ward LR. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992–1999. *Commun Dis Public Health*. 2001; 4:171–7.
16. Murphy O, Gray J, Gordon S, Bint AJ. An outbreak of campylobacter food poisoning in a health care setting. *J Hosp Infect*. 1995; 30:225–8.
17. Nichols, GL. Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(3): 361–4.
18. Wiseman, A, Berman, E, Marantz, B., Masury, E, Maman, O, Pirak, M. Baseline Survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler intestines and on broiler carcasses in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 2017; 72 (3):3-6.
19. Israel, D. 2016. https://www.jewishpress.com/news/poultry-council-secret-report-more-than-93-of-israels-fresh-chicken-infected/2016/02/17/.
20. Magajna, BA., Schraft, H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4°C more quickly than their planktonic counterparts. *Food Control* 2015; 50:45-50.
21. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. 1992. Interim report on *campylobacter*. Her Majesty's Stationery Office, London, United Kingdom.
22. Vinueza-Burgosa C., Cevallosa M., Cisnerosa M.,Van Dammeb I., De Zutter L. Quantification of the *Campylobacter* contamination on broiler carcasses during the slaughter of *Campylobacter* positive flocks in semi-industrialized slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 2018; 269: 75-9.
23. Perez, CR, Moye, JK, Pristos, CA. Estimating the surface area of birds: using the homing pigeon (*Columba livia*) as a model. 2014; Biology Open 3:486-8.

פרק 2. השוואה גנטית בין תבדידי קמפילבוקטר משלבים שונים של שרשרת הייצור של העופות וכן ממקורות הומניים ע"י שימוש בריצוף גנומי לזיהוי מקור ההדבקה באדם.

חוקר ראשי: ד"ר לאה ולינסקי (משרד הבריאות)

חוקרים שותפים: פרופ' מירים וינברגר, פרופ' קובי מורן-גלעד, ד"ר אסף רוקני

1.0 תקציר

קמפילובקטר הוא הפתוגן האנטרי הנפוץ ביותר בעולם המערבי ובישראל, עם עומס תחלואה גבוה בילדים. החיידק זאונוטי ומקורו בעיקר מעוף. מעקב מדויק אחר הפתוגן במשק החי והמעבר לאדם תאפשר התערבות יעילה להקטנת שיעורי התחלואה.

מטרת המחקר היתה לבדוק את הקשר הגנטי בין תבדידי קמפילובקטר משלבים שונים של שרשרת הייצור של העופות ולהשוותם לתבדידים מחולים. בסך הכול בודדו 125 תבדידי *Campylobacter jejuni* מעופות ומסביבת הלול ב- 2 סקרים נפרדים. ריצוף גנומי מלא נעשה על הדנ"א הגנומי של החיידקים במערכת של אילומינה. אנליזה ביואינפורמטית בוצעה בתוכנת BioNumerics ורצפי התבדידים הושוו באנליזת wgMLST על 3529 אללים. עצים פילוגנטיים נבנו באמצעות אנליזת Minimum spanning tree (MST). זיהוי גנים לאלימות נעשה ע"י סריקת רצפי ה- assembly לתוך מסד נתונים PATRIC ובדיקת 78 גורמי אלימות, מתוך מסד נתוני VICTORS. נמצא מגוון גנוטיפים של *C. jejuni* בלולים השונים עם דימיון מובהק רק בתוך הלול, לא נמצא קשר למשחטה או למיקום גיאוגרפי. חלק מהתבדידים נמצאו דומים לתבדידים מבני אדם וברובם נשאו גנים לאלימות.

2.0 מבוא

תחלואה בקמפילובקטר מהווה אתגר גדול לברה"צ, כ-8000 מיקרים בשנה מוכחים מעבדתית. המצב דומה בארצות אירופה וארה"ב. התחלואה המזוהה מעבדתית מהווה רק חלק קטן משיעורי התחלואה האמיתית: לא תמיד החולה פונה לרופא, רק חלק מהפונים מבצעים תרבית צואה והחיידק קשה לזיהוי ובידוד במעבדה. שיעור התחלואה כתוצאה מקמפילובקטר בישראל עלה בצורה דרמתית בשנים 1999-2010 והמשיך לעלות לשיעור של 100/100,000. עומס התחלואה הגדול ביותר הינו בתינוקות עד גיל שנתיים, שאצלם שיעורי התחלואה הגיעו לכ- 600/100,000 (1).

מקור התחלואה מקמפילובקטר הוא ממזון ומשערים כי בישראל המקור העיקרי לתחלואה בקמפילובקטר הוא העוף. האפרוחים הבוקעים חופשיים מקמפילובקטר, אך עוברים קולוניזציה תוך שבועיים שלושה. שיעורי הזיהום בעופות ממשחטות יכול להגיע ל-90% ומעלה.

ריצוף הגנום השלם (whole genome sequencing, WGS) של חיידקים מאפשר שיוך גנטי והשוואה בין תבדידים שונים, וזיהוי גנים הקשורים בעמידות ובאלימות. בחיידקים אחרים שמקורם ממזון בעלי חשיבות לבריאות הציבור החל להיווצר מצטבר בסיס ידע בשימוש ב- WGS , לגבי קמפילובקטר המחקר עדיין בתחילת הדרך (2, 3).

3. מטרות המחקר

1. בדיקת ההיתכנות של השימוש ב-WGS לצורך הפקת אינפורמציה גנטית בקנה מידה נרחב לצרכי בריאות הציבור.
2. השוואה גנטית בין תבדידי קמפילובקטר ממקורות משלבים שונים של שרשרת הייצור של העופות וכן ממקורות הומניים.

4.0 פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

שיטות

תבדידי קמפילובקטר: המחקר נעשה על 125 תבדידי קמפילובקטר שבודדו מעופות ומסביבת הלול בסקר ארצי שנערך ע"י מועצת הלול (סקר משחטות) ובסקר נוסף במסגרת מיזם זה (סקר לולים), בראשות ד"ר אבישי לובלין, בו נדגמו עופות מלולים שונים במהלך הגידול בלול. ריצוף גנומי נערך על 63 תבדידים של *Campylobacter jejuni* שהתקבלו באדיבות ד"ר מיקי פירק (מועצת הלול) מסקר ארצי שנערך בשנים 2015-16 ובו נדגמו פטמים מ-53 להקות ממשקים שונים בארץ ב- 29 משחטות, במשך 12 חודשים. מקור הפטמים, בחלוקה למחוזות היה: מרכז 15, נגב 18, עמקים 13, צפון 17. הדגימות נלקחו ביום השחיטה, במשחטה אליה נשלחים בשגרה העופות מאותו הלול; הדגימות נלקחו לפני (דגימות מעיים) ואחרי השחיטה (דגימות עור). סה"כ נמצאה נגיעות כללית בקמפילובקטר של 91% במעיים ו- 66% נגיעות בעור. מידע על התבדידים ומקורם התקבל מד"ר פירק, השותף במיזם. מקור נוסף לתבדידי *C. jejuni* היה סקר סביבתי שנערך ע"י א. לובלין (ראה פרק קודם). בסקר זה נדגמו 5 לולים בזמנים שונים לאורך גידול הלהקה במהלך 2018-2019. בסקר נערך דיגום של העוף בעזרת מטוש ביב ונלקחו גם דגימות סביבתיות. סה"כ נאספו בסקר זה 62 תבדידי *C. jejuni* נוספים. כל 125 תבדידי הקמפילובקטר שרוצפו אומתו ב- PCR, לרמת המין, במרכז הארצי לקמפילובקטר (מעבדות מרכזיות משרד הבריאות).

ריצוף גנומי: DNA כרומוזומלי הופק מה- 125 חיידקים ברובוט QIASymphony, ברמת ניקיון גבוהה, כאשר איכות וכמות ה- DNA הוערכו ב- nanodrop. הכנת ספריות גנומיות נערכה בקיט Nextera XT והריצוף בוצע בפלטפורמת MiSeq או HiSeq של חברת Ilumina.

אנליזה ביואינפורמטית של רצפי ה- DNA בוצעה בתוכנת BioNumerics 7.6.3. מדדי האיכות נקבעו ל- AvgQuality מעל 30, AvgDeNovoCover מעל 50, אורך הגנום, במקרה של קמפילובקטר צריך להיות בסביבות 1.7Mb.

השוואת רצפי התבדידים נעשתה באנליזת wgMLST לפי הסכימה של המרכז הלאומי האמריקאי לבקרת מחלות- CDC, הבודקת דימיון בחיידק *Camylobacter jejuni* בין 3529 אללים. קרבה גנטית מובהקת בין 2 גנומים ב- wgMLST היא עד 10 אללים שונים. שִׁיוּם הגנומים נעשה על פי 7 אללים

מוסכמים בינלאומית - MLST . האללים הושוו באנליזת *Minimum Spanning Tree* (MST) הבודקת את המרחקים הגנומים בין התבדידים

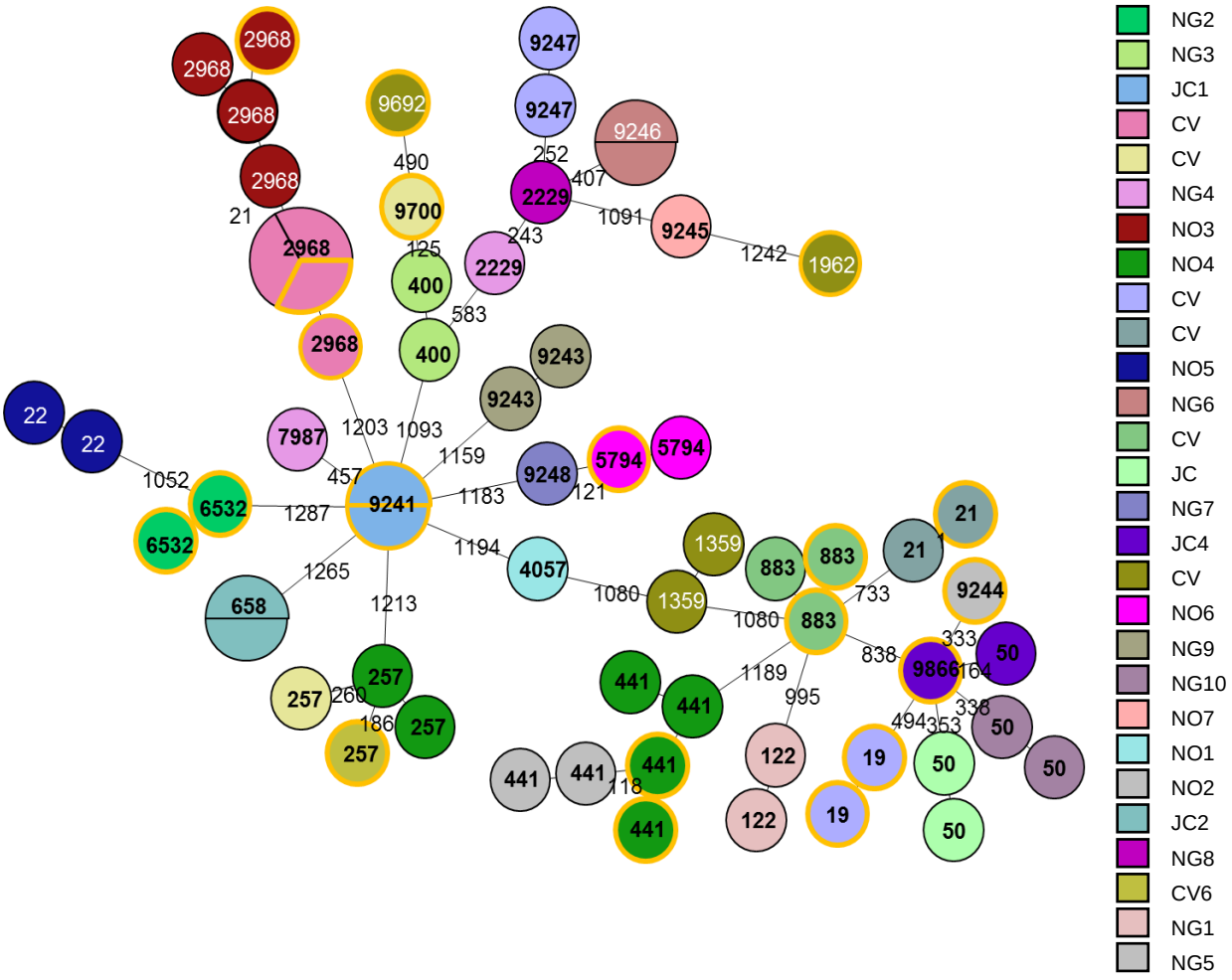
4.1 השוואה גנטית בין תבדידי *C.jejuni* שמקורם בסקר לולים ארצי

באנליזת wgMLST שנערכה בתבדידי *C. jejuni* שמקורם בסקר ענף הלול עופות זוהו 2468 אללים משותפים בגנומים של תבדידי *C. jejuni*. (איור 1). בסך הכול, אופיינו בין 6-1 חיידקים מכל לול, בהתאם למספר התבדידים שהתקבלו. נמצא **דימיון מובהק רק בין התבדידים שמקורם באותו הלול**. לא היה הבדל בין דגימות מעיים (לפני השחיטה) לעור (אחרי השחיטה), לא נמצא קשר בין המשק ממנו הגיעו הפטמים לבין המשחטות, כלומר, מעופות שנשלחו לאותה המשחטה, מלולים שונים, בודדו טיפוסי *C.* jejuni שונים, הספציפיים ללול.

אנליזת MLST קלאסי על פי 7 אללים בלבד היא בעלת רזולוציה נמוכה יותר, אך יתרונותיה בכך שניתן שם לצבר וקיבוץ התוצאות מקל על הבנת האנליזה. נמצא כי בכל לול קיים קלון ייחודי ללול; אמנם 5 ST`s (Salmonella Types) נמצאו ב-3-2 משקים כל אחד, אך ב wgMLST נמצאו הבדל מובהק בין התבדידים מ-2 המשקים (איור 1). במסגרת מחקר זה, הוגדרו 9 ST`s חדשים אשר לא הוגדרו קודם (ברמה בינלאומית).

4.2 השוואה גנטית בין תבדידי קמפילובקטר משלבים שונים של שרשרת הייצור של העופות

מקור תבדידי *C. jejuni* בעבודה זו היה בסקר עומק, שבחן את מקור הזיהום בקמפילובקטר, לאורך כל תקופת הגידול של העופות (5 שבועות), תוך דיגום שבועי של עופות ושל סביבת הלול. בחלק מן המקרים, כאשר לא נמצא קמפילובקטר במשק, העופות נדגמו גם במשחטה (שבוע 6). איור 2 מציג אנליזה פילוגנטית של תבדידי *C. jejuni* שבודדו מ- 5 לולים בזמנים שונים, במשך שנה וחצי. בדומה לסקר משחטות נמצאה ספציפיות גבוהה ללול, כלומר בכל לול נמצא טיפוס *C. jejuni* אחר. גם ברמת ה- MLST הקלאסי וגם ברמת wgMLST. נמצאו 2 תבדידים עם אותו ה- ST אחד סביבתי ואחד מלול אחר, אך הם נמצאו שונים ב- wgMLST, עם שונות של 14 אללים (לפי סטנדרטים בינ"ל מקובל כי תבדידים שונים הם אלו הנבדלים ביותר מ- 10 אללים). במשק 3, בדיגום בסוף 2017, בודדו 24 תבדידים, נמצאו ST9691, ST400 ו- ST9690. תבדיד אחד של ST9390 נמצא גם במשק 11-5 בסוף 2018, אך ב- wgMLST הוא נבדל ב- 43 אללים (איור 2). במשק 4 נמצאו 5 תבדידי *C. jejuni* שהיו 3 ST`s שונים ואילו במשק 11-5 בודדו 25 תבדידים מ- 2 ST`s. ב- 4 מ- 5 הלולים בודד *C. jejuni* גם מהסביבה. תבדידים אלו נמצאים קרובים, באופן מובהק, לתבדידים שבודדו מן העוף באותו הלול (איור 2).

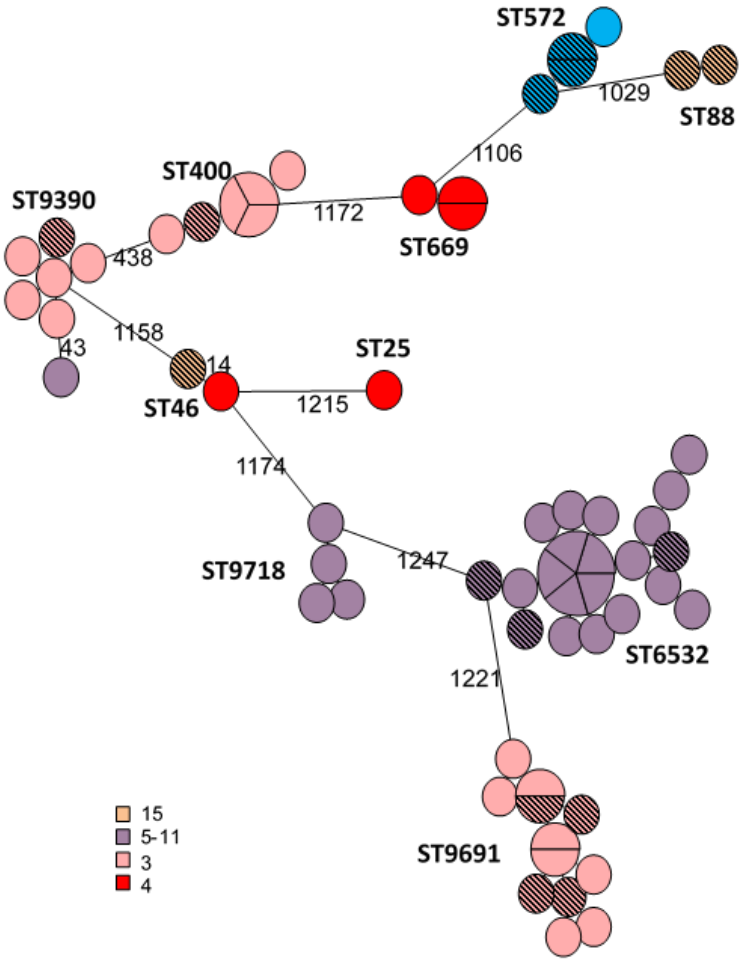


איור 1. אנליזה פילוגנטית של תבדידי *C.jejuni* לפי משקים. ה- MST של 63 התבדידים מבוסס על אנליזת wgMLST. התבדידים מיוצגים ע"י עיגולים שנצבעו לפי קוד המשק ממנו בודדו. המספר בעיגול מייצג את ה- ST לפי MLST קלאסי. עיגולים בצבע כתום מייצגים תבדידים מעור (אחרי שחיטה). העיגולים מחוברים בקו אשר אורכו הוא ביחס למרחק הפילוגנטי בין 2 התבדידים. עיגול חצוי הוא עיגול מורכב מ- 2-3 תבדידים הזהים בכל האללים. המספרים הרשומים על הקווים מייצגים את מספר האללים השונים בין 2 תבדידים, קוים ללא מספר מייצגים קרבה גנטית מובהקת <10 אללים שונים.

4.3 שוואה גנטית בין תבדידי קמפילובקטר שמקורם בשלבים שונים של שרשרת הייצור של העופות לתבדידים ממקורות הומנים.

אנליזה פילוגנטית נערכה על 63 התבדידים מסקר המשחטות ו- 62 התבדידים מסקר לולים בהשוואה ל- 239 תבדידי *C. jejuni* מבני אדם מהשנים 2003-2012 (אוסף משרד הבריאות). האפידמיולוגיה הגנומית של 239 התבדידים מבני אדם סוכמה במאמר שהתפרסם לאחרונה (3). בהשוואה בין תבדידים מעופות לתבדידים מבני אדם ב- MLST של 7 אללים, נמצא מגוון של 67 ST`s שונים, מבניהם 12 משותפים לתבדידים הומניים ולתבדידים מעופות (איור 3). אנליזה מעמיקה של wgMLST, מראה כי המרחקים בין התבדידים מעופות ומאנשים הם של מאות אללים. ה- ST המשותפים לתבדידים מאנשים ומעופות הם: 1962, 4057, 122, 1359, 19, 21, 400, 5794, 658, 883, 257, 50. במחקר מקורות

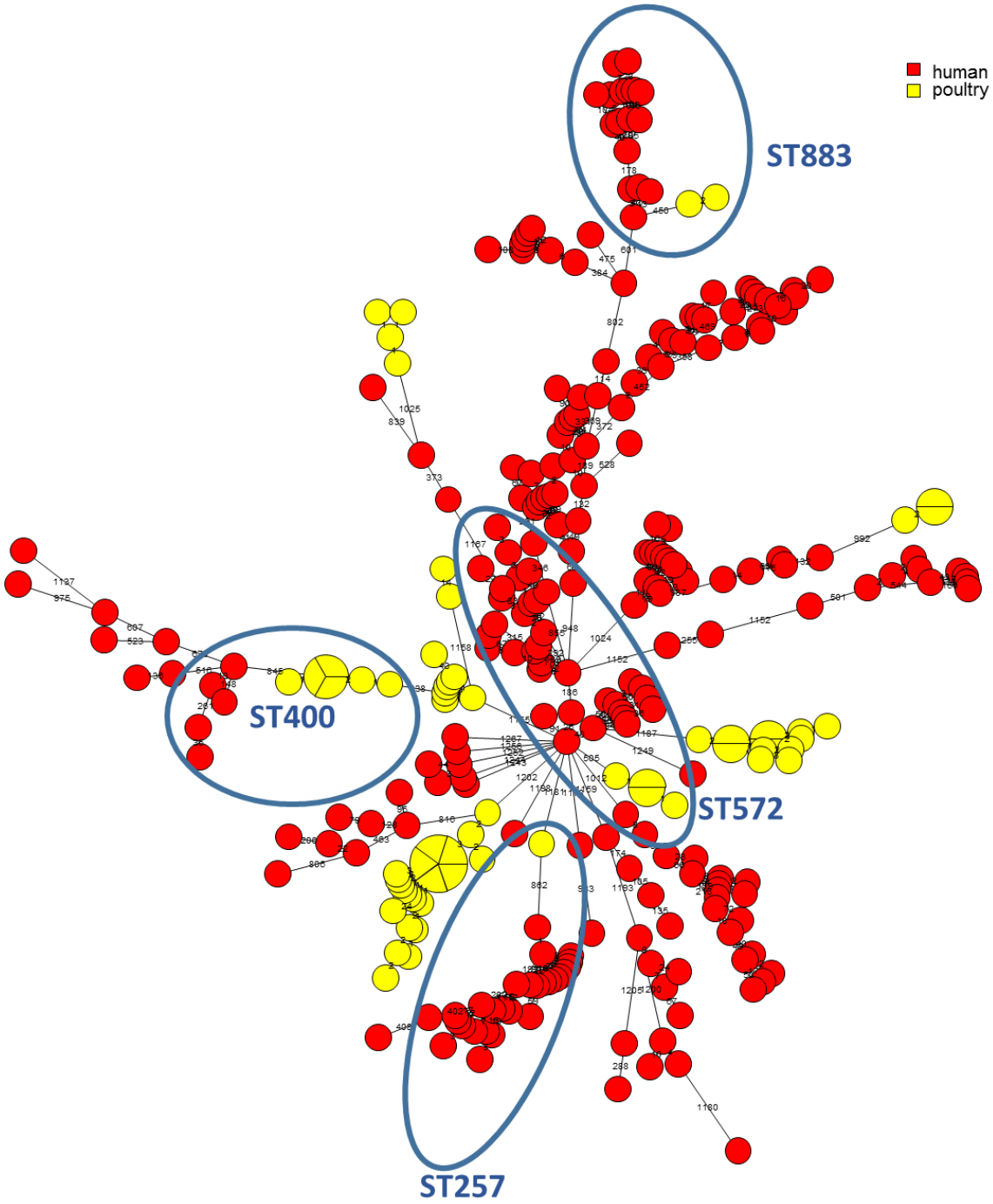
הזיהום בשלוחת הפטם נמצאו ST883 ו- ST257 גם בתבדידים הומניים ומעופות. קיימים ST (50, 21) בהם קיימת שונות גנטית גדולה יותר בתוך הקבוצה ובהתאמה נמצאו תבדידים אלו מ- 2 הקבוצות.



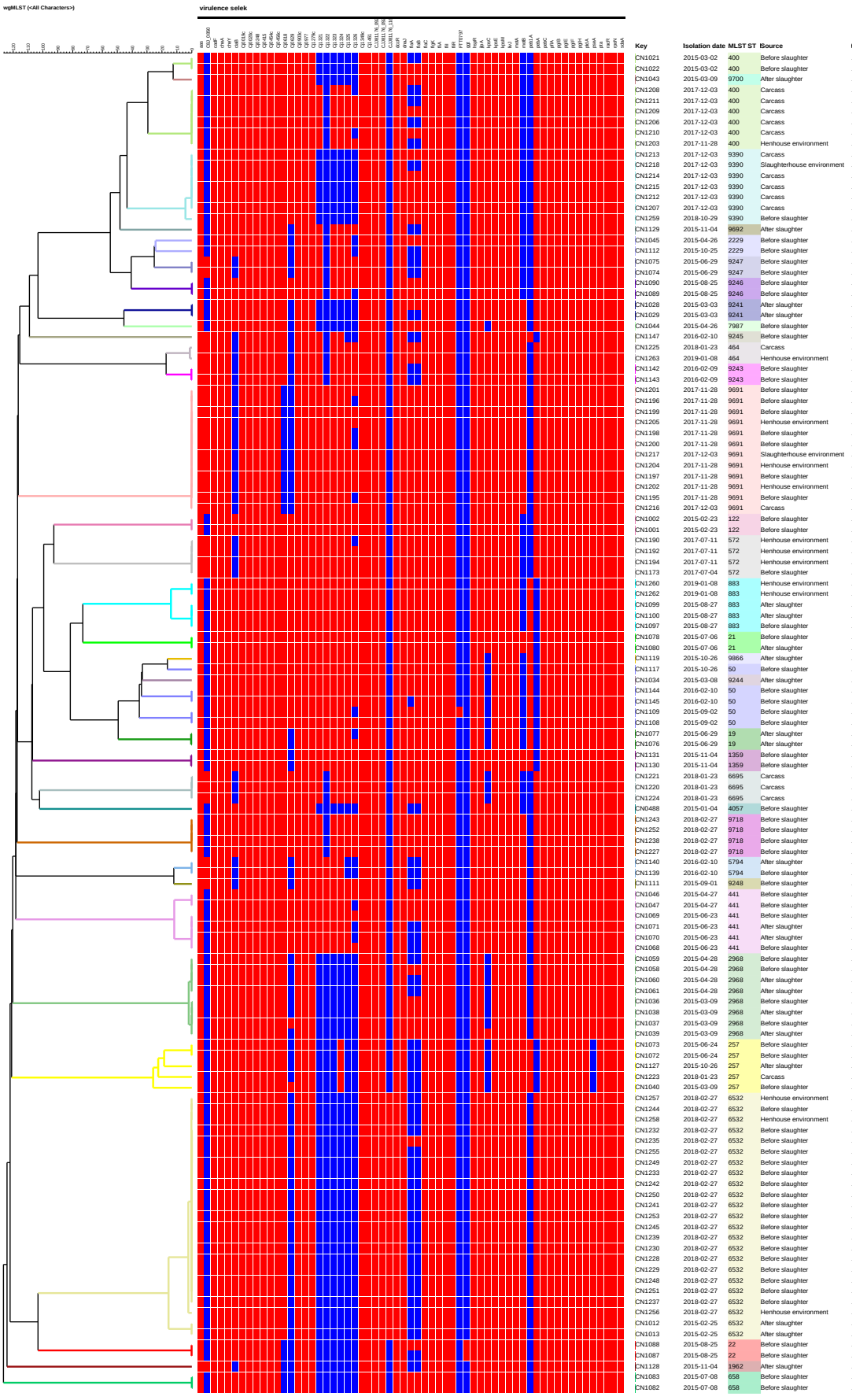
איור 2. אנליזה פילוגנטית של תבדידי *C.jejuni* אשר בודדו מסקר מקורות הזהום בשלוחת פטם. ה-MST של 62 התבדידים מבוסס על אנליזת wgMLST . התבדידים מיוצגים ע"י עיגולים שנצבעו עפ"י המשק ממנו בודדו. תבדידים מהסביבה של הלול (מטוש נגרר, כלובי נשיאה, כלי מים) מסומנים ע"י קוים אלכסוניים שחורים בעיגול. העיגולים מחוברים בקו אשר אורכו הוא ביחס למרחק הפילוגנטי בין 2 התבדידים. המספרים הרשומים על הקוים מייצגים את מספר האללים השונים, במרחקים פילוגנטיים של פחות מ- 10 אללים אין מספר על הקו, מייצג קרבה גנטית מובהקת. עיגול חצוי הוא עיגול מורכב משני תבדידים הזהים בכל האללים. ה-ST מ- MLST קלאסי מצוין ליד קבוצת גנומים.

4.4 זיהוי גנים לאלימות (virulence)

ריצוף הגנומים אפשר בחינה של הימצאות גנים לאלימות בתבדידים השונים. רצפי ה-assembly של 125 תבדידי *C. jejuni* מעופות, נסרקו ל-78 גנים ידועים לאלימות. לתוך מסד נתונים PATRIC הועלו 125 הגנומים ונסרקו ל-78 גנים ידועים לאלימות, מבסיס נתוני הגנים לאלימות VICTORS. תוצאות האנליזה מראות כי 41 גנים לאלימות נמצאו בכל הזנים; 20 מהם נמצאו בחלק מהזנים, מתוכם אחד נמצא רק ב- 2 זנים שהיו ST22 היחידים במחקר וגן אחד שנמצא רק בזן אחד, ST50 שהיה נפוץ מעט יותר (6 זנים); 17 גנים לאלימות לא נמצאו באף אחד מהזנים (איור 4).



איור 3. אנליזה פילוגנטית של תבדידי *C. jejuni* מבני אדם ומעופות. אנליזת MST לפי האללים של wgMLST של 301 תבדידים. 62 תבדידים מסקר מקורות הזהום בשלוחת הפטם מיוצגים ע"י עיגולים צהובים. 239 תבדידים ממקור הומני, מסומנים באדום. העיגולים מחוברים בקו אשר אורכו הוא ביחס למרחק הפילוגנטי בין 2 התבדידים. המספרים הרשומים על הקווים מייצגים את מספר האללים השונים בין 2 תבדידים. עיגול חצוי הוא עיגול מורכב משני תבדידים או יותר הזהים בכל האללים. האליפסות הכחולות מסמנות את תבדידים השייכים לאותו ST (MLST,7 alleles) ומכילים תבדידים הן מעופות והן מבני אדם.



איור 4. גנים ידועים לאלימות שזוהו ב- 125 הגנומים של תבדידי *C. jejuni* שרוצפו במחקר זה.

5. דיון ומסקנות

אנליזת DNA של תבדידי *C. jejuni* מעופות ב- MLST קלאסי (7 גנים), מראה מגוון של קלונים. אנליזה רחבה יותר, wgMLST של התבדידים מעופות מראה שונות גדולה בין התבדידים. תבדידים שנקבעו כקלונליים ב-MLST נמצאו שונים זה מזה ביותר מ- 49 אללים, מלבד 2 ST אשר ביניהם 2-3 אללים שונים. מקובל לקבוע כי אם יש הבדל בין 2 זנים של 1-10 אללים שונים מתוך ה- 3529 שנבדקו, יתכן שיש קשר אפידמיולוגי ביניהם.

השוואה של תבדידי *C. jejuni* מעופות ומבני אדם נעשתה בין 239 תבדידים הומנים שנאספו בשנים 2003-2012 (3), ו- 125 תבדידים מעופות ממחקר זה. נמצא כי קיימים ST משותפים ל- *C. jejuni* מבני אדם ומעופות, עם זאת, הקרבה הגנטית הייתה גדולה יותר בתוך הקבוצה. בדיקה ב- wgMLST מראה שונות גדולה עוד יותר. לציין כי החיידקים מאנשים ומעופות בודדו בשנים אחרות, ויתכן הטייה של התוצאות. כדי לבדוק נושא זה, יהיה צורך במחקר נוסף בו תיערך השוואה גנטית של תבדידים שבודדו מאנשים ומעופות באותו זמן ומקום.

אנליזה של גורמי אלימות בחיידק העלתה כי מרבית התבדידים נשאו גנים המקודדים לגורמי אלימות. כמו כן, נמצאה הלימה בין ה- ST לבין הימצאות הגנים הללו.

<u>מסקנות</u>

1. בלולים שונים קיימים מגוון של גנוטיפים (ST's) של *C. jejuni*
2. דימיון מובהק של תבדידי *C. jejuni* נמצא רק בתוך הלול.
3. לא נמצאה עדות לזיהום העופות במשחטה לפני שיווק.
4. לא נמצא דימיון גנוטיפי בין תבדידים מלולים קרובים גיאוגראפית.
5. מרבית התבדידים של *C. jejuni* מלולים נשאו גנים המקודדים לגורמי אלימות.

6. ביבליוגרפיה

1. Weinberger M, Lerner L, Valinsky L, Moran-Gilad J, Nissan I, Agmon V, Peretz C. Increased incidence of *Campylobacter* spp. infection and high rates among children, Israel. Emerg Infect Dis. 2013; 19(11):1828-31.
2. Weinberger M, Moran-Gilad J, Rokney A, Davidov Y, Agmon V, Peretz C, Valinsky L. (2016). Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* infection in Israel-a nationwide study. Clin Microbiol Infect. 2016; 22(12):1005
3. Rokney A, Valinsky L, Moran-Gilad J, Vranckx K, Agmon V, Weinberger M. Genomic Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Transmission in Israel. Front Microbiol. 2018 16; 9:2432

פרק 3. פיתוח אמצעי הדברה ביולוגית

חוקר ראשי: פרופ' שלמה סלע-סלדינגר (מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני)
חוקרים שותפים: ד"ר יוליה קרופיצקי, ד"ר אבישי לובלין, ד"ר רותם אמיתי טאוב

1. תקציר

חיידק הסלמונלה הוא הפתוגן הזואונוטי העיקרי, בענף הלול, הגורם לתחלואה באדם כתוצאה מזיהום של ביצים, בשר עוף ומוצריו. פיתוח אמצעים ביולוגיים התורמים לבטיחות המזון ומאפשרים הקטנת השימוש בכימיקלים, המזהמים את הסביבה ופוגעים בבריאות האדם, מהווה אתגר מרכזי בארץ ובעולם. מטרות המחקר הייתה לפתח הדברה ביולוגית של סלמונלה המבוססת על חיידקים אנטגוניסטים. לצורך זה נערך סקר של תבדידים מפרש עופות עם ובלי נשאות של סלמונלה. בודדו וזוהו במעבדה חיידקים עם פעילות אנטגוניסטית כנגד סלמונלה אינפנטיס ופעילותם נבחנה במודל אפרוחים, חלקי עוף ועל גבי ביצים. בניסוי עם אפרוחים מודבקים בסלמונלה נמצאה הקטנה של כמעט שני סדרי גודל של חיידקי סלמונלה. לא נפגעה עלייה במשקל ובריאות האפרוחים. במודל של משטחי עור מזוהמים, לא נראתה פעילות משמעותית. לעומת זאת נמצאה פעילות כנגד סלמונלה על קליפת ביצים מאולחות במהלך אחסון של מעל שבוע, הן בטמפ' החדר והן במקרר. תנאי הגידול של החיידקים האנטגוניסטים השפיעו על רמת הפעילות שלהם. תוצאות הניסויים מצביעות כי שימוש בתערובות של חיידקים אנטגוניסטים שמקורם בסביבת העוף יכול להקטין את הנשאות בסלמונלה אינפנטיס במערכת העיכול של אפרוחים במשך 8 ימים לפחות. הקטנת נשאות של אפרוחים בסלמונלה יכולה להפחית את רמת הזיהום הסביבתי בלול ובכך לשפר את בטיחות כלל העופות. הטיפול היה יעיל יותר באפרוחים ואינו מתאים לטיפול במוצרי עוף. לעומת זאת, טיפול בביצים הקטין הישרדות של סלמונלה על הקליפה ויכול לתרום לשיפור בטיחותן.

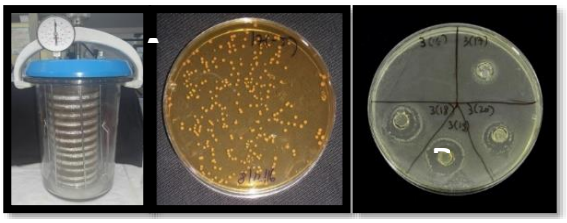
2. מבוא

השימוש באמצעים ביולוגיים לשיפור בטיחות מזון וחיי מדף תופס תאוצה בשנים האחרונות בשל הרצון להפחית את השימוש בכימיקלים המזהמים את הסביבה ועלולים לפגוע בבריאות האדם (1). בעולם נערכו מחקרים לבידוד חיידקי חומצת חלב מהעוף בעלי פעילות כנגד סלמונלה והיו מספר דיווחים על זיהוי של חיידקים פעילים (2-9). מאחר שהמיקרוביוטה של העוף תלוייה ברקע הגנטי שלו, בסביבת הגידול ובמזון אותו הוא מקבל, ניתן להניח כי גם בממשקי הגידול המקומיים ניתן יהיה לבודד ממעי העוף חיידקים בעלי פעילות אנטגוניסטית (יכולים לעכב התרבות, או לקטול) לזנים של סלמונלה הנפוצים בישראל. ריכוזם של חיידקים אלה בעוף, משתנה, ולכן השפעתם לא תמיד ניכרת. מאחר שהצפיפות בלולים גבוהה (הן בענף המטילות והן ברביה הכבדה) צפוי שזיהומי סלמונלה יתפשטו בלול ועל כן מרבית העופות יישאו את הפתוגן בדרכי העיכול. בהתאם לכך, היפותזת מחקר נוספת היא כי עופות חופשיים מסלמונלה, בלול נגוע, נושאים חיידקים אנטגוניסטים המקנים להם הגנה מהתיישבות הפתוגן.

3. מטרת המחקר

לפתח הדברה ביולוגית ע"י חיידקים אנטגוניסטים.

4. פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר



איור 1. מערכת סריקה לתבדידים בעלי פעילות אנטגוניסטית לסלמונלה. מיהולים של פרש עופות נזרעו על מצע MRS (מרכז) והודגרו באווירה אנאירובית. מושבות בודדות עם אגר (plug) ממצע MRS הונחו על מרבד חיידקי סלמונלה במצע NA והודגרו ב-37 מע"צ לבחינת הילת עיכוב.

4.1 בידוד חיידקים אנטגוניסטים לסלמונלה.

נערך סקר של תבדידים מפרש של עופות נגועים בסלמונלה כן מפרש של עופות לא נגועים בלהקות מזוהמת ונבדקה פעילותם כנגד סלמונלה אינפטיס, הסרובר הנפוץ ביותר כיום בישראל, הן בענף הלול והן בחולים. הפעילות נבדקה בתנאים ארוביים, בטמפ' של 25 מע"צ (תנאי סביבה) ו-42 מע"צ בתנאים אנארוביים ואירוביים, המדמים את הטמפ' והאווירה במערכת העיכול. בידוד החיידקים נערך על מצע MRS סלקטיבי לחיידקים לקטיים. מושבות בעלות פנוטיפ שונה, נאספו, עברו זריעת בידוד נוספת ונשמרו בהקפאה עמוקה. סריקת פעילות אנטגוניסטית לסלמונלה התבססה על שיטת Agar slab method (Dec et al.,2014). בקצרה, התבדידים הנבדקים הונחו על צלחת NA עליה פוזר מרבד של חיידקי סלמונלה והודגרו למשך 24 שעות (איור 1). בסך הכל נסרקו 1035 תבדידים, כאשר 59 הראו פעילות עיכוב כנגד סלמונלה. התבדידים עם הפעילות האנטגוניסטית החזקה ביותר, נבחרו להמשך המחקר. בנוסף, שילבנו בבדיקות גם מספר תבדידים ממקורות מזון אחרים, אשר מצאנו כי הינם גם כן בעלי פעילות אנטגוניסטית. תרביות נקיות של 12 תבדידים בעלי פעילות משמעותית כנגד סלמונלה זוהו על ידי ריצוף של הגן המקודד ל-16S rRNA והשוואה עם מאגר הרצפים ב- NCBI וכן באמצעות פרופיל חלבוני ע"י מכשיר MALDI-TOF. על מנת לוודא כי התבדידים הללו שורדים היטב במעי העוף, נבדקה העמידות שלהם למלחי מרה ול-pH נמוך ונמצא כי כולם היו עמידים לחומצה (pH-3) ולמלחי מרה (2%). לצורך בחינת פעילות אנטגוניסטית *in vivo* נבחרו התבדידים הפעילים ביותר וכן תערובות שלהם (טבלה 1). מאחר שזנים (סרוברים) שונים יכולים לזהם את הלול, נבחנה הפעילות האנטגוניסטית גם כנגד סרוברים אחרים הנפוצים בלול (טבלה 2). פעילות עיכוב דומה, או גבוהה יותר, נצפתה כנגד כל הסרוברים שנבדקו.

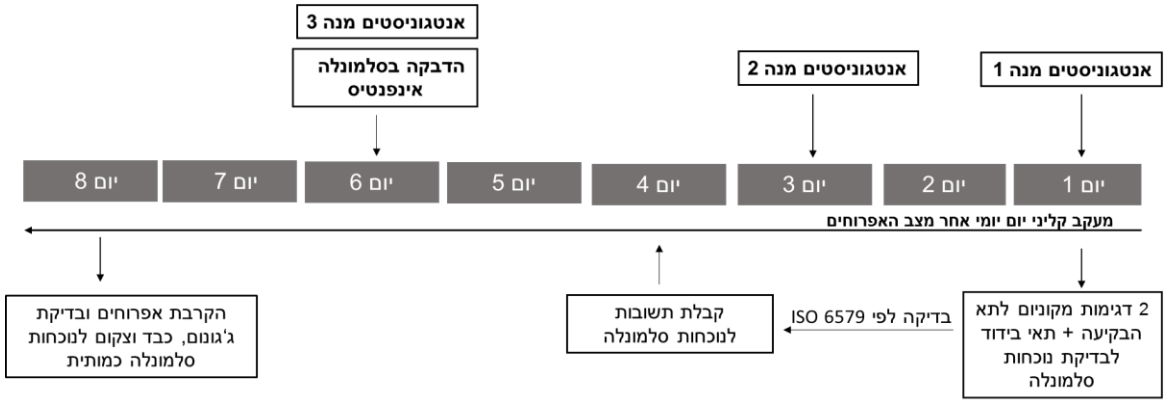
4.2 יישום אמצעי בקרה ביולוגית להפחתת נגיעות בסלמונלה בלול.

פעילות החיידקים האנטגוניסטים על נשאות של סלמונלה באברים שונים של אפרוחים נבדקה ב-4 סדרות ניסויים באפרוחי SPF (specific-pathogen-free) , כמתואר באיור 2.

טבלה 1. רשימת תבדידים פעילים והרכב התערובות ששמשו בניסויים השונים.

תבדיד	מקור בידוד	עיכוב סלמונלה (מ"מ)	תערובות*							
			Mix1	Mix2	Mix3	Mix4	Mix5	Mix6	Mix7	Mix8
Enterococcus faecium	לשלשת פטם	13±1	+	+	+	+	+			
Lactobacillus salivarius	לשלשת פטם	17±1	+	+	+	+	+			
Lactobacillus reuteri	לשלשת מטילות	16±1	+	+	+	+	+			
Lactobacillus casei	יוגורט	15±1		+	+					
Bacillus subtilis	מזון צמחי	12±1			+	+	+		+	
B. licheniformis (BS310)	חלב	13±1			+	+			+	
Pediococcus acidilactici	עור הפטם	15±1						+		+
Bacillus coagulans	עור הפטם	16±2						+		+
Pediococcus acidilactici	עור הפטם	13±1						+		+
Weissella paramesenteroides	עור הפטם	11±1						+		+
Bacillus spp.	עור הפטם	17±2						+	+	
Bacillus spp.	עור הפטם	13±1						+	+	

* הרכב התערובות של החיידקים מסומן על ידי +.



איור 2. תרשים המתאר את פרוטוקול ניסויי ההדברה של סלמונלה באפרוחים.

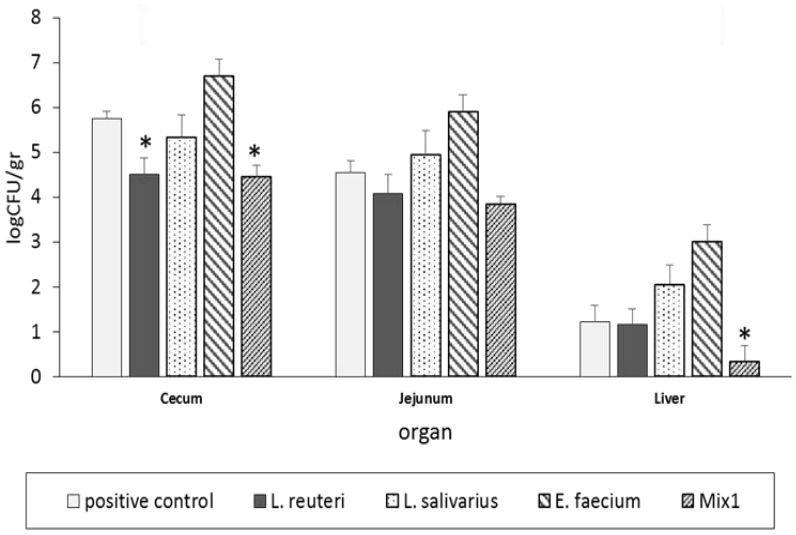
הניסוי נערך בתאי גידול מבודדים עם מערכת אוורור בלחץ חיובי, על מנת להקטין אפשרות לזיהום צולב. כל ניסוי כלל 6-7 קבוצות אפרוחים, כמפורט בהמשך. בכל קבוצה היו 12-28 אפרוחים בני יום. מהלך הניסוי בוצע כמתואר באיור 2. החיידקים האנטגוניסטים ניתנו בשלוש מנות דרך הפה, במנות של 10^7 חיידקים (CFU) ב- 250 µL תמיסת מלח (0.85% NaCl). האפרוחים הודבקו בסלמונלה אינפנטיס, דרך הפה, במנה של $5x10^5$ CFU ב-250 µL תמיסת מלח. ביום השמיני, האפרוחים הוקרבו וריכוז

הסלמונלה נבדק בצקום (מעי עיוור), בג'ג'נום (מעי ריק) ובכבד. הניסוי הראשון, כלל 6 קבוצות, מתוכן 3 קבוצות קיבלו (כל אחת) טיפול בחיידק אחד (*L. salivarious*, *L. reuteri, E. faecium*), קבוצה אחת קיבלה תערובת של שלושת החיידקים (Mix1), קבוצת ביקורת חיובית (הדבקה בסלמונלה בלבד) וביקורת שלילית (תמיסת מלח בלבד, ללא חיידקים) תוצאות הניסוי מסוכמות באיור 3. בקבוצות שקבלו Mix1 ו-*L. reuteri* חלה ירידה משמעותית ($p \leq 0.05$) בריכוז הסלמונלה בצקום ב- 1.29 ו-1.24 לוג, בהתאמה, יחסית לקבוצת הביקורת החיובית. הטיפול ב-Mix1 הקטין את אירועי הזיהום בכבד ב43% ביחס לביקורת החיובית.

טבלה 2. פעילות עיכוב של תבדידים נבחרים כנגד סרוברים שונים של סלמונלה.

Salmonella serovar	*E. faecium*	*L. salivarius*	*L. reuteri*	*L. casei*	*B.* licheniformis	BS310
Typhimurium	13±2	17±2	15±1	15±1	12±1	13±1
Infantis	12±1	17±2	16±2	15±1	14±1	15±2
Hadar	11±1	17±2	15±2	15±2	13±2	10±1
Virchow	12±1	12±1	12±1	15±1	13±1	13±1
Enteritidis	10±1	20±2	16±1	16±1	12±1	12±2

BS310= *B.* licheniformis

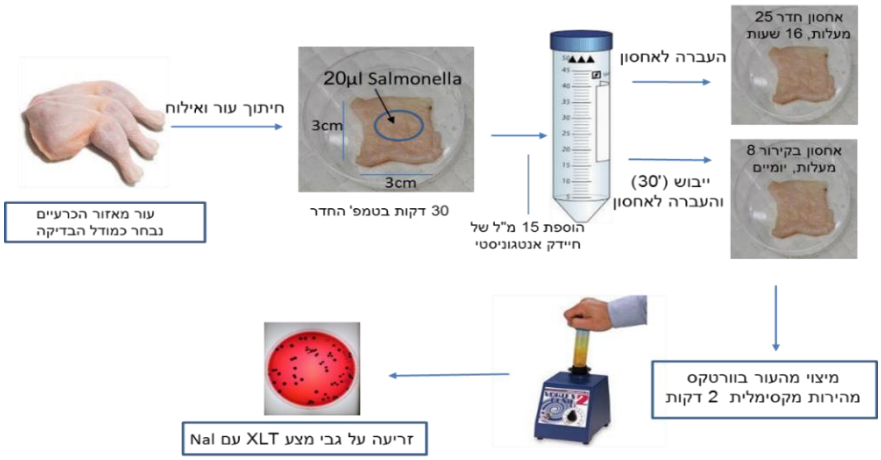


איור 3. ריכוזי חיידקי סלמונלה בצקום, ג'יגנום ובכבד בניסוי 1.

תוצאות הניסוי הראו בהשפעה חיובית של הטיפול ב- *L. reuteri* וב-Mix1 על הקטנת נשאות האפרוחים בסלמונלה אינפנטיס. לאור התוצאות של ניסוי 1 בוצעו עוד שלוש סדרות ניסויים אשר כללו תערובות של חיידקים פעילים בשילובים שונים. בנוסף לתערובת (Mix1) שהייתה הפעילה ביותר, בכל סדרות הניסויים, נמצאה עוד תערובת פעילה Mix3, אשר כללה *L. reuteri+ + L. salivarius + E. faecium +B. licheniformis+L.casei+ B. subtilis*. הטיפול ב-Mix3 הקטין את נשאות האפרוחים בסלמונלה בשני סדרי גודל לגרם רקמה בצקום ו-1.54 לוג בג'ג'נום. בנוסף, הוא מנע לחלוטין זיהום של סלמונלה בכבד.

4.3 יישום אמצעי בקרה ביולוגית להפחתת נגיעות בסלמונלה בחלקי עוף.

מהניסויים שתוארו לעיל נראה שחיידקים אנטגוניסטים יכולים להפחית את נגיעות העוף בסלמונלה, אולם אינם מסוגלים לסלק לחלוטין את החיידק. לכן, נבדקה האפשרות להשתמש בחיידקים אלה גם לטיפול במוצרי עוף, כאמצעי נוסף להקטנת זיהום של מוצרים אלה בסלמונלה. לשם בדיקת פעילות אנטגוניסטית על חלקי עוף נבחר מודל של עור אשר נלקח מכרעיים, כמתואר באיור 4.

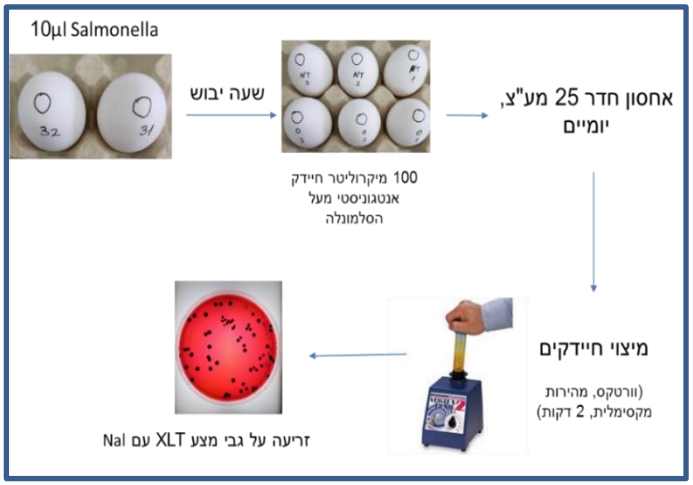


איור 4. מהלך הניסוי לבדיקת פעילות אנטגוניסטית במודל עור.

הניסויים כללו בדיקה של חיידקים בודדים וכן תערובות חיידקים. כמו כן, בודדו חיידקים נוספים מעור של עוף, אשר הייתה להם פעילות אנטגוניסטית ברורה על צלחות אגר. פעילות החיידקים נבחנה במהלך אחסון של העור למשך 16 שעות ב- 25 מע"צ, לדימוי אחסון בתנאים לא נאותים וליומיים ב- 8 מע"צ, לדימוי אחסון בתנאי צינון. החיידק *B. licheniformis* הוריד, בתנאים של אחסון בקור, 0.7 לוג במספרי הסלמונלה. שאר הטיפולים לא הראו כל השפעה.

4.4 יישום אמצעי בקרה ביולוגית להפחתת נגיעות בסלמונלה על ביצים.

ניסויים לבחינת השפעת חיידקים אנטגוניסטים על הישרדות סלמונלה על קליפות ביצים בוצעו כמתואר באיור 5. הישרדות הסלמונלה על הביצים נבחנה לאורך אחסון במקרר או בטמפרטורת החדר לאורך 12 ימים. הריכוז ההתחלתי של הסלמונלה על הביצה היה 10^3 חיידקים. בסוף זמן האחסון נשארו מעט חיידקים על הקליפה לכן, נעשו העשרות של החיידק במי פפטון לפני הזריעה. תוצאות מוצגות באחוז הביצים המכילים סלמונלה. כל ניסוי כלל עשר ביצים ונעשה בשלוש חזרות עצמאיות.



איור 5. תיאור מהלך הניסוי לבדיקת פעילות אנטגוניסטית במודל קליפת הביצה.

טבלה 3. בחינת פעילות אנטגוניסטים על קליפת ביצים לאורך אחסון במקרר ובטמפ' החדר.

זנים	תנאי אחסון	אחוז ביצים עם סלמונלה בזמנים שונים לאחר האילוח					
		1 h	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d
ללא טיפול	מקרר	100	73±12	40±10	23±13	15±5	8±8
	חדר	100	58±18	35±12	28±6	8±8	8±8
BS310 biofilm	מקרר	100	76±14	23±12	6±3	6±3	6±3
	חדר	100	66±16	46±14	23±14	11±7	8±8
MIX8	מקרר	100	43±23	33±16	16±12	0±0	0±0
	חדר	100	75±25	51±15	13±13	0±0	0±0

ניתן לראות פעילות של Mix8 הכולל תערובת חיידקים שבודדו מעור הפטם (טבלה 1), בזמנים ארוכים של אחסון (החל מיום 8), גם בחדר וגם במקרר (טבלה 3).

5.0 דיון ומסקנות

מחקרים רבים בעולם נעשו בניסיון לבודד ולהשתמש בחיידקים פרוביוטים כנגד סלמונלה (10). עם זאת, יש חשיבות לבודד חיידקים המותאמים לעופות בארץ אשר יהיו בעלי פעילות כנגד זני סלמונלה מקומיים. במהלך השנתיים הראשונות, נעשה סקר רחב של תבדידים שונים לפעילותם כנגד סלמונלה אינפנטיס, הסרובר השכיח ביותר בעוף ובחולים בישראל. סקר חיידקים אנטגוניסטיים לסלמונלה נערך גם במערכת אירובית וגם באנארובית, בשתי טמפרטורות שונות, כדי לבודד חיידקים המתאימים לשימוש כפרוביוטיקה (הזנה) וכן לשימוש סביבתי בסביבת הלול ועל מוצרי עוף. בסך הכול, מתוך למעלה מ 1000 תבדידים, נמצאו 15 תבדידים פעילים ביותר, אשר זוהו עד לרמת המין. כל התבדידים שנבחרו היו ממינים אשר מקובלים לשימוש כחיידקים פרוביוטיים בעופות (11). מאחר שבספרות דווח שתערובות של חיידקים פעילות יותר מחיידקים בודדים (12, 13), בחנו גם במחקר הנוכחי תערובות שונות של חיידקים. אכן, מצאנו שלתערובות (Mix1 ו- Mix3) יש פעילות רבה יותר (עד 2 לוג ירידה במספרי הסלמונלה) לעומת חיידקים בודדים, הן במודל אפרוחים והן על קליפת הביצה. יש לציין כי בשום מקרה לא הושג סילוק מוחלט של הפתוגן. תוצאות דומות דווחו גם בשני תכשירים פרוביוטיים FloraMax-B11 ו-Colostrum אשר הקטינו את מספר חיידקי הסלמונלה (אינפנטיס) ב-1.2 ו-0.3 לוג, בהתאמה, יחסית לקבוצת הביקורת (14). גם עבודות עם חיידקי סלמונלה מסרוברים אחרים הראו תוצאות דומות, אך לא סילוק מוחלט של הפתוגן (13, 15). מחקר ששילב ארבע חיידקים לקטים (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. fermentum*) הראה תוצאות מרשימות של ירידה במספרי סלמונלה אינפנטיס (עד 4 סדרי גודל בצ'קום) אך עדיין ללא סילוק מוחלט של הפתוגן (16).

גישה של ריבוי מכשולים (multiple hurdles) נפוצה בתחום בטיחות המזון, כאשר המוצר עובר

מספר טיפולים שכל אחד כשלעצמו אינו מסוגל לקטול את הפתוגן, אולם שילוב שלהם יכול להוביל לבקרה טובה יותר על הימצאותו במוצר. מאחר שטיפול באפרוחים לא גרם לסילוק מוחלט של הפתוגן, הוחלט לבדוק פעילות החיידקים גם על מוצרי העוף (עור הפטם) ועל ביצים, בהנחה ששילוב הטיפולים ברמות השונות יכול להוביל לבקרה טובה יותר. בניגוד להשפעה באפרוח, לא מצאנו חיידקים או תערובות אשר הורידו בצורה רבה את מספרי הסלמונלה על עור הפטם, למרות שעבדנו עם תבדידים שונים, גם מעור, אשר הראו פעילות יפה על צלחות אגר במעבדה. גם חוקרים אחרים מצאו עיכוב מועט על עור של פטם (17). במודל ביצים, מצאנו שטיפול בתערובת חיידקים, קטל את כל החיידקים על קליפת הביצה ביום ה-8 של האחסון, לעומת ביצים ללא טיפול, עליהן שרד הפתוגן לפחות למשך 12 ימי אחסון. מכיוון שביצים נשמרות בטמפרטורת הסביבה עד 16 יום ולאחר מכן עד 30 יום במקרר, תוצאות אלו חשובות ודורשות המשך מחקר, לצורך בחינת היישום. יש לציין, כי השפעת הטיפול של קליפת הביצה בחיידקים אנטגוניסטים הוא ממצא לא צפוי, שכן בסביבה יבשה לא צפויה התרבות ופעילות של החיידקים. ממצאים אלה דורשים לפיכך המשך המחקר ולימוד של מנגנוני פעולה אפשריים.

<u>מסקנות ולקחים</u>

1. קיימים בסביבת העוף חיידקים פרוביוטים עם פעילות אנטגוניסטית לסלמונלה.
2. חיידקים אנטגוניסטים לסלמונלה אינפנטיס יכולים להפחית באופן משמעותי (2 סדרי גודל) את הנשאות של החיידק באפרוחים, אך אינם מסוגלים לסלק אותו לחלוטין.
3. יהיה צורך לבחון את השפעת חיידקים אנטגוניסטים גם על נשאות העוף בסרוברים שונים של סלמונלה.
4. יהיה צורך להרחיב את הניסויים ולבחון את יעילות הטיפול גם בלולים מסחריים של פטמים ומטילות, לבחון את בטיחות השימוש בתכשירים ולפתח פורמולציות שיאפשרו חיי מדף ארוכים ויישומם בלול, כתוסף תזונה.
5. טיפול בחיידקים אנטגוניסטים בחלקי עוף ועל ביצים הינו פחות יעיל בהפחתת מספר חיידקי הסלמונלה.

6. ביבליוגרפיה

1. Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Gardini, F., & Lanciotti, R. 2015. Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends Food Sci & Technol*. 46 (2B):302-310.
2. Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., de Vuyst, L., 2006. Kinetic analysis of the antimicrobial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol. 157:241–247.

3. Lima, E. T., Filho, R. L. A., Okamoto, A. S., Noujaim, J. C., Barros, M. R., Crocci, A. J. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. Can. J. Vet. Res. 71:103–107.
4. Nouri, M., Rahbarizadeh, F., Ahmadvand, D., Moosakhani, F., Sadeqzadeh, E., Lavasani, S., Vishteh, V. K. 2010. Inhibitory effects of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus crispatus* isolated from chicken gastrointestinal tract on Salmonella enteritidis and E. coli growth. Iranian J. Biotechnol. 8:32–37.
5. Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., De Buck, J., Vancanneyt, M., Swings, J., Herman, L., Heyndrickx, M. 2007. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. J. Appl. Microbiol. 102:1095–1106.
6. Yamazaki, M., Ohtsu, H., Yakabe, Y., Kishima, M., Abe, H. 2012. *In vitro* screening of lactobacilli isolated from chicken excreta to control *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium. Br. Poult. Sci. 53:183–189.
7. Sakaridis I., Soultos N., Dovas C.I., Papavergou E., Ambrosiadis I., Koidis P. 2012. Isolation and identification of lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against Salmonella spp. and *Listeria monocytogenes*. Anaerobe. 18:62–66.
8. Dec, M., Puchalski ,A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. 2014. Screening of Lactobacillus strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. Poult Sci. 93:2464-72.
9. Noohi, N., Ebrahimipour, G., Rohani, M., Talebi, M, Pourshafie, M.R. 2016. Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of Pediococcus species isolated from broiler chickens. Br Poult Sci. 57:317-323.
10. Tellez, G., Pixley, C., Wolfenden, R.E., Layton, S.L., Hargis, B.M. 2012. Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. Food Res Int. 45:628-633.
11. Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. 2016. *Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation*. FAO. http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf
12. Chapman, C.M., Gibson, G.R., Rowland. I. 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? Eur J Nutr. 50:1–17.
13. Carter, A., Adams, M., La Ragione, R.M., Woodward, M.J. 2017.Colonisation of poultry by *Salmonella* Enteritidis S1400 is reduced by combined administration of *Lactobacillus salivarius* 59 and *Enterococcus faecium* PXN-33. Vet Microbiol. 199:100-107.
14. Schneitz, C., Koivunen, E., Tuunainen, P., Valaja, J. 2016. The effects of a competitive exclusion product and two probiotics on *Salmonella* colonization and nutrient digestibility in broiler chickens, J Appl Poult Res. 25(3):396:406.
15. Wang, L., Li, L., Lv, Y., Chen, Q., Feng, J., and Zhao, X. 2018. *Lactobacillus plantarum* restores intestinal permeability disrupted by *Salmonella* infection in newly-hatched chicks. Sci. Rep. 8(1):2229.
16. Chen CY, Tsen HY, Lin CL, Yu B, Chen CS (2012) Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the *Salmonella* invasion and inflammation of broiler chicks. Poult Sci 91: 2139–2147.
17. Sakaridis, I., Soultos, N., Batzios, C., Ambrosiadis, I., and Koidis, P. 2014. Lactic acid bacteria isolated from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. and Listeria monocytogenes. Czech J. Food Sci. 32:61–68.

פרק 4. הערכת התרומה של פרש לולים לזיהום הסביבה החקלאית

חוקר ראשי: ד"ר יעל לאור (גילת, מכון וולקני). שותפים: רן אבידוב, אלי סעדי, איברהים סעדי, אילן הלחמי (מכון וולקני).

1. תקציר

זבל לול עלול להוות נטל כלכלי, תברואתי וסביבתי, אם אינו מנוצל באופן מיטבי או שאינו מטופל כראוי. מטרת המחקר הינה הערכת קצבי הדעיכה של סלמונלה בתנאים רלוונטיים לתהליכי ייצוב וקומפוסטציה של זבל לול, המיועד ליישומים בחקלאות ובהערכת השרידות של החיידק בקרקע. ניסויי הדגרה בחנו את ההשפעה של שלושה גורמים עיקריים, טמפרטורה, תכולת מים ו- pH, על קצב הדעיכה של סלמונלה, ובנוסף את השפעתם של תנאי האוורור, פליטת אמוניה ומצבי ייבוש והרטבה. הטמפרטורה מתבררת כגורם ראשי, אך גם הבדלים ב- pH ותכולת המים יכולים להאריך את הזמן הדרוש לקטילה. כאשר הקטילה היא תרמית (50-60°C), לא נצפה גידול מחדש באף אחד מהתנאים שנבחנו בניסויי ההדגרה. בטמפרטורות מזופיליות התקבלו עדויות לאפשרות של גידול מחדש במהלך הייצוב בתנאים של ייבוש והרטבה. כאשר הטמפרטורות אינן מתאימות לקטילה תרמית, צפויים להשפיע מנגנונים אחרים על קטילת הסלמונלה, כולל פעילות אנטגוניסטית של חיידקים שמקורם בזבל. מניסוי הקרקע עולה שכאשר מיישמים לקרקע זבל\קומפוסט מאולח, יש חשש לשרידות סלמונלה לתקופה העולה על 90 יום וחשש מגידול מחדש במצבים של ייבוש והרטבה.

2. מבוא

זבל לול, הכולל לשלשת, חומר רפד (נסורת) ונוצות, עלול להוות נטל כלכלי, תברואתי וסביבתי, אם אינו מנוצל באופן מיטבי או שאינו מטופל כראוי (1). כ- 1.9 מיליון מ"ק זבל לול מיוצרים מידי שנה בישראל. עיקר הזבל מגיע משלוחת הפטם (כ- 1.3 מיליון מ"ק לשנה). כ- 3% מכמות זו, עובר תהליך פסטור להזנה במתקן מרכזי ועוד כ- 10% עוברים ייצוב במתקן קומפוסטציה מרכזי (2). שאר הזבל מיושם ככל הנראה ישירות מהלול בשדות ובמטעים, כתוסף אורגני בעל ערך הזנתי גבוה. אולם, יישום חקלאי של זבל לול לא מטופל עלול ליצור מפגעי ריח וזבובים ועלול להעביר סיכונים תברואתיים. התפרצויות חוזרות של זני סלמונלה שונים בשלוחות הלול השונות (מטילות, פטם והודים) בישראל ובעולם, מעלות בכל פעם מחדש את החשש מהעברת גורמי מחלה מהזבל אל השדה ואל גידולים הנאכלים כמזון טרי. חלק זה של המיזם עסק בהערכת התרומה של זבל לול לזיהום הסביבה החקלאית. במסגרת זו התמקדנו בסיכונים שבהפצת סלמונלה מענף הלול, דרך בחינת חלופות טיפול אפשריות (קומפוסטציה של הזבל או ייצוב הזבל בערימה סטטית בשדה) ועד לשלב היישום בקרקע. סיכויי השרידות של גורמי מחלה בזבל ולאחר מכן בקרקע, תלויים בגורמים שונים, ביניהם: טמפרטורה, תכולת מים, pH, תנאי אוורור ותחרות עם מיקרואורגניזמים אחרים. ככל שנבין טוב יותר את יחסי הגומלין בין מכלול הגורמים אשר יכולים להשפיע על שרידות סלמונלה בזבל ובקרקע, כך נוכל לחזות טוב יותר את הסיכון בהפצתם של גורמי מחלה מהלול אל הסביבה החקלאית.

3. מטרות המחקר

1. הערכת שרידות וגידול מחדש של סלמונלה בזבל לול (מאולח), בתנאי הדגרה מעבדתיים ובסימולציות עם ריאקטורים מבוקרים
2. מיפוי השונות בזמן ובמרחב של גורמי סביבה בערימה סטטית ובשרוול קומפוסטציה סגור עם אוורור מאולץ
3. הערכת ההסתברות לשרידות סלמונלה בקרקע עם תוסף זבל או קומפוסט זבל לול מאולח

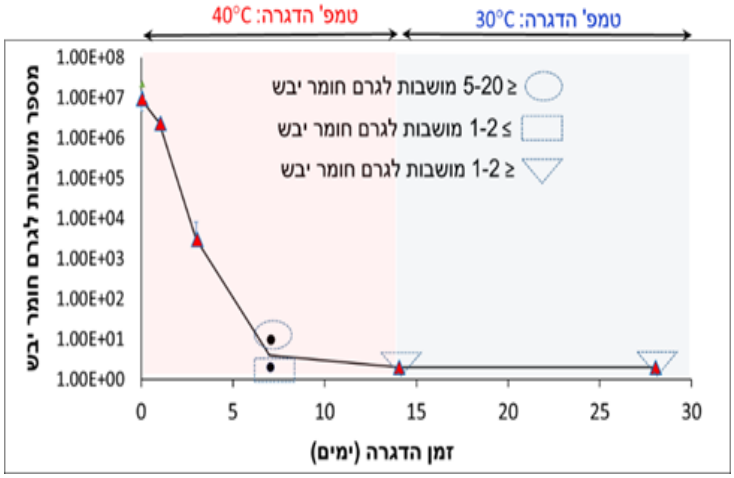
4. פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

4.1 <u>שרידות סלמונלה במהלך אינקובציה של זבל לול בתנאי סביבה שונים</u>

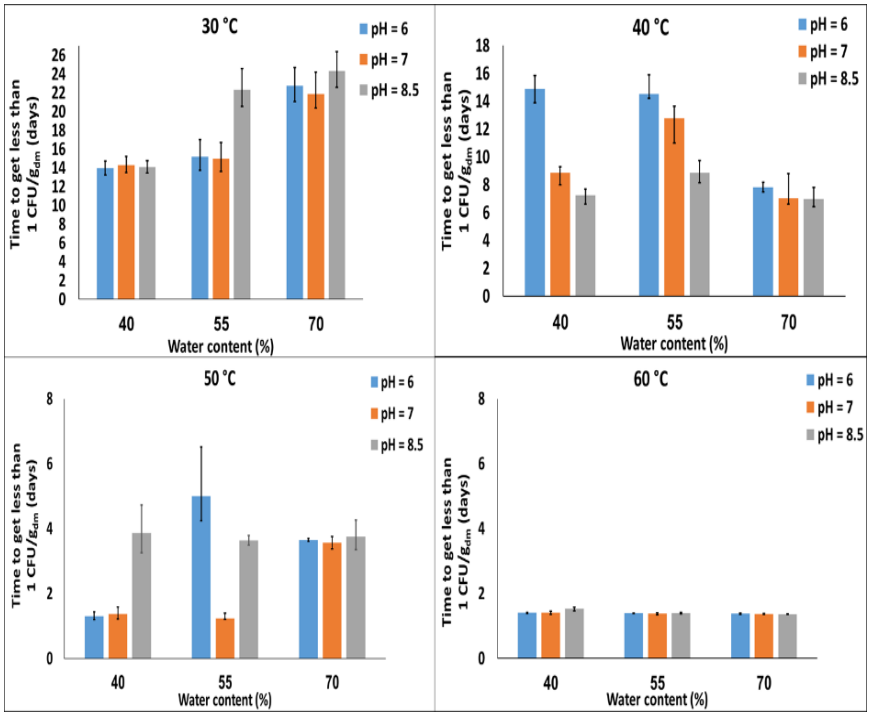
על מנת לבצע בחינה שיטתית של שרידות סלמונלה בזבל לולי פטם בתנאי סביבה שונים, בוצעה סדרת ניסויים הבוחנת את ההשפעה של שלושה גורמי סביבה: טמפרטורה (30, 40, 50 60°C), תכולת מים (40, 55 ו- 70%) ו- pH התחלתי (6, 7 ו- 8.5). כל הגורמים הוצלבו ביניהם במטריצה מלאה של 36 טיפולים. תנאים אלו נבחרו על מנת לייצג את השונות והדינמיקה של התנאים הפיסיקו-כימיים במהלך ייצוב ו\או קומפוסטציה של זבל לול עד ליישומו בשדה. סדרת ניסויים זאת בוצעה באינקובטורים בסקלה מעבדתית. לצורך ביצוע המחקר השתמשנו בתבדיד קליני של סלמונלה אינפנטיס (S. Infantis) אשר בודד בישראל, המכיל פלסמיד המקנה לו עמידות רחבה לאנטיביוטיקה (ממעבדתו של אוהד גל-מור). תכונה זו של החיידק אפשרה מעקב בכלים של מיקרוביולוגיה קלסית - ספירות על גבי צלחות עם מצע סלקטיבי בתוספת קוקטייל של סוגי אנטיביוטיקה שונים שאליהם החיידק עמיד. הזבל אולח מראש בריכוז ידוע של סלמונלה (כ- 1E7 מושבות לגרם חומר יבש, dry matter, dm) והועבר להדגרה בתנאים מבוקרים. תכולת המים בזבל הלול נבדקה במהלך ההדגרה וכמות המים הושלמה על מנת לשמור על התנאים ההתחלתיים (40, 55 ו- 70%). כל טיפול בוצע בשלוש חזרות. במהלך השבועיים הראשונים של ההדגרה בכל התנאים, ריכוז הסלמונלה דעך אל מתחת לסף גילוי (1-2 מושבות לגרם חומר יבש; לאחר פרוצדורת העשרה עם בופר פפטון). איור 1 מדגים את התוצאות של אחד הטיפולים (40°C, pH 7, ו- 40% רטיבות). לאחר ההדגרה בטמפרטורת היעד (30, 40, 50, או 60°C), הועברו הכלים להדגרה בטמפ' סביבה (30°C) על מנת להעריך את הפוטנציאל של גידול מחדש של חיידקים ששרדו בריכוזים נמוכים מסף גילוי.

באופן דומה התקבלו תוצאות עבור כל 36 הטיפולים וחושבו מקדמי קצב הדעיכה האקספוננציאנלי בכל אחד מהם. מתוך קבוע הקצב חושב משך הזמן הנדרש לקטילה בכל אחד מהתנאים ($n<1$ CFU/g_{dm}) עבור ריכוז התחלתי של 1E7 CFU/g_{dm}. כלל התוצאות מלמד על כך שהטמפרטורה מהווה גורם קטילה ראשי (איור 2) ותכולת המים וה- pH הם גורמים משניים. לגבי החשש מגידול מחדש - באף אחד מהמקרים בסדרת ניסויים זו, לא נצפה גידול מחדש של סלמונלה בטמפרטורת סביבה (30°C), למעט בטיפול בו זבל הלול הודגר מראש ב- 30°C (איור 3). במקרה זה, דוגמאות עם תכולת מים התחלתית של 40 או 55% הורטבו מחדש לאחר חודש הדגרה והובאו לתכולת מים של 70%. לאחר שבועיים נוספים של הדגרה, התקבל גידול מחדש של 6 סדרי גודל.

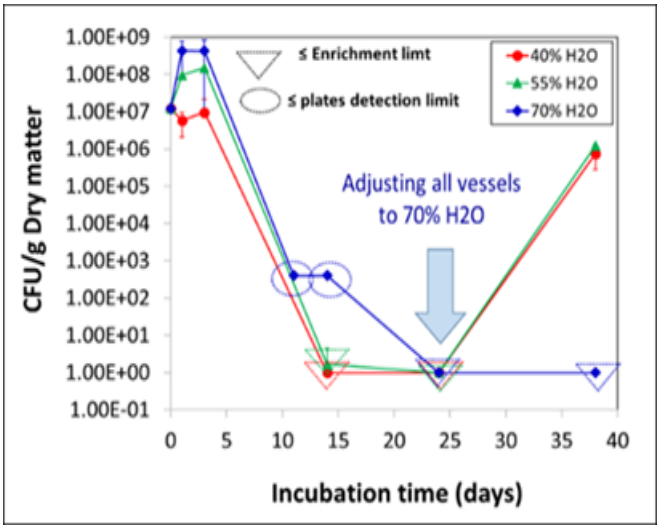
תצפית זו היא ראשונית אך משמעותית ודורשת העמקה נוספת בשל הרלוונטיות הרבה שיש למנגנוני ייבוש והרטבה על שרידות הפתוגן. האפשרות לגידול מחדש לאחר ייבוש והרטבה, מעלה את החשש ממקרים של ערימות זבל יבשות יחסית שלא התקבלו בהן טמפרטורות קטילה תרמופיליות (מעל 45°C) והורטבו לאחר מכן באירוע גשם. מעבר לכך, חשוב להדגיש את העובדה כי גם ב- 30°C וגם ב- 40°C נצפתה דעיכה של חיידקי הסלמונלה (אם כי בקצב איטי יותר) למרות שטמפרטורות אלה הן בטווח האידיאלי לגידול החיידק. קטילה לא תרמית יכולה לנבוע מנוכחות גזים או רעלנים אחרים שמקורם בזבל, או נוכחות של מיקרואורגניזמים אנטגוניסטים (חיידקים או פטריות המונעים או מעכבים את הגדילה של הסלמונלה). תוצאות ראשוניות שקיבלנו מבטלות את האפשרות שאמוניה גזית היא גורם מרכזי בקטילה לא תרמית ומלמדות על החשיבות הרבה של פעילות אנטגוניסטית כנגד סלמונלה בזבל לול. נושא זה דורש העמקה נוספת ותוצאות המחקר הנוכחי שימשו בסיס לכתיבת שתי הצעות המשך.



איור 1. דעיכת ריכוז סלמונלה במהלך הדגרה של זבל לול שאולח מראש בסלמונלה אינפנטיס בריכוז ידוע. ניתן לראות שלאחר 14 יום ריכוז הסלמונלה ירד מתחת לסף גילוי בפרוצדורת העשרה. לאחר שבועיים, החומר הועבר להדגרה של שבועיים נוספים ב- (30°C) ולא נצפה גידול מחדש של החיידק.



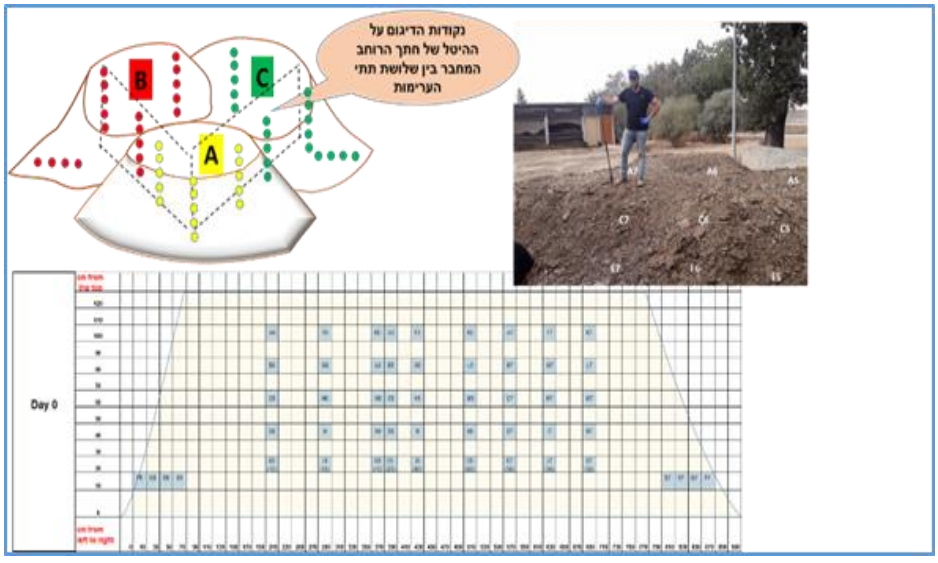
איור 2. סיכום זמני הקטילה ב- 30, 40, 50 ו- 60°C במהלך אינקובציה של זבל לול. הערכים מייצגים את הזמן שנדרש לקטילה (n<1 CFU/g_{dm}), כאשר הריכוז ההתחלתי הוא CFU/g_{dm} 1E7. מתוך התוצאות ניתן לראות לדוגמא שב- 55% רטיבות ו- pH 7 נדרשו כ- 15 ימים לקטילה בטמפרטורה של 30°C, בהשוואה ליום וחצי בלבד ב- 50 ו- 60°C. דוגמא נוספת: בטמפרטורה של 40°C, קטילת הסלמונלה היתה מהירה יותר ב- pH הגבוה יותר גם ב- 40% וגם ב- 55% רטיבות.



איור 3. דעיכת סלמונלה ב- 30°C וגידול מחדש לאחר הרטבה של הדוגמאות ל- 70% רטיבות. התופעה התקבלה עבור דוגמאות שהודגרו מלכתחילה עם רטיבות התחלתית של 40 ו- 55%.

4.2 מיפוי בזמן ובמרחב של גורמים פיסיקו-כימיים בערימה סטטית של זבל לולי פטם ובשרוול קומפוסטציה סגור עם אוורור מאולץ

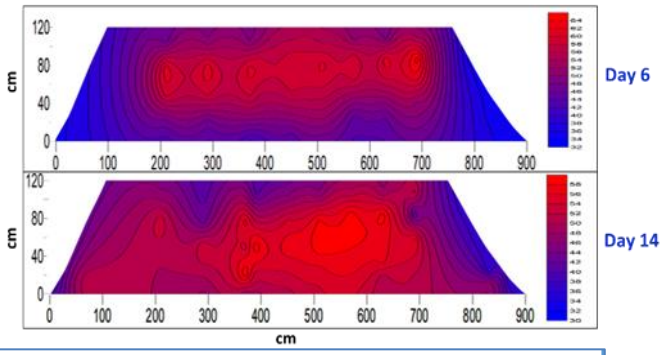
הרעיון העומד מאחורי חלק זה של העבודה הוא שמיפוי מרחבי בסקלת פיילוט\שדה של גורמי מפתח לקטילה, יאפשר חיזוי של שרידות מיני פתוגנים שונים אשר נבדקים בסקלות קטנות בתנאי מעבדה מבוקרים. לשם כך התבצע מיפוי מרחבי של גורמי מפתח בערימת זבל לול טיפוסית, המדמה את הפרקטיקה הקיימת הנפוצה בישראל (איור 4) וכן בשרוול פוליאתילן סגור עם אוורור מאולץ (3) כפרקטיקה חלופית שנחקרה על ידנו (איור 5). נפח הערימה והשרוול היה כ- 40 מ"ק כל אחד. זבל הלול התקבל מלול פטם מדגם מנהרה שבעמק יזרעאל. הניסוי הועמד במשך חודשיים וכל אחד מהגורמים הנבדקים נדגם אחת לשבוע. נדגיש כי מטרת הניסוי היתה למפות את התנאים הפיסיקו-כימיים בערימה ובשרוול. לא בוצע מעקב אחרי ריכוזי פתוגנים וכמובן שכמות זו של זבל לא אולחה במיוחד לצורך הניסוי.



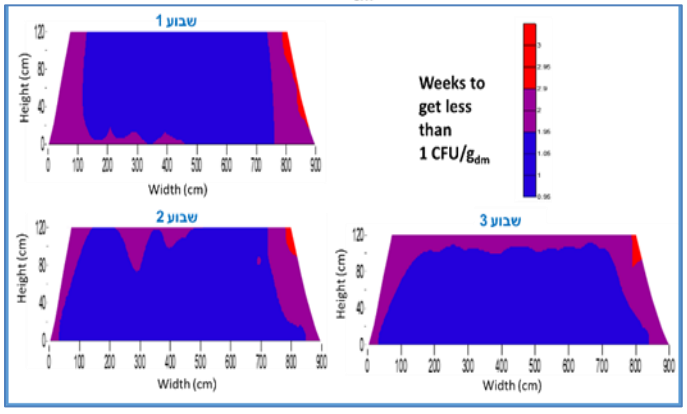
איור 4. מיפוי בזמן ובמרחב של גורמים פיסיקו-כימיים בערימת זבל סטטית.

איור 5. מיפוי בזמן ובמרחב של גורמים פיסיקו-כימיים בשרוול קומפוסט.

הגורמים שנבדקו ומופו בערימה ובשרוול הם אותם גורמים שנבדקו בהדגרה בסקלה מעבדתית (טמפרטורה, תכולת רטיבות ו- pH) ובנוסף גם ריכוזי חמצן ואמוניה בפאזה הגזית. לצורך המיפוי בוצע דיגום של השרוול והערימה במספר רב של נקודות לאורך חודשיים של ניסוי והוכנו מפות Contour בכל שלבי התהליך. איור 6 לדוגמא מתאר את תפרוסת הטמפרטורה בערימה בימים 6 ו- 14. ניתן לראות כי ישנם אזורים משמעותיים בהם אין הגעה לטמפרטורת קטילה תרמופילית (טמפרטורות נמוכות מ- 45°C). לעומת זאת, תפרוסת הטמפרטורה בשרוול (לא מוצג) מלמד על טמפרטורות גבוהות (מעל 50°C לערך) בכל נפח השרוול בשבועות הראשונים לתהליך.



איור 6. דוגמא לתפרוסת הטמפרטורה בחתך של הערימה (ימים 6 ו- 14 ממועד הצבת הערימה). ניתן לראות כי ישנם אזורים משמעותיים בהם אין הגעה לטמפרטורת קטילה תרמופילית (טמפרטורות נמוכות מ- 45°C).

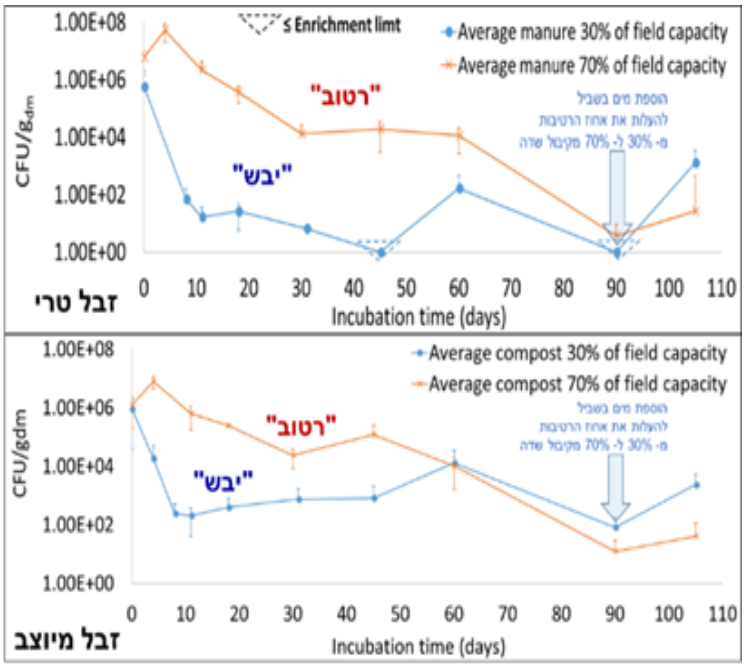


איור 7. מספר השבועות שנדרש על מנת להבטיח קטילה של הסלמונלה בערימה סטטית, אל למתחת לסף הגילוי ($n<1$ CFU/g_{dm}).

לאחר ביצוע אינטגרציה בין נתוני המעבדה (איור 2) לבין הנתונים שמופו בשדה (איור 6 לדוגמא), בוצעה הערכה של הזמן הדרוש לקטילה של הסלמונלה בשרוול ובערימה (איור 7). בשל העובדה ששולי הערימה קרים יחסית, מתקבלת ההערכה שיש להעמיד את הערימה למשך שלושה שבועות לפחות על מנת להגיע לקטילה של הסלמונלה בכל נפח הערימה.

4.3 <u>שרידות סלמונלה בקרקע לאחר יישום זבל לולים מאולח (זבל טרי או מיוצב)</u>

בוצעה הדגרה של קרקע גרומוסול מעמק יזרעאל עם זבל לול (טרי או מיוצב, 5% נפחי) שאולח מראש עם סלמונלה. התערובת הורטבה ל- 30% ו- 70% מקיבול שדה (13.5% ו- 31.5% רטיבות בהתאמה). ההדגרה היתה ב- 30°C למשך 110 ימים. תוצאות הניסוי (איור 8) מעלות את החשש שכאשר מיישמים לקרקע זבל או קומפוסט מאולח, הסלמונלה יכולה לשרוד בקרקע תקופה העולה על שלושה חודשים. בנוסף, כאשר הדוגמאות הורטבו מחדש (מ- 30% ל- 70% מקיבול שדה) התקבלה עלייה בריכוז הסלמונלה בכ- 2-3 סדרי גודל. עניין זה מתחבר גם לתוצאות שמוצגות באיור 3, כאשר מחזורי ייבוש והרטבה מגדילים את הסיכון לגידול מחדש.



איור 8. שרידות סלמונלה בקרקע שהוסף לה זבל טרי (איור עליון) או זבל מיוצב (קומפוסט) שאולחו מראש.

5. דיון ומסקנות

1. מניסוי המעבדה מתברר שהטמפרטורה מהווה גורם קטילה ראשי. ניתן לראות כי ישנה השפעה גם לתכולת המים וה- pH שיכולים להאריך את הזמן הנדרש לקטילה (n<1 CFU/g_{dm}). בטמפרטורות סביבה או תת-תרמופיליות (45°C>) ישנה ככל הנראה מעורבות של פעילות אנטגוניסטית לסלמונלה.
2. גידול מחדש של סלמונלה לאחר יבוש והרטבה, מעלה את החשש ממקרים של ערימות זבל יבשות יחסית, בהם לא התקבלו 'טמפרטורות קטילה' (מעל 45°C) והורטבו לאחר מכן באירוע גשם.
3. מיפוי התנאים בערימה סטטית (פרקטיקה קיימת), מצביע על אזורים בהם יש חשש מקטילה לא מלאה של הסלמונלה, כאשר הערימות מוצבות בשטח לתקופה של 2-3 שבועות. חשש זה לא קיים כאשר הזבל מטופל בשרוול קומפוסטציה סגור.
4. כאשר מיושם לקרקע זבל (טרי\מיוצב) מאולח, יש חשש לשרידות הפתוגן לתקופה העולה על שלושה חודשים.

6. ביבליוגרפיה

1. Wilkinson, K.G., Tee, E., Tomkins, R.B., Hepworth, G., Premier, R., 2011. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. Poult. Sci. 90, 10–18.

2. גרינהוט, צ., צדיקוב, א., פרידקין, צ., גולדפרב, א., אלמוג, ר., הדס, א., בן חיים, א., אמויאל, ר., אייזנקוט, א., קפואה, ש., 2015. תוצרי הלוואי בחקלאות. מסמך מסכם לקביעת מדיניות והערכת עלויות. משרד החקלאות ופיתוח הכפר והמשרד להגנת הסביבה.

3. Avidov, R., Saadi, I., Krassnovsky, A., Hanan, A., Medina, S., Raviv, M., Chen, Y., Laor, Y., 2017. Composting municipal biosolids in polyethylene sleeves with forced aeration: Process control, air emissions, sanitary and agronomic aspects. Waste Manag. 67, 32–42.

פרק 5. הבנת התפתחות מנגנוני עמידות לאנטיביוטיקה בסלמונלה, התפשטותם בקרב שלוחות ענף הלול בישראל ומציאת דרכים למניעתם

חוקר ראשי: פרופ' אוהד גל-מור (מרכז רפואי שיבא ואוניברסיטת ת"א). שותפים: ד"ר אמיליאנו כהן (שיבא), שלהבת עזריאל (שיבא), ד"ר מאיה כהן-דוידוביץ (משרד הבריאות, מעבדות מרכזיות).

1. תקציר

אחת התופעות המדאיגות בתחום בטיחות המזון היא הגחתם והתפשטותם של זנים עמידים לאנטיביוטיקה. מניסיון העבר התבססות של אוכלוסיות אלה בענף הלול צפויה להגיע גם לקליניקה ולהוות מקור סיכון לבריאות הציבור. בהתחשב בכך שחלק גדול מהעמידויות לתרופות אנטיביוטיות מקודד על גבי אמצעים גנטיים ניידים, הכרה ולימוד של אמצעים אלה מהווה נדבך חשוב בהתמודדות עם אתגר זה. במסגרת מיזם סל"ק קבענו את הסרוברים של המין סלמונלה אנטריקה אשר נמצאים בזיקה גבוהה בענף הלול למול הסקטור הקליני, מצאנו כי 60% מבידודי הסלמונלה בענף הלול הינם בעלי עמידות רחבת טווח. קבענו ואפיינו את תפוצתם של זנים אלה, זיהינו את המנגנונים המולקולריים האחראיים לפנוטיפ זה וזיהינו איים גנומיים חדשים שלא תוארו בעבר, האחראיים על עמידות רחבת טווח לאנטיביוטיקות.

2. מבוא

שימוש בתכשירים אנטיביוטיים בענף הלול מאפשר את הגחתם של זנים עמידים לאנטיביוטיקה המהווים איום פוטנציאלי על בריאות הציבור. כיום, לא קיים מידע בישראל על שכיחות זני הסלמונלה, מענף הלול, העמידים לאנטיביוטיקה והאם קיים קשר בין הסרובר לבין עמידות רחבת טווח. כמו כן, לא ידועים מנגנוני העמידות לאנטיביוטיקה בזנים מענף הלול.

3. מטרת המחקר

המטרה הכללית הייתה הבנת ההתפתחות של מנגנוני עמידות לאנטיביוטיקה בענף הלול ואופן תפוצתם, כדי לפתח אמצעי התמודדות יעילים. המטרות בפירוט הן:

1. קבלת תמונה אפידמיולוגית עדכנית אודות נוכחות חיידקי סלמונלה העמידים לאנטיביוטיקה בקרב שלוחות ענף הלול השונות בישראל.
2. זיהוי ואפיון המנגנונים הגנטיים המקנים עמידות בקרב חיידקי סלמונלה
3. מיפוי ואפיון הוקטורים (אלמנטים גנטיים ניידים) המשמשים פלטפורמה להפצתם של גנים לעמידות בקרב חיידקי הסלמונלה בענף הלול
4. זיהוי ואיתור מעבר אופקי של פלסמידים המקנים עמידות רחבת טווח מחיידקי סלמונלה לחיידקים אחרים.

4. פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות:

4.1 ניתוח האפידמיולוגיה של חיידקי סלמונלה בענף הלול ובסקטור הקליני בין השנים 2010-2018

השוואת תפוצת חיידקי הסלמונלה בסקטור הקליני לעומת ענף הלול הראתה כי ישנם לסרוברים רבים היארעות שונה בענף הלול למול המגזר הקליני. סרוברים אינפנטיס, קנטאקי, הדר, ניופורט ואחרים הראו תפוצה יחסית גבוהה יותר בענף הלול לעומת הסקטור הקליני, בעוד שסרוברים טיפימוריום ואנטריטידיס נפוצים יותר בסקטור הקליני לעומת ענף הלול (איור 1).

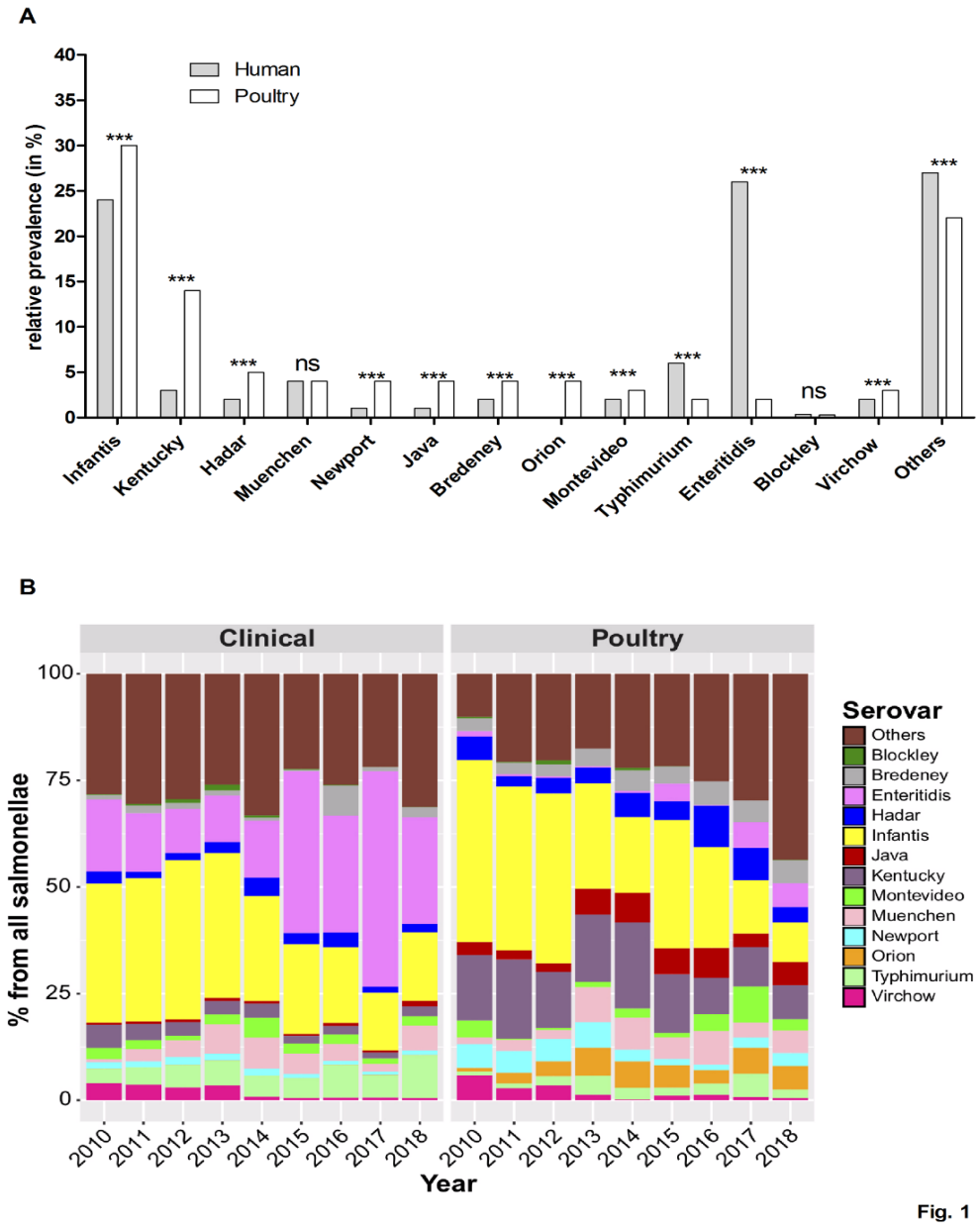
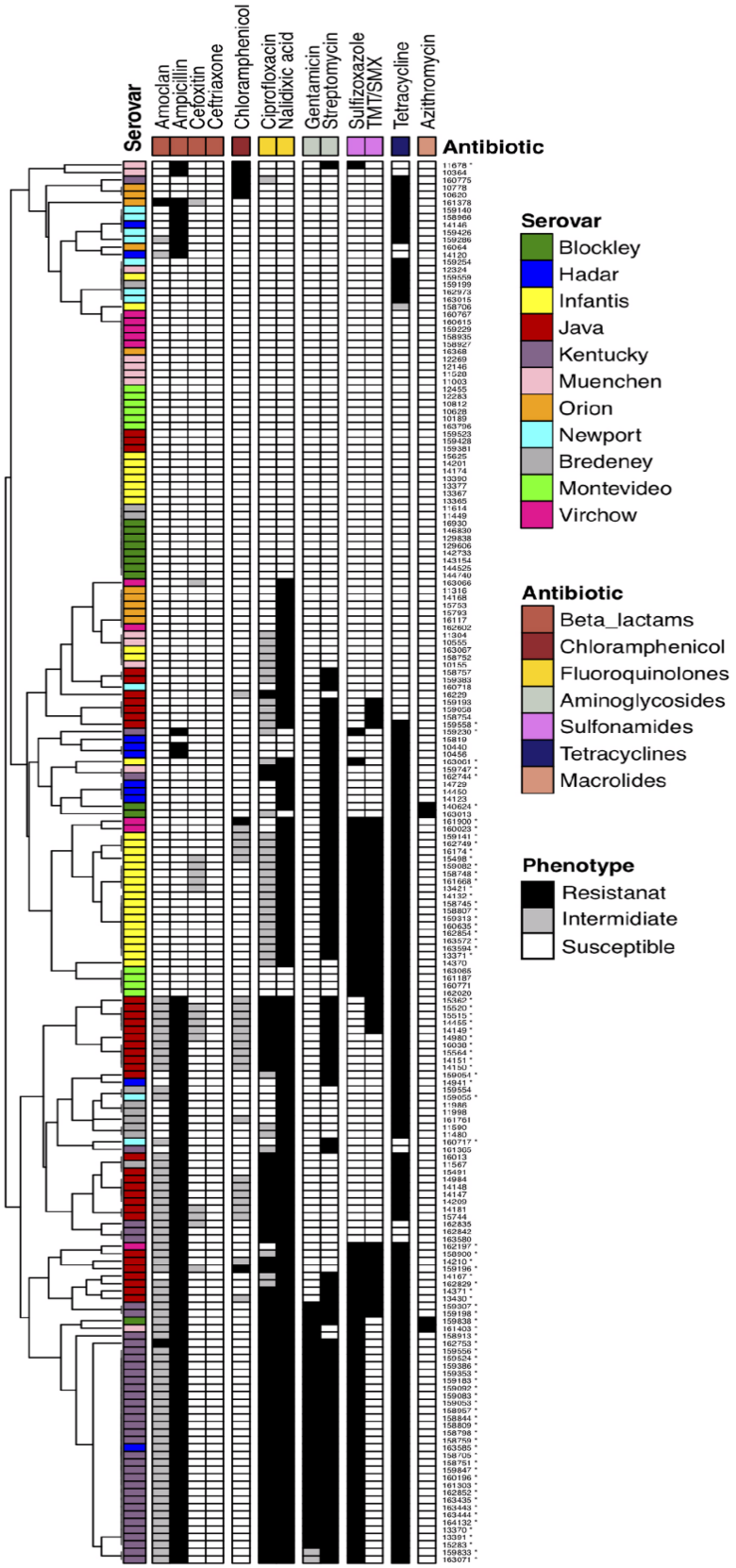


Fig. 1

<u>איור 1.</u> שכיחות של סרוברים של סלמונלה באדם ובעוף בין השנים 2010 ל-2018. בחלוקה לפי סרוברים (A) ולפי סרוברים ושנים (B).

עמידות ל13 אנטיביוטיקות נבדקה בקרב 188 בידודי סלמונלה שמקורם בענף הלול מ-11 סרוברים שונים. נמצא כי 60% מבידודי הסלמונלה שבענף הלול הינם בעלי עמידות רחבת טווח (MDR), כלומר, הראו עמידות ל 3 או יותר אנטיביוטיקות מקבוצות שונות כפי שמראה איור 2.



<u>איור 2.</u> רגישות של בידודי סלמונלה מעופות ל 13 אנטיביוטיקות שונות.

4.2 <u>קביעת המגנונים המלקולריים המקנים עמידות רחבת טווח.</u>

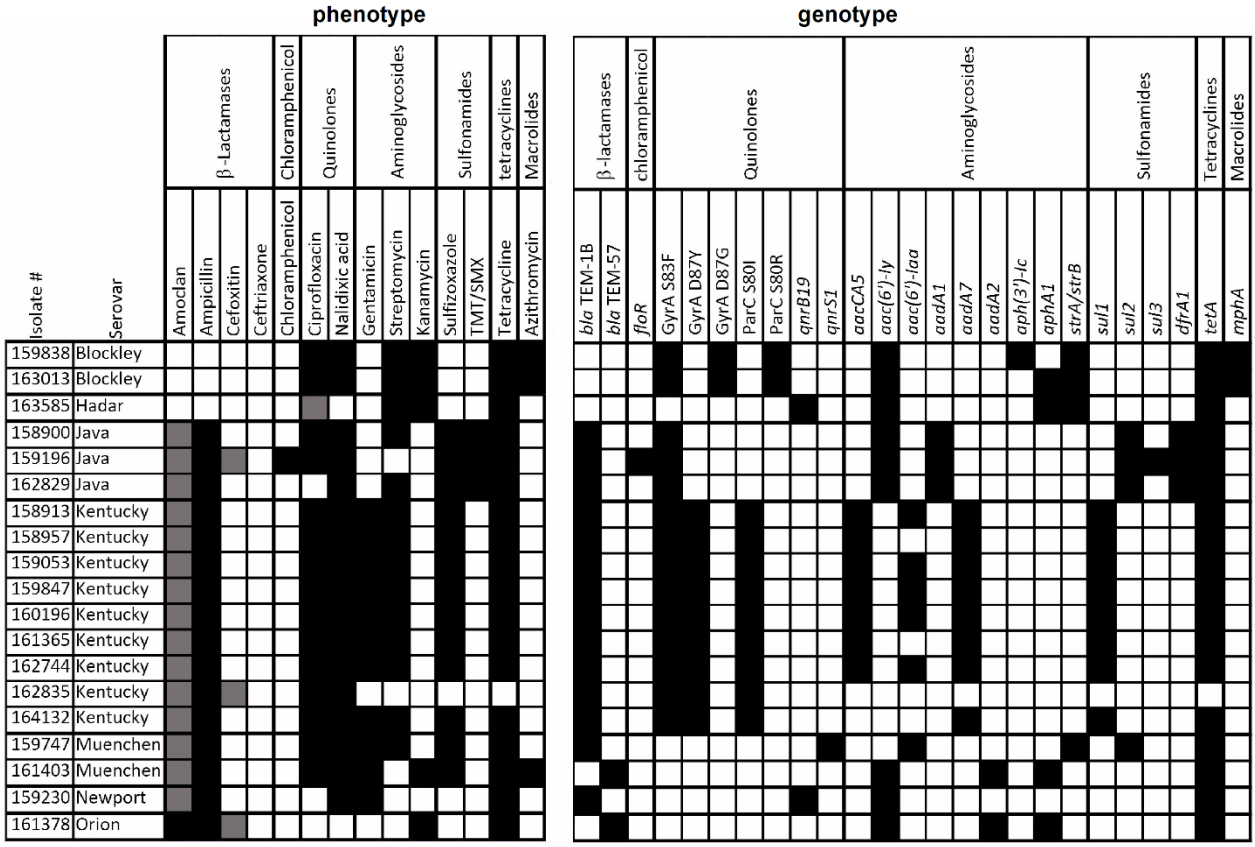
כדי לאפיין את המנגנונים המקנים את פנוטיפ ה MDR הרצף הגנומי המלא של 19 בידודי MDR נקבע במלואו. לצורך כך השתמשנו בפלטפורמת HiSeq 2500 System – Illumina שיצרה pair end reads באורך של 300 בסיסים מכל כיוון. De novo assembly של הרצפים שהתקבלו אפשר הרכבה מלאה של הגנומים בכיסוי ממוצע של ×136 במספר קונטיגים נמוך מאוד ובאיכות מצוינת כפי שמסוכם בטבלה 1. בידוד מספר 162835 ;161365;159838, רוצפו פעם נוספת בטכנולגיית ננופור באופן שאפשר סגירה מלאה של הגנום. כל 19 הגנומים שרוצפו נותחו בשני כלים חישוביים -ResFinder and CARD RGI באופן בלתי תלוי לאיתור מנגנוני עמידות גנטיים. נתונים אלה מסוכמים באיור מספר 3.

4.3 <u>אפיון פרופיל פלסמידים</u>

בשלושה מתוך 19 הבידודים איתרנו פלסמיד קוניוגטיבי גדול (~100 Kb) הנושא גנים לעמידות. באמצעות מבחני קוניוגציה הצלחנו להראות מעבר של הפלסמידים לחיידקי אי קולי, בתדירות של 1.02×10^{-2} - 7.84×10^{-3}.

טבלה 1. סיכום נתוני ריצוף גנומי של 19 בידודי MDR של סלמונלה.

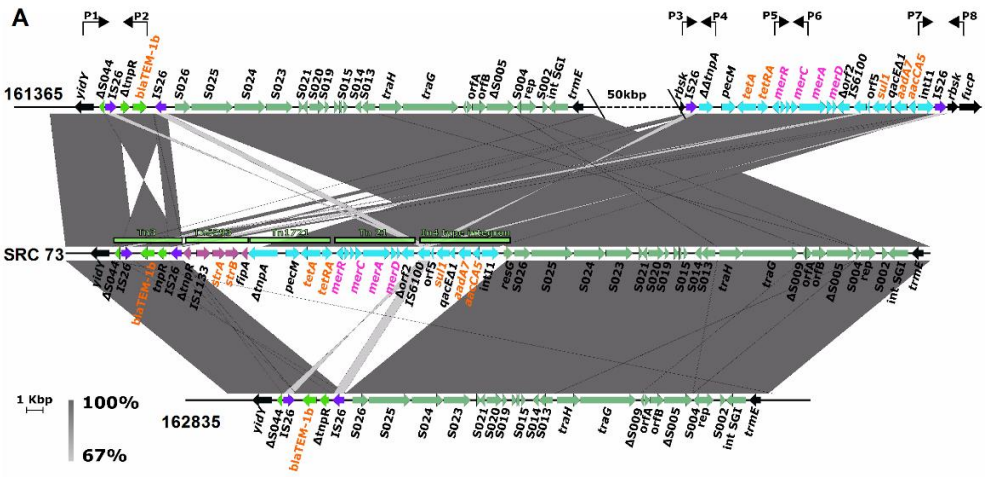
	isolate	serovar	avg read length	# reads	# of contigs >500bp	genome size	coverage (X fold)	% GC
1	158900	Java	277	1127483	52	4697604	133	52.1
2	158913	Kentucky	275	1218866	34	4816601	139.4	52.2
3	158957	Kentucky	273	1110096	32	4779596	127	52.2
4	159053	Kentucky	277	1235476	32	4811495	142.2	52.2
5	159196	Java	277	1182048	66	4793865	136.6	52.1
6	159230	Kentucky	.276	1201905	38	4796398	138.6	52.1
7	159747	Muenchen	275	1058980	28	4826353	120.6	52.1
8	159838	Blockley	276	1255096	33	4830121	143.4	52.1
9	159847	Kentucky	277	1122297	33	4858394	128	52.1
10	160196	Kentucky	275	1183218	35	4813945	135.4	52.2
11	161365	Kentucky	275	1134729	33	4858387	128.4	52.1
12	161378	Orion	277	1181090	35	4783788	136.8	52.2
13	161403	Muenchen	.276	1303348	35	4784396	150.6	52.2
14	162744	Kentucky	276	1300026	34	4820796	149.2	52.2
15	162829	Java	277	1275871	50	4702041	150.6	52.1
16	162835	Kentucky	277	1196302	29	4815285	137.6	52.1
17	163013	Blockley	277	1251189	37	4866897	142.4	52.1
18	163585	Hadar	276	1169272	32	4738543	136.4	52.2
19	164132	Kentucky	277	1182048	32	4811196	136.2	52.2
Ave			**276**	**1,194,175**	**36**	**4800300**	**136**	**52**



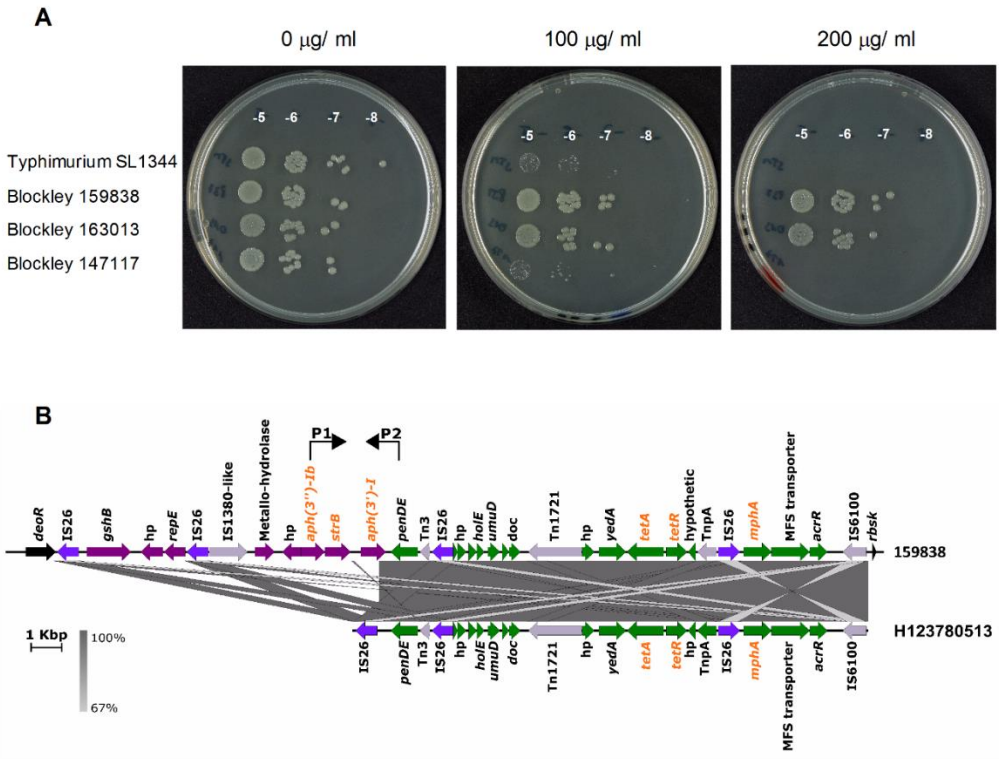
איור 3. סיכום מנגנוני עמידות בחיידקי סלמונלה, בעלי עמידות רחבת טווח מענף הלול.

4.4 <u>זיהוי ואפיון של איים גנומיים חדשים המקודדים לעמידות רחבת טווח</u>

וארינטים חדשים של *Salmonella* Genomic island 1 (SGI-1) זוהו במספר בידודים של חיידקי סלמונלה קנטאקי. איים אלה מציגים מבנה שונה מאוד מזה הידוע (איור 4), ונמצאו כבעלי יכולת ניידות בנוכחות פלסמיד מסייע מסוג IncC/I לחיידקי אי קולי רגישים בתדירות של עד 10^{-3}. בנוסף, זיהינו ואפיינו לראשונה אי חדש בחיידקי סלמונלה בלוקלי אשר מקנה עמידות לאזיטרומיצין וכן לאמינוגליקוזידים (איור 5).



<u>איור 4.</u> מבנים חדשים של האי הגנומי SGI1-K בבידודי סלמונלה קנטקי מענף הלול בישראל.



<u>איור 5.</u> זיהוי ואפיון של אי גנומי חדש בחיידקי סלמונלה בלוקלי המקנה עמידות לאיזטרומיצין ואמינוקליקוזידים.

5. דיון ומסקנות

במהלך המחקר עמדנו בכל יעדי המחקר אליהם התחייבנו ואף למעלה מזה. נקבע פרופיל העמידות ל-14 אנטיביוטיקות ל188 בידודי סלמונלה מענף הלול ונקבע הרצף הגנטי המלא של 19 בידודים. כמו כן, ניתחנו ואיפיינו ברמה הגנטית מנגנוני עמידות פוטנציאליים. בנוסף, ביצענו אנליזת פלסמידים ואפיינו את יכולת המעבר האופקי של פלסמידים ושל איים גנומיים חדשים שנמצאו בקרב בידודי ענף הלול.

<u>מסקנות והמלצות</u>

1. בידודי סלמונלה בעלי פנוטיפ MDR נפוצים בענף הלול.
2. ישנם סרוברים "מועדים לפורענות" בהם הרכב הזנים בעלי פנוטיפ MDR יכול להגיע ל-60% ומעלה.
3. לדעתנו יש בנתונים אלה להעיד על פיקוח לקוי ו/ או שימוש יתר בתכשירים אנטיביוטיים בענף הלול בישראל.
4. יש צורך במעקב סיסטמתי אחר תפוצת זנים בעלי MDR בענף הלול ולהבין את מקורם ואת כוחות הברירה אשר פועלים לשימורם ולהפצתם.
5. יש להמשיך ולמפות את הרכב האלמנטים הגנטיים הניידים המקודדים לגנים לעמידות ולעקוב אחר התפשטותם האופקית.
6. דרוש מחקר משולב ע"פ עקרונות ה- "one health" שיבדוק את השפעת המגמות במגזר החקלאי על הקליני ויאתר מעבר של זנים ושל אלמנטים גנטיים ממקורות חקלאיים לאדם.

דיון מסכם

הנחת היסוד שעמדה בבסיסו של מיזם זה היא כי מורכבות שרשרת הייצור של העוף ומוצריו דורשת גישה הוליסטית רב-מערכתית לצורך הבנת מקורות הזיהום והתמודדות עם בעיית הסלמונלה והקמפילובקטר בענף הלול. בהתאם לכך, הוקם מיזם סל"ק שמטרתו היא הפחתת הזיהומים בסלמונלה ובקמפילובקטר שמקורם בענף הלול. במיזם זה חברו חוקרים מהאקדמיה, משרד הבריאות ומשרד החקלאות, יחד עם בעלי תפקיד בתחום הרגולציה והדרכת המקצוע, במטרה להתמודד עם נושא מורכב זה באופן מערכתי ורב-תחומי. במהלך המחקר, בוצעו סדרות דיגום ב-5 לולי פטם (פעמיים, בשתי עונות שונות), 5 לולי מטילות ו-2 לולי הודים. בכל הלולים שנבדקו נמצאו חיידקי סלמונלה בלולים הלא מאוכלסים ובשיעור גבוה יותר בלולים לפני שיווק. נמצאו מקורות סביבתיים לזיהום סלמונלה בכל לולי הפטם וההודים ובמרבית לולי המטילות. מקורות אלה כללו בוץ, סוליות נעליים של עובדים, צמיגי משאיות וכן גורמים ביוטיים כמו מכרסמים. חוסר היכולת לסלק לחלוטין את חיידק הסלמונלה, בתוספת בטיחות ביולוגית לא מספקת והאפשרות של העברה אנכית של הפתוגן, מאפשרות לחיידק לחדור שוב ושוב למבנה הלול ולזהם את העופות. יהיה צורך בריצוף גנומי על מנת לדעת האם אותו תבדיד שנמצא לפני אכלוס אחראי להדבקה של הלול לאחר האכלוס ולקראת השיווק. בכל מקרה, המצאות מקור יציב לזיהום סלמונלה בתוך או מחוץ למבנה הלול הינה בעיה משמעותית בממשק הלול ויש מקום לשיפור פרוטוקולי הניקיון של הלול וסביבתו, כמו גם על הקפדה טובה יותר על בטיחות ביולוגית בממשק הלולים. השינוי בסרוברים שנצפה, בעיקר בין עונות ובין סביבות חיים שונות, כמו בהודים שמתניידים מבית האימון לסככות, מעידים על משמעות לעונתיות ולגיאוגרפיה על שכיחות הסרוברים של סלמונלה.

בניגוד לממצאים לגבי סלמונלה, לא נמצאו מקורות חיוביים לקמפילובקטר לפני אכלוס בלולי הפטם. מעקב אחר דינמיקת ההתפשטות של קמפילובקטר בלולי פטם והודים לבשר הראה כי האפרוחים מגיעים ללא החיידק ובמהלך הגידול מופיע החיידק, בחלק מהלולים, ומגיע לרמת נשאות של 90% ויותר. פטמים מלולים שהגיעו למשחטה נקיים מהפתוגן, נמצאו מזוהמים בסיום התהליך, מה שיכול להעיד על זיהום צולב במשחטה. מעקב אחר מספר חיידקי הקמפילובקטר, בשלבים שונים לאורך שרשרת העיבוד במשחטה, הראה ירידה משמעותית במספר החיידקים בתהליך ההמלחה (הכשרה) ולכן מחזק את התרומה של ההמלחה להקטנת זיהומי הפטם בקמפילובקטר. יחד עם זאת, במרבית הבדיקות, טבחות העוף עדיין היו מזוהמות בפתוגן גם בסיום תהליך העיבוד.

לצורך הבנת מקור ההדבקה וההתפשטות של קמפילובקטר בלול ובחינת מעבר אפשרי לאדם, בוצע ריצוף גנומי של תבדידי *C. jejuni* מסקר לולים קודם שנערך ע"י מועצת הלול וכן מתבדידים שבודדו במחקר הנוכחי. סה"כ נערכה אנליזה ביואינפורמטית על רצפי גנום של 125 תבדידים שונים מלולים שונים, לפני ואחרי שחיטה וכן מתבדידים שבודדו לאורך מחזורי הגידול בלול. אנליזה של whole-genome MLST הראתה שקיים מיגוון רחב של גנוטיפים, כאשר בכל לול נמצא גנוטיפ

מסוים. רצפי הגנום אפשרו לזהות גנים לאלימות במרבית התבדידים. בניגוד לממצאים, שתוארו לעיל לגבי הסוג (genus) קמפילובקטר, סיווג הזנים שבודדו, לפני ואחרי שחיטה, לא הצביע על אפשרות של זיהום צולב במהלך השחיטה. ייתכן שהסיבה לכך היא כי המין *C. jejuni* רגיש יותר ממינים אחרים של קמפילובקטר לטיפול במלח, נושא אשר יהיה צורך לבררו במחקר המשך. השוואה בין זני ה-*C. jejuni* מהעוף לזנים שבודדו מחולים בשנים קודמות, הראתה דימיון אך לא זהות ולכן לא ניתן היה לקבוע אלו גנוטיפים של *C. jejuni* עברו מהעוף לאדם ומה מקור ההדבקה המדויק (מאיזה לול). כדי לאמוד את מידת התרומה של ענף הלול לתחלואה באדם, יהיה צורך להרחיב את המחקר ולערוך סיווג בשיטת wgMLST גם לתבדידים מחולים בישראל שבודדו בתקופה מקבילה.

בניסיון למצוא טיפול להקטנת הנשאות בסלמונלה במהלך גידול העוף, בוצעה סריקה רחבה של תבדידים מפרש של עופות לא נגועים בסלמונלה ונמצאו מספר תבדידים בעלי פעילות אנטגוניסטית לסרוברים שונים של סלמונלה. לתבדידים אלה, יש פוטנציאל לשמש כתכשיר לבקרה ביולוגית של סלמונלה בלול. בחינת פעילות החיידקים האנטגוניסטים נבדקה על נשאות של אפרוחים בסלמונלה אינפנטיס, הסרובר הנפוץ ביותר, כיום, בעופות ואחד מהסרוברים הנפוץ בחולים בארץ. נמצא כי הטיפול הביולוגי הקטין את הנשאות של סלמונלה אינפנטיס בשני סדרי גודל. קידום השימוש בטיפול ביולוגי ידרוש בחינת הפעילות במודל אפרוחים גם כנגד סרוברים נוספים של סלמונלה וכן בחינת היישום בלולים. טיפול בחיידקים אנטגוניסטים בוצע גם לבחינה של הקטנת נשאות של סלמונלה בחלקי עוף וביצים, אולם השפעת הטיפולים שנבדקו על מספרי החיידקים הייתה מועטה.

מאחר שפרש לולים נגועים בסלמונלה משמש במקרים רבים למטרות דישון חקלאי, תיתכן חדירה של סלמונלה לשרשרת המזון על ידי מעבר של הפתוגן מהקרקע לצמח, כפי שתועד בספרות. כדי לבדוק את חיוניות חיידקי הסלמונלה בסביבה החקלאית, מחוץ לעוף, נערכה בדיקה של הישרדות של סלמונלה אינפנטיס בתנאי סביבה שונים במודל מעבדתי של זבל שאולח בפתוגן. כמו כן, נערך מיפוי בזמן ובמרחב של תנאי מפתח להישרדות הפתוגן בערימת פרש/קומפוסט, בכדי לחזות את משך ההישרדות הצפוי בפרקטיקה קיימת (ערימה) או חלופית (שרוול קומפוסטציה). הטמפרטורה נמצאה כגורם קטילה ראשי, אך גם הבדלים ב- pH ובתכולת המים יכולים להאריך את הזמן הדרוש לקטילה של הפתוגן. כאשר הקטילה היא תרמית (50-60°C), לא נצפה גידול מחדש באף אחד מהתנאים שנבחנו. בטמפרטורות נמוכות יותר, גידול מחדש של סלמונלה לאחר יבוש והרטבה, מעלה את החשש ממקרים של ערימות זבל יבשות יחסית, בהם לא התקבלו 'טמפרטורות קטילה' (מעל 45°C) והורטבו לאחר מכן באירוע גשם. כאשר מיושם לקרקע זבל (טרי\מיוצב) מאולח, יש חשש לשרידות הפתוגן לתקופה העולה על שלושה חודשים. מוצע להתחשב בממצאים אלה, כאשר מנסחים חסמים אגרוטכניים בהקשר ליישום זבל מיוצב חלקית. בנספח המצורף לדוח זה, מובאות המלצות לגבי הקפדה על בטיחות ביולוגית בממשק העבודה בלולים וכן הצעות, למקבלי ההחלטות, לגבי הטיפול המומלץ בפרש לולים המשמש לדישון שדות.

בנוסף לזיהומי מזון העלולים לגרום לתחלואה, חיידקי סלמונלה עלולים לשאת גנים לעמידות לאנטיביוטיקה. עמידות לאנטיביוטיקה היא בעיה בריאותית גלובלית וחיידקי סלמונלה עמידים, הוכרזו על ידי ארגון הבריאות העולמי לאחרונה כאחת מקבוצות הסיכון המשמעותיות הדורשות טיפול דחוף ברמה העולמית. ידוע כיום כי גנים לעמידות לאנטיביוטיקה יכולים לעבור אופקית, בתוך המאכסן או בסביבה, בין חיידקים שונים ולכן חשוב לאסוף מידע על עמידות לאנטיביוטיקה גם בחיידקי סלמונלה. סקר עמידות ל-13 אנטיביוטיקות בעלות רלוונטיות קלינית, שנערך בקרב 188 בידודי סלמונלה מענף הלול מ-11 סרוברים שונים, העלה כי כ- 60% מבידודי הסלמונלה בענף הלול הינם בעלי עמידות רחבת טווח, כלומר עמידים לשלוש אנטיביוטיקות או יותר. הגנים המקודדים לעמידות זוהו ע"י ריצוף גנומי של 19 תבדידים. נמצאו ואופיינו שני איים גנומים חדשים וניידים המקנים לחיידק עמידות רחבת טווח. מספר סרוברים, כמו אינפנטיס וקנטאקי, מאופיינים בתדירות גבוהה במיוחד של תבדידים בעלי טווח עמידות רחב. ניסויי טרנספורמציה הדגימו העברה של עמידויות בין סרוברים שונים של סלמונלה ובין סלמונלה לא. קולי.

לסיכום, במיזם זה חברו, לראשונה בישראל, חוקרים מתחומי ידע ומחקר שונים, יחד עם אנשי מקצוע ממועצת הלול, משרד החקלאות ומשרד הבריאות, בניסיון לרכז מאמצים, בגישה הוליסטית של one-health, לצורך הבנה ושיפור ההתמודדות עם סלמונלה וקמפילובקטר בענף הלול. ממצאי המחקר תרמו להבנה טובה יותר של מקורות הזיהום בשני הפתוגנים ויישום המסקנות מעבודה זו יוכל לתרום להקטנת נגיעות סלמונלה בלולים. עם זאת, היבטים מסוימים לא נחקרו בעבודה זו, בשל מגבלה תקציבית ויש להם מקום במחקרי המשך. שאלות רבות שעלו במהלך המחקר ובמיוחד, בנושא מקור הזיהום בקמפילובקטר ידרשו מחקר נוסף. אנו מאמינים כי יישום והתייחסות רב-מערכתית לממצאי המיזם יגבירו את הבנתנו לגבי השפעת הזיהומים בענף הלול על בריאות האדם ויובילו להפחתת נגיעות העופות בסלמונלה ובקמפילובקטר ובכך יתרמו לשיפור בטיחות המזון בישראל.

ביבליוגרפיה

1. Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris Jr, J. G. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Protect*, 2012*; 75*(7): 1292-1302.
2. Batz, M. B., Hoffmann, S., & Morris Jr, J. G. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J Food Protec* 2012; *75*(7): 1278-1291.
3. Batz MB, Henke E, Kowalcyk B. Long-term consequences of foodborne infections. *Infect Dis Clin North Am* 2013; 27:599-616.
4. Platts-Mills JA, Kosek M. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27:444-450.
5. EFSA, ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015; 13(1):3991, 162 pp.. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal. 2015.
6. Crim SM, Iwamoto M, Huang JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist AB, Cartter M, Tobin-D'Angelo M, Blythe D, Smith K, Lathrop S, Zansky S, Cieslak PR, Dunn J, Holt KG, Lance S, Tauxe R, Henao OL, Centers for Disease Control and Prevention. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63:328-332.
7. Epps SV, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10:6292-6304.
8. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States- major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:7–15.
9. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M & Tauxe, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 607.
10. Weinberger M, Yaron S, Agmon V, Yishai R, Rosenberg A, Peretz C. Curtailed short-term and long-term survival following infection with non-typhoid *Salmonella* in Israel. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2):278-84.
11. Zaidenstein R; Peretz C; Nissan I; Reisfeld A; Yaron S; Agmon V; Weinberger M. The epidemiology of extraintestinal non-typhoid *Salmonella* in Israel: the effects of patients' age and sex. *Euro J Clin Microbiol & Infect Dis*. 2010; 29(9):1103-09.
12. Metzer, E., V. Agmon, N. Andoren, and D. Cohen. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type DT104 among *Salmonella* causing enteritis in Israel. *Epidemiol Infect*. 1998; 121(3): 555–559
13. Gal-Mor, O., L. Valinsky, M. Weinberger, S. Guy, J. Jaffe, Y.I. Schorr, A. Raisfeld, V. Agmon, I. Nissan. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:1754-7
14. Jore, S., Viljugrein H., Brun E., Heier B.T., Borck B, Ethelberg S, Hakkinen M, Kuusi M, Reiersen J, Hansson I, Engvall EO, Lofdahl M, Wagenaar JA, van Pelt W, Hofshagen M. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev Vet Med* 2010; 93:33-41.
15. Weinberger, M., Lerner L, Valinsky L, Moran-Gilad J, Nissan I, Agmon V, Peretz C. Increased incidence of *Campylobacter* spp. infection and high rates among children, Israel. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:1828-1831.
16. Weinberger M, Moran-Gilad J, Rokney A, Davidov Y, Agmon V, Peretz C, Valinsky L. Molecular epidemiology of Campylobacter jejuni infection in Israel—a nationwide study. *Clin Microb Infect*. 2016; 31;22(12):1005-e9.
17. Wiseman A, Berman E, Marantz B, Masury E, Maman O, Pirak M. Baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler intestines and on broiler carcasses in Israel (2015-2016). WPSA Israel annual confrence Jerusalem 2016.

רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים

Oazana, S., Naor, M., Grinshpun, J., Halachmi, I., Raviv, M., Saadi, I., Avidov, R., V. Sudharsan Varma, Rosenfeld, L., Gross, A. & Laor, Y. (2018). A flexible control system designed for lab-scale simulations and optimization of composting processes. *Waste Management*. 72, 150-160.

Cohen, E., Davidovich, M., Rokney, A., Valinsky, L., Rahav, G., & Gal-Mor, O. 2019. Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multidrug-resistant *Salmonella enterica* in poultry. *Environmental microbiology*. Nov 12. PMID: 31715658

Avidov, R., Varma, V.S., Saadi, I., Khoury, O., Kfir, R., Hanan, A., Medina, Sh., Lublin, A., Chen, Y., Laor, Y. Mechanisms of Salmonella eradication in broiler litter during stabilization and composting processes and following soil application. *In preparation*

Avidov, R., Varma, V.S., Saadi, I., Khoury, O., Chen, Y., Laor, Y. Assessing *Salmonella* survival in broiler litter during stockpiling and composting through spatial distribution of process parameters. *In preparation*

Avidov, R., Varma, V.S., Saadi, I., Hannan, A., Yoselevich, I., Lublin, A., Chen, Y., Laor, Y.Mass reduction, physical transformation, and air emissions during composting of chicken parts and broiler litter under controlled conditions. *In preparation*

הפצת הידע בכנסים

לאור, י., אבידוב, ר., V. Sudharsan, Varma, סעדי, א., חורי, א., מדינה, ש., חנן, א., חן, י. שרידות סלמונלה במהלך ייצוב וקומפוסטציה של זבל לולים. הרצאה מוזמנת במסגרת יום העיון של האגודה למדעי העופות. 5 במרץ 2019, בית דגן.

אבידוב, ר., סעדי, א ., V. Sudharsan, Varma, חורי, א., רונן, כ., חנן, א., מדינה, ש., לובלין, א., חן, י., לאור, י. 2019. שרידות סלמונלה במהלך ייצוב וקומפוסטציה של זבל לולים. עיתון משק העופות, אפריל 2019, עמ' 42-47.

אבידוב, ר., סעדי, א., V. Sudharsan, Varma, חורי, א., רונן, כ., חנן, א., מדינה, ש., לובלין, א., חן, י., לאור, י. שרידות סלמונלה בזבל לולים בתהליכי ייצוב וקומפוסטציה ולאחר היישום לקרקע. הרצאה במסגרת כנס האגודה הישראלית למדעי הקרקע, 6 ביוני, 2019, אוניברסיטת בן גוריון, באר שבע.

אבידוב, ר., V. Sudharsan, Varma, סעדי, א., חורי, א., מדינה, ש., חנן, א., חן, י., לאור, י. הערכת שרידות גורמי מחלה (בדגש על סלמונלה) במהלך ייצוב וקומפוסטציה של זבל לולים. הרצאה במסגרת הועידה השנתית למדע וסביבה 18-20 ביוני, 2019, אוני' תל-אביב.

לאור, י., אבידוב, ר., סעדי, א., V. Sudharsan Varma, חורי, א, כפיר, ר., חנן, א., לובלין, א., חן, י. שרידות סלמונלה במהלך ייצוב וקומפוסטציה של זבל לולים ולאחר היישום לקרקע. הרצאה מוזמנת

במסגרת הכנס השנתי של האגודה למדע העופות, 19-18 נובמבר, 2019, תל-אביב.

V. Sudharsan, Varma, Avidov, R., Saadi, I., Khoury, O., Hanan, A., Chen, Y., Laor, Y. Assessing Salmonella survival in poultry litter during stockpiling and composting through spatial distribution of process parameters. Poster presented at the Annual Meeting of the Israel Society of Soil Science. June 6, 2019, Ben Gurion university of the negev, Israel.

A Lublin, S Mechani, I Ribstein, A Berkovitz, I Lysnyanski, I Gershman, A Behar, A Roth, M Perry Markovich, R King, S Sela and R Amitai Taub. A survey of biotic and abiotic factors in broiler and layer poultry houses for presence of *Campylobacter* and *Salmonella*, and dynamics of *Campylobacter* in the flock: preliminary findings. Israel Association for Veterinary Microbiology and Immunology (IAVMI), 2018's Annual Convention, 12/6/2018, Bet Dagan, Israel.

A. Lublin, S. Mechani, A. Berkovitz, I. Lysnyanski, I. Gershman, I. Ribstein, R. Amitai-Taub, A. Behar, A. Roth, M. Perry Markovich, R. King, S. Sela (Saldinger), D. Rish and Y. Dahan. A survey of biotic and abiotic factors in broiler and layer poultry houses for presence of *Campylobacter* and *Salmonella*, and dynamics of *Campylobacter* during growth of the flock. WPSA-Israel Branch, The 53rd Annual Convention, 26-27/11/2018, Tel-Aviv, Israel, pp. 28-29.

A. Lublin, S. Mechani, A. Berkovitz, Y. Farnoushi, I. Ribstein, I. Lysnyanski, I. Gershman, R. Amitai-Taub, A. Behar, A. Roth, M. Perry Markovich, R. King, D. Rish, Y. Dahan, Z. Geva and S. Sela. Survey of *Campylobacter* and *Salmonella* sources in poultry houses, and dynamics of *Campylobacter* in the flock. XXIst WVPAC2019, WVPA Congress, September 16-20, 2019, Bangkok, Thailand, pp 151-152.

E. Cohen, M. Davidovich-Cohen, A. Rokney, L. Valinsky, G. Rahav and O. Gal-Mor. Epidemiological and genetic characterization of multi drug resistant *Salmonella* in the poultry and the clinical sectors in Israel. Annual Meeting of the Israel Society for Microbiology (ISM) July 3-4, 2018, Ben-Gurion University.

E. Cohen, M. Davidovich-Cohen, A. Rokney, L. Valinsky, G. Rahav and O. Gal-Mor.. Epidemiological and genetic characterization of multi drug resistant *Salmonella* in the poultry and the clinical sectors in Israel. Host-Pathogen Communication Meeting November 11-14, 2018, Weizmann Institute.

E. Cohen, M. Davidovich-Cohen, A. Rokney, L. Valinsky, G. Rahav and O. Gal-Mor. Genetic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* in the poultry sectors in Israel. Department of Clinical Microbiology and Immunology Annual retreat 16.6.19, Tel-Aviv University.

E. Cohen, M. Davidovich-Cohen, A. Rokney, L. Valinsky, G. Rahav and O. Gal-Mor.. Genetic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* in the poultry sectors in Israel. The Seventh Annual Broad-ISF Symposium, July 22-24, 2019, Jerusalem.

דף מידע

עיקרי המלצות להפחתת הסיכון להפצת סלמונלה בלולים וביישום חקלאי של הפרש

ממשק לולים

1. יש לבחון ולשפר את פרוטוקולי החיטוי במבנה הלול ובסביבתו ולוודא העדר סלמונלה בטרם הכנסת אפרוחים.
2. יש לשפר את ממשק העבודה בלולים ובסביבתו על מנת למנוע זיהום צולב של הלול על ידי עובדים, כלים, כלי רכב ומכרסמים.
3. מומלץ לשקול היטב ולהפחית את השימוש באנטיביוטיקה, במידת האפשר, על מנת להפחית שכיחות של תבדידי סלמונלה בעלי טווח עמידות רחב.

יישום חקלאי של פרש לולים שלא עבר קומפוסטציה מלאה

1. כאשר הפרקטיקה היא ערימה סטטית, מומלץ על:

- כיסוי הערימה על מנת לקבל תנאים אנאירוביים למשך 10 ימים לפחות.
- בערימה פתוחה – להמתין שלושה שבועות לפחות לפני היישום.
- בעונת הגשמים – לכסות ולמנוע הרטבה של הערימה.

2. כאשר הפרקטיקה היא תהליך מבוקר, כדוגמת שרוול קומפוסט, מומלץ על:

- ביצוע התהליך למשך 1-2 שבועות לפחות, ולוודא בכמה נקודות במרחב השרוול הגעה לטמפרטורות מעל 50 מ"צ. ניתן להיעזר בטבלה להלן ולהאריך את זמן התהליך בהתאם לטמפרטורות הנמדדות.

טמפרטורה (מ"צ)	מספר ימים דרוש לקטילה
30	14-27
40	7-16
50	2-7
60	2

3. לפני היישום בשדה, מומלץ:

- בהתייחס לגידולים ספציפיים וחסמים אגרוטכניים (ראה מסמך פנימי שנכתב על ידי אשר אייזנקוט והוגש כנספח לחוק הסטנדרטים), לקבוע מקרים בהם יש לבצע בדיקות לנוכחות סלמונלה בחומר לפני היישום, ובמידת הצורך לאכוף המשך טיפול או ליישם את החומר בגידול אחר.

- בהסתכלות סביבתית רחבה יותר של הפצת סלמונלה בסביבה, ולא רק דרך גידולי מאכל - יש מקום לשקול אכיפה של טיפול תרמי לכל פרש הלול לפני פיזורו.