

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
11 - 0265 - 845	בחינת שיטות לשיפור אבחון גורמים מיקרוביאליים לדלקות עטין בבקר

ג. כללי		
מוסד מחקר של החוקר הראשי		
המכון הווטרינרי ע"ש קמרון		
סוג הדו"ח	תאריכים	
מסכם	תקופת המחקר	
	עבורה מוגש הדו"ח	
	התחלה	סיום
שנה / חודש	שנה / חודש	שנה / חודש
01 / 2009	12 / 2011	06 / 2012

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	
שלמה	בלום	חוקר ראשי
חוקרים משניים		
גבריאל מור	לייטנר פריד	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
מועצת החלב	02-0021	40
המכון הווטרינרי (מוסד מבצע)	02-0042	40

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתבת דיווחים

דלקות העטין בפרות הינן מהגורמים העיקריים להפסדים בענף הבקר לחלב. לרוב, דלקות עטין נגרמות בגין זיהום חיידקי. הגורמים הנפוצים ביותר לדלקות עטין הם מספר מיני סטפילוקוקוס, סטרפטוקוקוס וקוליפורמים, אך מינים רבים נוספים, הן בקטריאליים והן מיקוטיים, עלולים גם הם לזהם את בלוטת החלב ולגרום לדלקת העטין. מטרת המחקר הייתה לבדוק מקרים של דלקות עטין קליניות בהן לא נקבע מה גורם הדלקת בשיטת האבחון הקונבנציונלית באמצעות פאנל מורחב של בדיקות בקטריולוגיות. נמצא כי בדיקה בקטריולוגית מורחבת לא שיפרה באופן משמעותי את מספר האבחנות. במהלך המחקר אובחנו מספר מקרים של פרות עם עליה ממושכת בספירת תאים הסומאטיים (סת"ס) בכלל רבעי העטין, אך ללא סימנים דלקתיים קליניים. פרות אלו נבדקו לעומק בעזרת שיטות אימונולוגיות ואימונוהיסטוכימיות.

ו. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
-----------	-------------	---------------------	----------------------	------------	--------------------------

1. תקציר

דלקות העטין בפרות הינן מהגורמים העיקריים להפסדים בענף הבקר לחלב. לרוב, דלקות עטין נגרמות בגין זיהום חיידקי. הגורמים הנפוצים ביותר לדלקות עטין הם מספר מיני סטפילוקוקוס, סטרפטוקוקוס וקוליפורמים, אך מינים רבים נוספים, הן בקטריאליים והן מיקוטיים, עלולים גם הם לזהם את בלוטת החלב ולגרום לדלקת העטין. מטרת המחקר הייתה לבדוק מקרים של דלקות עטין קליניות בהן לא נקבע מה גורם הדלקת בשיטת האבחון הקונבנציונלית באמצעות פאנל מורחב של בדיקות בקטריולוגיות. נמצא כי בדיקה בקטריולוגית מורחבת לא שיפרה באופן משמעותי את מספר האבחנות. במהלך המחקר אובחנו מספר מקרים של פרות עם עליה ממושכת בספירת תאים הסומאטיים (סת"ס) בכלל רבעי העטין, אך ללא סימנים דלקתיים קליניים. פרות אלו נבדקו לעומק בעזרת שיטות אימונולוגיות ואימונוהיסטוכימיות.

2. מבוא ותיאור הבעיה

דלקות העטין בפרות מהוות אחד הגורמים החשובים ביותר להפסדים בענף הבקר לחלב. הפסדים אלו נובעים מירידה בתנובת החלב ואיכותו, הוצאות כספיות עקב הטיפול, הוצאה מוקדמת של הפרה מהעדר ולעיתים מוות בעה"ח. בנוסף, לזיהום תוך עטיני השפעה על איכות מוצרי חלב. מחקרים רבים הראו כי כתוצאה מדלקת עטין קלינית או כרונית חל שינוי בהרכב החלב ואיכותו יורדת. במחקר הנעשה במעבדה למחלות עטין במכון הווטרינרי נמצא כי זיהום כרוני תוך עטיני בסטפילוקוקי קואגולז שלילים (8) וכן בפרות רבות אשר עברו אירוע דלקתי קליני, לרוב מחיידקי גרם שלילים (בתהליכי פרסום), זמן הקרשת החלב מתארך וחוזק הגבן נחלש. מכאן שאבחון וטיפול נכון בדלקות עטין עשוי למנוע הפסדים לא רק לרפת, אלא גם לתעשיית החלב. מחקר נוסף הראה כי במקרים שלא אובחנו גורם דלקת העטין, הצלחת הטיפול הייתה משמעותית נמוכה (80% עם הגדרת הגורם לעומת 36% ללא מציאת הגורם). על כן, אבחון גורם הדלקת חשוב גם להקטנת השימוש בתכשירים אנטיביוטיים במקרים אשר גורם הדלקת לא זוהה (9).

לרוב, דלקות עטין נגרמות בגין זיהום חיידקי תוך עטיני. לכן, שיטת האבחון המקובלת לזיהוי גורם הדלקת הינה תרבית בקטריולוגית. הגורמים הנפוצים ביותר לדלקות עטין הם מספר מיני סטפילוקוקוס, סטרפטוקוקוס וקוליפורמים, אך מינים רבים נוספים, הן בקטריאליים והן מיקוטיים, עלולים אף הם לזהם את

בלוטת החלב ולגרום לדלקת העטין. כיום, תנאי התרבות לזיהוי גורם הדלקת בעטין המומלצים על פי הספרות (11) הינם זריעה של 0.01 מ"ל חלב על אגר נוטריינט מועשר עם 5% דם כבש רחוף והדגרה ב- 36 ± 1 מ"צ ל-24 עד 48 שעות. תנאים אלו אמנם מספיקים לגילויים של אותם החיידקים הנפוצים יותר בדלקות עטין, אך חיידקים מסוימים אחרים דורשים תנאי תרבית מיוחדים. בדיקות בתנאים כאלו מתבצעות באופן מזדמן בלבד, על פי חשד ועל בסיס ידע קודם על המשק.

על פי נתונים של המעבדה לבריאות העטין של מועצת החלב, בכ-18% מהבדיקות של דלקות עטין קליניות המגיעות למעבדה, אין כלל צמיחה של חיידקים בתרבית. בנוסף, בכ-2% מהבדיקות לא ניתן להצביע על גורם פתוגני דומיננטי בתרבית, כך שגם במקרים אלו לא ניתן להגיע לאבחון גורם הדלקת. מספרים אלו אינם ייחודיים לישראל, שכן בספרות מדווח על כ-20-40% של בדיקות חלב מדלקות עטין קליניות ללא אבחון סופי של הגורם, כאשר מתבצעות תרביות קונבנציונאליות כמתואר לעיל (1, 2, 5, 10, 12). חשוב לציין שבמונח דלקת "קלינית" נכללות כל הדוגמאות המגיעות מהמשקים ובהן נכללות גם בדיקות מפרות שלא הראו סמנים קליניים חיצוניים אך תנובת החלב של הפרה ירדה וחלה עליה משמעותית בסת"ס (במקרים רבים קבלת המידע קשור בנתוני שקילת החלב החודשית). במילים אחרות, באחד מכל חמישה מקרים של דלקות עטין קליניות ו/או כרוניות נמשכות, גורם המחלה לא מאובחן סופית.

על סמך ידע שנצבר בספרות על הדינאמיקה של הפרשת חיידקים בדלקות עטין בהדבקות מבוקרות, נהוג, במקרים של דלקת עטין קלינית אשר בבדיקה מעבדתית רגילה לא בודדו חיידקים, לפרש את התוצאה כדלקת עטין שנגרמה מזיהום ע"י קוליפורמים (בעיקר *E. coli*). אולם, לפרשנות כזו יכולות להיות השלכות רבות הן ברמת הטיפול במקרה הבודד והן ברמה האפידמיולוגית של המשק. כך, למשל, עלולות להיות הוצאות מיותרות עקב טיפול לא נכון, ייבוש הרבע הנגוע או ממשק מסוים לגבי הפרה הנגועה. לחילופין, תיתכן התפשטות גורם אחר במשק שלא זוהה בבדיקה, עקב אי טיפול וממשק לא נכון, שבסופו של דבר עלול לגרום להוצאות נוספות. בנוסף, ישנן עבודות שהראו שבמקרים מסוימים של דלקות עטין קליניות ללא אבחון בקטריולוגי, הפתוגנזה דומה למקרים של דלקות עטין בגין זיהום דווקא עם חיידקים גרם חיוביים, ולא *E. coli* (13).

בעבודות מחקר קודמות (6, 3), ניסו החוקרים לשפר את רגישות הבדיקה הבקטריאלית של דלקות עטין בעזרת, למשל, העשרת הדגימה במצע נוטריינט נוזלי טרם הזריעה על פלטות, הדגרת הדוגמה ב-37 מ"צ למספר שעות טרם זריעת הפלטות והגדלת נפח הדגימה אשר נזרע בבדיקה. שימוש בשיטות אלו גרם לעליה במספר

הבדיקות המזוהמות (תרבית מעורבת). בעבודה אחת (6), הצליחו החוקרים להעלות את רגישות התרבית ע"י שילוב של הדגרה של הדגימה לארבע שעות וזריעה של 0.1 מ"ל על פלטה, אולם יש לקחת בחשבון שבזמן ההדגרה לפני הזריעה או ההעשרה במצע נוזלי, היחס הכמותי בין החיידקים עלול להשתנות בהתאם לקצב הצמיחה ושרידות שלהם, ועלול לא לשקף את היחס המקורי בדגימה, דבר שישפיע על האבחון. בנוסף, שיטות אלו אינן פותרות את הבעיה שחלק מגורמי דלקות העטין דורשים תנאים מיוחדים לגידול.

עם פיתוח שיטות מולקולריות והוזלתן בשנים האחרונות, הוכנסו שיטות זיהוי מהירות, כגון PCR וקביעת רצף גן 16S, שיכולות לשמש לזיהוי גורם פתוגני ישר בדגימה ללא צורך בתרבית. אפשרות זאת נובעת מהעובדה שגן 16S נמצא בכל חיידק באשר הוא, וניתן לתכנן תחלים אוניברסליים להגברתו ב-PCR. כך שניתן בעזרת תחלים כאלה לזהות נוכחות של כמעט כל חיידק בדגימה מסוימת. הגדרת מן החיידק נעשית עפ"י רצף תוצר ה-PCR והשוואתו לבסיסי נתונים. הבעיה המרכזית העומדת בשימוש שיטות אלו בחלב נעוצה ברמת הדיגום. קיים קושי אמיתי בדיגום חלב אספטי ועל כן בדוגמאות רבות בהן לא נמצא גורם מזהם (חיצוני) בזריעה של 0.01 מ"ל חלב על מצע סטנדרטי (זיהום במספר חיידקים קטן) תוצאת ה-PCR יכולה להיות חיובית ללא כל משמעות אמיתית לגורם הדלקת. על כן ישנה חשיבות רבה הן ברמת הדיגום, הן בשיטה המולקולארית הנבחרת והן באינטרפרטציה של התוצאות. בעיה נוספת היא כאשר הדגימה לא מכילה חיידק אחד בלבד אלא מספר מינים שונים של חיידקים, לרוב כתוצאה מזיהום בזמן לקיחת הדוגמה. במקרים כאלו מתקבלים מספר רצפים של DNA בגדלים דומים ומאוד קשה להפריד ביניהם על מנת להגדיר את גורם הזיהום על בסיס רצף הדנ"א.

מטרת המחקר הייתה לבדוק מקרים של דלקות עטין קליניות ותת-קליניות בהן לא היה ממצא בקטריאלי, אך סת"ס מעל מיליון, באמצעות פאנל מורחב של בדיקות בקטריווגיות. בנוסף נבחנו בעזרת שיטות היסטולוגיות מקרים מיוחדים של דלקת עטין כרונית ללא ממצא בקטריווגי.

3. שיטות וחומרים

3.1. בע"ח. דיגום ובדיקות בקטריווגיות:

בחלק הראשון של המחקר, בוצעו בדיקות יזומות ומעקב אחר מקרים של דלקות עטין ממושכות אשר לא היה ניתן להגדיר בשיטה הקונבנציונאלית את גורם המחלה. נבדקו פרות אשר הראו סימנים של דלקת עטין תת-קלינית, סת"ס גבוהה (> 200,000) וירידה בתנובת החלב לאורך זמן ברבע אחד בעוד שאר רבעי העטין הניבו

חלב כמצופה עם סת"ס נמוך ($> 50,000$). דגימות חלב נלקחו מכל רבע עטין בנפרד, תוך הקפדה על תנאים אספתיים, והועברו למעבדה בקירור תוך יום. בנוסף לבדיקה הבקטריאלית הקונבנציונאלית, הכוללת זריעה של 0.01 מ"ל על פלטת אגר דם והדגרה ב-37 מ"צ משך 48 שעות, נערכו בדיקות בקטריאליות מקיפות, אשר כללו: תרביות אירובית, אנאירובית ומיקרוארופילית, זמני הדגרה ממושכים (עד חמישה ימים), זריעה של נפחים גדולים של דגימות (פי 10 ופי 100 מהמקובל), זריעה אחרי סרכוז הדגימה, משטחים לצביעות שונות (גרם, גימזה, יציבי חומצה ו-IF לכלמידופילה), תרבית מיקופלסמה ותרבית מיקולוגית. כמו כן, חלק מהדגימה נשמר בהקפאה ושימש להפקת DNA לבדיקת PCR לנוכחות חיידקים עם תחלים אוניברסאליים לגן 16S (4). במקרים בהם הייתה תגובה חיובית ב-PCR, התוצר נשלח לקביעת רצף הדנ"א בעזרתו החיידק מוגדר ע"י השוואת BLAST עם בסיסי נתונים באינטרנט. בחלק השני של המחקר הוחלט לרכזו במקרים של פרות עם דלקת עטין כרונית, עם עליה בסת"ס בחלב בכלל הרבעים במשך זמן ארוך, גם אם לא הייתה ירידה בתנובת החלב. עליה בסת"ס בכלל הרבעים מצביעה על בעיה כללית בבלוטת החלב, או בעיה מערכתית בפרה, ולא דווקא זיהום מקומי באחד הרבעים. הוחלט להעמיק בניסיון לאבחן את גורם הדלקת במקרים אלו ע"י ביצוע בדיקות מתקדמות לקביעת התפלגות התאים בחלב ולקחת דגימות מרקמות העטין לבדיקה היסטולוגית ואימונוהיסטוכימית. בשני מקרים דגמנו פרות שהוצאו מהעדר לאחר שחיטה ונלקחו רקמות מהעטין ומבלוטות הלימפה הסופרה-ממריות. דגימות הרקמה שימשו לבדיקות בקטריאליות ו-PCR כנ"ל והיסטולוגיה. בעוד שלושה מקרים נוספים, נלקחו ביופסיות מבלוטת העטין משני רבעים טרם הפרות הוצאו מהמשק. כמו כן, נשלחו דגימות דם לספירה כללית ומבדלת להערכת מדדים מערכתיים.

3.2. בדיקות חלב:

כמות החלב נקבעה באמצעות תוכנת "אפילב" ברפת, סת"ס ומרכיבי החלב נקבעו במעבדה המרכזית בקיסריה, התפלגות הסת"ס נקבעה בעזרת נוגדנים חד-שבטים במכשיר ה-FACS במכון הווטרינרי, ומדדי איכות החלב לתעשיית הגבינה נקבעו באמצעות מכשיר "אופטיגרף" במעבדה לחלב במכון וולקני. התפלגות התאים בחלב ואיכות מדדי גבינה בשיטות בהן השתמשנו פורסמו בעבר (7, 8).

3.3. ביופסיות העטין:

בדיקות ביופסיה של העטין בוצעו לאחר קבלת אישור לעריכת ניסויים בבע"ח מוועדת ניסויים בבע"ח של השירותים הווטרינרים ושל מכון וולקני. ביופסיות העטין נעשו בעזרת gun biopsy, מכשיר אוטומטי ללקיחת thru-cut, עם מחט בקוטר של 14G ועם שמירה על תנאים אספטיים. העור באזור הדיגום נוקה מלכלוך גס וחוטא עם פווידין-יוד. אלוש מקומי בוצע עם הזרקת לידוקאין. חתך קטן במקום הדיגום נעשה עם סקלפל מס' 11. התקבלו בביופסיה חתכים דקים באורך של כ-22 מ"מ. החתכים הועברו למבחנות אפנדורף סטריליות לבדיקה בתרבית ו-PCR. חתכים נוספים עברו הקפאה בעודם במחט על מנת לשמור עד כמה שניתן על מבנה הרקמה ואז הועברו למבחנות אפנדורף לבדיקה אימונוהיסטוכימית.

3.4. אימונוהיסטוכימיה:

בדיקת אימונוהיסטוכימיה מדגימות רקמת העטין בוצעה בשיטה בלתי ישירה (IHC) עם טכניקת הפולימר. דגימות הרקמה הוקפאו ונחתכו בטמפרטורה -24 מ"צ. החתכים הועברו לזכוכיות נושא מצופות עם poly-L-lysine, יובשו באוויר בטמפרטורת החדר ועברו קיבוע באצטון קר ל-10 דקות בטמפרטורה -20 מ"צ. הפרוקסידז האנדוגני נוטרל עם Peroxo-Abolish ל-10 דקות בטמפרטורת החדר לפי הוראות היצרן. לאחר מכן, הזכוכיות נשטפו שלוש פעמים ל-2 דקות כל פעם עם PBS. נוגדנים ראשוניים חד שבטיים מהולים 1:50 או 1:100 ב-PBS הוספו והזכוכיות הודגרו ל-30 דקות בתא לח בטמפרטורת החדר. אחרי שלום שטיפות של 2 דקות עם PBS, הוסף על הזכוכיות Anti-mouse Peroxidase Polymer (Histo-Stat Mouse Polymer), הוסף על הזכוכיות (US, Innovex) בטמפרטורת החדר לפי הוראות היצרן. לאחר שטיפות עם PBS כנ"ל, סובסטרט AEC (Amino-Ethyl-Carbazole, Zymed, US) הוסף על הזכוכיות ל-8-10 דקות בטמפרטורת החדר. לצביעה ניגודית נעשה שימוש בתמיסת 0.1% של Mayer's Hematoxylin (Sigma Diagnostics, St. Louis, US) ל-3 דקות, אחריה המשטחים נשטפו במי ברז ל-10 דקות והועברו לצפייה במיקרוסקופ אור בהגדלות 10X ו-20X. הבדיקות בוצעו במכון הווטרינרי במעבדה לאבחון ויראלי ע"י דר' וליזר בומברוב.

4. תוצאות

המקרים אשר נבדקו במהלך המחקר חולקו לשתי קבוצות. הקבוצה הראשונה כללה מקרים בהם חלק מרבעי העטין בלבד זוהה עם דלקת, ולא היו ממצאים חיוביים בבדיקה בקטריוולוגית קונבנציונאלית לקביעת גורם הדלקת. הקבוצה השנייה הכילה פרות אשר הראו סימני דלקת עטין בכלל רבעי הבלוטה, גם הן ללא ממצא בקטריאלי בבדיקה הקונבנציונאלית.

קבוצה 1: פרות עם סת"ס גבוה ברבע אחד.

נבדקו 45 רבעים מפרות עם סת"ס גבוה וסימנים של דלקת עטין קלינית אך ללא אבחון גורם הדלקת בבדיקה בקטריאלית קונבנציונלית. בדיקות בקטריאליות מקיפות לא שיפרו באופן משמעותי את הסיכוי לאבחון גורם הדלקת. לרוב, כאשר לא הייתה כלל צמיחה של חיידקים בתרבית קונבנציונלית, גם לא הייתה צמיחה באף אחת מהתרביות המקיפות, ולא נראו חיידקים בבדיקה מיקרוסקופית (טבלה 1). הגדלת נפח הזריעה או הארכת זמן ההדגרה גרמו בחלק מהמקרים לצמיחה מעורבת של חיידקים, ולא ניתן היה לקבוע את גורם הדלקת (לא מוצג). בוצעו 24 בדיקות IF לכלמידופילה. ב-12 דגימות התוצאה הייתה שלילית, ב-8 דגימות התוצאה הייתה שלילית אך נראו מספר קטן של גופיפים זוהרים, בביופסיה אחת התוצאה הייתה "חשוד", וב-3 דגימות התוצאה הייתה חיובית. מבין הדגימות החיוביות לכלמידופילה במשטח IF: בדגימה הראשונה היה ממצא בתרבית אנארובית באותה הפרה, אך ברבע אחר; בדגימה השנייה היה ממצא בתרבית אירובית באותו רבע וגם ברבע אחר; בדגימה השלישית לא היו ממצאים מלבד כלמידופילה. כל התרביות לליסטריה, קמפילובקטר ומיקופלסמה היו שליליות.

טבלה 1: סיכום תוצאות התרביות (מספר הדוגמאות גדול ממספר הפרות עקב חזרות בחלק מהדוגמאות).

זריעה רגילה	נפח פי 10	נפח פי 100	סרכוז	מיקרוארופילי	אנארובי	סבורו	מס' דוגמאות
ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	20
ל.צ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ל.צ.	ל.צ. (ת.מ.)	5 (1)
ל.צ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ל.צ. (ת.מ.)	6 (1)
ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ל.צ.	2
ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ממצא ^a	ל.צ.	1
ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ל.צ.	ממצא ^b	ממצא ^b	ל.צ.	1
ל.צ.	ממצא ^c	ממצא ^c	ממצא ^c	ממצא ^c	ממצא ^c	ל.צ.	1
ממצא ^d	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ת.מ.	ל.צ.	1
ממצא ^e	ממצא ^e	ממצא ^e	ממצא ^e	ממצא ^e	ממצא ^e	ל.צ.	6

ל.צ., ללא צמיחה; ת.מ., תרבית מעורבת; ^a פורפירומנס כללי; ^b סטרפטוקוקוס סויס; ^c סטפילוקוקוס קסילונוס; ^d סטרפטוקוקוס כללי; ^e סטפילוקוקוס כרומוגנס (3), מיקרוקוקוס כללי (1), אשרישיה קולי (2).

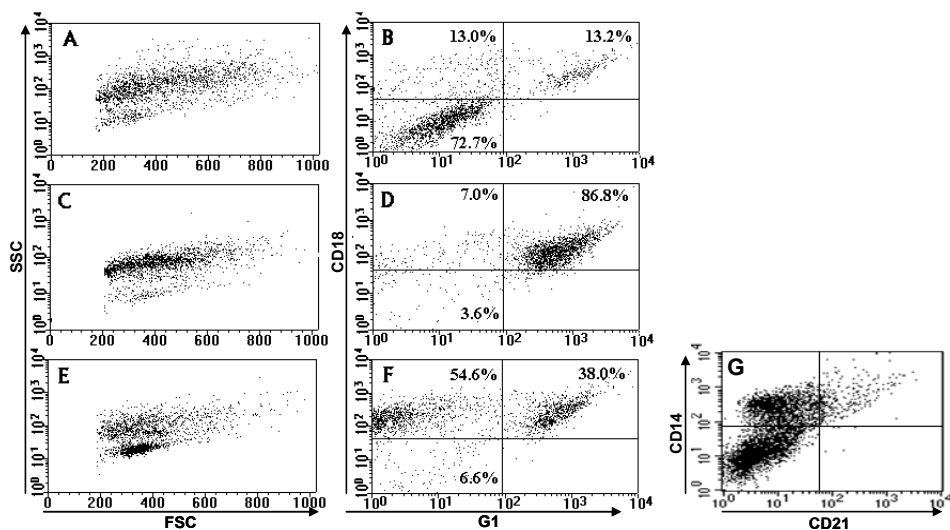
עשרים ושש דגימות חלב נבדקו בשיטת PCR בעזרת תחלים אוניברסליים לגן 16S. שתי דגימות היו חשודות כחיוביות לחיידקים. ניסיון חוזר להגביר את תוצר ה-PCR (nested PCR) לא הניב תגובה חיובית ודגימות אלו חושבו כשליליות.

קבוצה 2: פרות עם סת"ס גבוה בכל רבעי העטין.

חמש הפרות בקבוצה זו הראו עליה ממושכת בסת"ס ($> 1,000,000$ תאים למ"ל) בכלל רבעי העטין במשך חודשים במהלך התחלובה ושלוש מהן בשתי תחלובות עוקבות. פרט לעליה בסת"ס לא אובחן כל סימן בריאותי אחר, לא ברמת הפרה ולא ברמת העטין. הפרות נראו בריאות, עלו במשקל והניבו חלב כמצופה (טבלה 2). בבדיקות חזרות של החלב ברמת רבע העטין לא נמצא כל גורם בקטריאלי הן בשיטות בקטרילוגית רחבות והן בשיטת ה-PCR (איור 2). הרכב החלב נמצא בחלק התחתון של התפלגות השומן והחלבון וכן ערכים נמוכים של לקטוז המצביעים על תהליך יצירת חלב בלתי תקין. הוכחה לכך התקבלה בבידוק ליצור גבינה: משך זמן החלב מהוספת אנזים הקרשה ועד להקרשה נמצא ארוך וחוזק הגבן נמצא נמוך. בבחינת התפלגות התאים הסומאטיים (איור 3) נמצא כי הגורם העיקרי לעלייה בלוקוציטים בחלב נבע מעליה במקרופאגים, וזאת בשונה ממצב דלקתי הנגרם ע"י חיידקים בהם העלייה נובעת מהסננה מסיבית של נויטרופילים לחלב (8).

טבלה 2. מדדי חלב ומרכיביו: שומן, חלבון, לקטוז, תאים סומאטיים והתפלגותם ומדדי איכות החלב ליצור גבינה: זמן הקרשה החלב וחוזק הגבן.

פרות נבחנות (5)		ערכים צפויים (ללא נגיעות)	מדדים
ממוצע	סטית תקן		
47	4	35-55	חלב (ליטר/יום)
2.4	0.9	2.4-3.8	שומן
3.18	0.16	3.5-3.4	חלבון
4.38	0.69	4.9-5.2	לקטוז
2695	1402	700-1200	זמן הקרשה (שניות)
5.56	4.1	9.5-18	חוזק גבן (וולט)
1172	671	30-50	סת"ס (באלפים)
80.2	12.5	40-60	לויקוציטים (%)
49.2	20.9	20-40	נויטרופילים (%)
3.7	2.1	3-7	לימפוציטים T (CD4) (%)
4.1	2.7	7-15	לימפוציטים T (CD8) (%)
1.3	2.2	0	לימפוציטים B (CD21) (%)
15.8	10.1	5-10	מקרופאגים (CD14) (%)



איור 3: תוצאות FACS של דגימות חלב. הנוגדנים החד-שבטיים ששימשו לבדיקה מצוינים בצירי הגרפים (נוגדנים נגד CD21, G1, CD18). side scatter, SSC. forward scatter, FSC. A, B: חלב מפרה בריאה עם התפלגות רגילה של תאים סומאטיים; C, D: פרה עם דלקת עטין קלינית עם מספר גדול של נויטרופילים (G1+ ו CD18+); E-G: פרה עם עלייה בסת"ס כרונית, ללא סימני דלקת קלינית. רוב התאים הם מקרופאגים (CD14+) ומספר נויטרופילים נמוך יחסית עבור מקרה דלקת (G1). לא היו ממצאים בקטריאליים בבדיקת חלב מפרה זו.

בבדיקות היסטולוגיות ואימונוהיסטוכימיות לא נמצאו ממצאים חריגים. בכל הפרות שנבחנו (לאחר שחיטה בארבעה רבעים וביופסיה של שני רבעים לפרה) לא נמצאו ממצאים חריגים. רקמת העטין נמצאה יוצרת חלב נורמאלית, מעט נויטרופילים וסימנים למרכזים לימפאטיים בעטין, ובחלק מהפרות מספר מקרופאגים יחסית גבוה. בשתי הפרות לאחר השחיטה נמצא בלוטות מנקזות העטין, מוגדלות באחת באופן חריג. תוצאות היסטולוגיה ואימונוהיסטוכימה אינן מובאות בשל חוסר ממצאים ומסתמכות על עבודה קודמת דומה שבוצעה במעבדה (7).

5. דיון

על פי נתונים מהספרות וכן מהמעבדה לבריאות העטין (מאל"ה), אחוז ניכר מהבדיקות לגורמי דלקות עטין לא מניבות תוצאות חד משמעיות. לתופעה זו מספר סיבות אפשריות: 1. דיגום לא אספתי, וכתוצאה מכך, צמיחה יתרה של חיידקים מזהמים (תרבית מעורבת); 2. טמפרטורת המשלוח, אשר משפיעה על שרידות של חיידקים מסוימים בדגימה יותר; 3. שאריות של תכשירים אנטימיקרוביאליים, שעלולות לעכב את הצמיחה של חיידקים *in vitro* אפילו כאשר פעילותן *in vivo* לא משפיעה על הדלקת; 4. ריכוז גורם המחלה נמוך בחלב, הרי שבזריעה של 0.01 מ"ל חלב על פלטה, רגישות הבדיקה אינה עולה על 100 חיידקים למ"ל, וחיידקים שונים יכולים להימצא בחלב בריכוזים נמוכים מאלו בשלבים שונים של המחלה; 5. דיגום מאוחר מזמן הופעת הסימנים הקליניים, כאשר הדלקת נמצאת בשלבים סופיים למשל והגורם הראשוני סולק; 6. תנאי תרבית לא מתאימים, מאחר וחלק מהגורמים הפתוגניים האפשריים בדלקות עטין דורשים זמן הדגרה ממושך, אטמוספרות שונות, או מצעים מיוחדים על מנת לצמוח במעבדה. בנוסף לאמור לעיל יתכנו גם גורמים שאינם חיידקים, מקומיים בעטין או גורמי מחלה נוספים, כגון מחלות ויראליות אשר לרוב אינן נבחנות. עבודת המחקר הנוכחית שמה לה למטרה לבחון האם חוסר ממצאים בבדיקות אספטיות חוזרות הנלקחות בזמן האירוע הדלקתי נובעים מחוסר בבדיקות בקטריולוגיות על מצעים מתאימים ו/או תנאי הדגרה מיוחדים או מגורמים אחרים. המחקר הנוכחי לא עסק בחלק רחב של הבעיה, דיגום מאוחר או זיהום בזמן הדיגום. חלק זה שכנראה אחראי לאחוז גבוה של חוסר זיהוי גורם הדלקת בעיקר בדלקות קליניות, נובע ממשק דיגום לא נכון וניתן לטיפול בהדרכה נכונה.

על סמך תוצאות המחקר, פרות עם דלקות עטין כרוניות ללא זיהוי גורם הדלקת חולקו לשתי קבוצות, קבוצה של פרות אשר המצב הדלקתי התמקד ברבע אחד של העטין וקבוצה שנייה בה כל רבעי העטין נמצאו עם סת"ס גבוה לאורך זמן של חודשים בתחלובה ואף בתחלובות עוקבות. בבדיקות בקטריאליות מקיפות לא שיפרו את

אבחון גורם הדלקת באף אחת משתי הקבוצות במחקר. שיטת ה-PCR בעזרת תחלים אוניברסליים לגן 16S לא הניבה תוצאות חיוביות. יש לציין שקיים קושי רב לאסוף דגימות חלב מספיק אספטיקות שיכולות להיבדק בשיטה זו. על כן, מלכתחילה יישום שיטת ה-PCR עם תחלים אוניברסליים בעיתית בהקשר של בדיקות חלב.

לגבי הקבוצה הראשונה, התוצאות מצביעות על פגיעה ברקמת העטין הנשאר דלקתי לאורך זמן. ממקור הפגיעה ייתכן והוא לא חיידקי (טראומתי לדוגמה) או שהגורם החיידקי סולק מרבע העטין ותגובה דלקתית נמשכת נגרמת כתוצאה מפגיעה ברקמות הבלוטה. מבחינה ממשקית כלכלית במקרים אלו לא כדאי לטפל והדרך הרצויה מבחינה ממשקית היא ליבש את הרבע. בעבודת אחרת במעבדה (בפרסום) הראנו כי באחוז ניכר של פרות שעברו דלקת עטין מחיידקי צ. קנולי, הרבע לא חוזר למצב יצור תקין וכמות ואיכות החלב של רבע זה יורדות.

לגבי קבוצת הפרות השנייה, למרות מספר הפרות הנמוך שנחקר, התוצאות מעלות את האפשרות כי התגובה הדלקתית בעטין נובעת מגורם לא חיידקי, ייתכן ויראלי, אשר נכון להיום לא זוהה. ידוע כי במקרים של נגיעות ויראלית בוורוס כגון מאדי ויסנה בכבשים או CAE בעיזים ישנו מעבר אנדוגני של הווירוס לתוך העטין ויצירה של מרכזים לימפאטיים. העובדה כי ישנם רמזים להימצאות מרכזים לימפאטיים בפרות מעלה את החשד שיתכן וגם בפרות קיימים וירוסים שגורמים לתופעה דומה. חשוב להבחין במקרים אלו כדי להימנע משימוש מיותר בטיפול אנטיביוטי. כמו כן, פרות אלו גורמות לעלייה בסת"ס בטנק החלב ומורידות את ערך החלב, הן כספי והן תעשייתי. אחד הסימנים הבולטים שניתן בעזרתו להבדיל פרות כאלו משאר הפרות הוא עליה בסת"ס בכלל רבעי העטין לאורך זמן, וללא סימנים קליניים נוספים. אולם רק בעזרת בדיקת התפלגות התאים בחלב ניתן לזהות מצבים כאלה בוודאות.

במחקר זה נמצא כי מספר הפרות עם תגובה דלקתית בכל רבעי העטין אינה נפוצה ונראה כי פרות אלו בריאות באופן כללי. יחד עם זאת, האפשרות כי קיימת בפרות דלקות עטין על בסיס ויראלי סיסטמי בדומה לכבשים ועיזים, וכתוצאה מהיזום מתפתחים מרכזים לימפטיים בעטין יתכן ובעלת חשיבות רבה. לפני מספר שנים אובחנה עז בצרפת חיובית ל BSE. עובדה זו הובילה להקמת תת ועדה מייעצת בשוק האירופי לבחון מה המשמעות של BSE בעיזים וכבשים והדבקה בו זמנית במאדי ויסנה בכבשים או CAE בעיזים. החשש היה כי במצב זה נוכחות מסיבית של מרכזים לימפטיים בעטין יכולה להוביל להפרשת הפריון בחלב. דר' לייטנר הוזמן להיות עד מומחה לנושא מערכת החיסונית בעטין. השוק האירופי השקיע כסף רב הן בבדיקות רחבות של 1,000 עיזים ובניסוי מבוקר של כבשים הנגועות בסקרייפי ומידי ויסנה בו זמנית. חלב כבשים אלו שימש בניסיון הדבקות בעכברים.

הנושא של התפתחות מרכזים לימפטיים היה מהגורמים העיקריים להמשך הדיונים והמלצות הוועדה. הנושא ירד לעת זאת מהפרק כאשר לא נמצאו הוכחות כי מלבד עז האחת לא נמצאו עיזים וכבשים נוספות חשודות ל BSE. נוסף על כך, פרות אלו תורמות לעליה בסת"ס בטנק החלב ולא מגיבות לטיפול אנטימיקרוביאלי, מכאן חשיבות זיהוי מקרים אלו.

לסיכום, יש להבחין בשני מצבים שונים אשר בהם לא מתקבלות תוצאות חיוביות לגורם דלקת עטין בבדיקה בקטריאלית. הראשון הוא מצב בו קיימת דלקת עטין, לכאורה חיידקית, ברבע או מספר רבעים בעטין. מגוון סיבות יכולות לגרום לחוסר אבחון סופי של גורם הדלקת ויש ספק אם הרחבת הבדיקות תשפיע באופן משמעותי על זיהוי הגורמים הנפוצים לדלקת עטין במקרים אלו. אחד האתגרים להרחבת מספר הבדיקות ועבודה עם בדיקות שדה היא איכות לקיחת הדגימה, הרי שהשיטה המולקולארית שנוסחה במחקר הנוכחי דורשות לקיחה אספטית ביותר. המצב השני הוא מצב בו גורם הדלקת לכאורה ממקור לא חיידקי. עליה בסת"ס מתרחשת בכלל רבעי העטין, לא בהכרח כתוצאה מזיהום מקומי בלבד בעטין. יתכן כי מקרים אלו נובעים מזיהומים ויראליים. מקרים אלו מעטים אך קיימת אפשרות לתת-זיהוי/דיווח. יחד אם זאת, מקרים אלה משמעותיים מבחינת הוספת סת"ס לטנק החלב. גם במקרים אלו הרחבת הבדיקות הבקטריאליות לא תאפשר זיהוי הגורם אלא רק שלילת גורם בקטריאלי. מקרים אלו לא מגיבים לטיפול עם תכשירים אנטימיקרוביאליים..

6. רשימת ספרות

1. Anderson, K.K., A.R. Smith, B.K. Gustafsson, S.L. Spahr, and H.L. Whitmore. 1982. Diagnosis and treatment of acute mastitis in a large dairy herd. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181:690.
2. Bradley, A.J., K.A. Leach, J.E. Breen, L.E. Green, and M.J. Green. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. The Vet. Rec. 160:253.
3. Brown, R.W., D.A. Barnum, D.E. Jasper, J.S. McDonald, and W.D. Schultze. 1981. Microbiological Procedures for Use in the Diagnosis of Bovine Mastitis. 2nd ed. Natl. Mastitis Council, Inc., Washington, DC.

4. CLSI. 2008. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline. CLSI document MM18-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. Daniel, R.C.W., D. O'Boyle, M.S. Marek, and A.J. Frost. 1982. A survey of clinical mastitis in South-East Queensland dairy herds. *Aust. Vet. J.* 58:143.
6. Dinsmore R.P., P.B. English, R.N. Gonzalez, and P.M. Sears. 1992. Use of Augmented Cultural Techniques in the Diagnosis of the Bacterial Cause of Clinical Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.* 75:2706.
7. Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl S. and Saran, A. 2003. Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Vet. Med. B.* 50:45-52.
8. Leitner, G., Merin, U. and Silanikove, N. 2011a. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk quality: Comparison among cows, goats and sheep. *Int. Dairy J.* 21:279-285.
9. Leitner, G., Koren, O., Jacoby, S., Merin, U. and Silanikove, N. 2011b. Practical tactics for handling mastitis during lactation in modern dairy farms. *Isr. J. Vet. Med.* (in press).
10. Makovec, J.A. and Ruegg P.L. 2003. Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86:3466-3472.
11. National Mastitis Council, Inc. 1990. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection. 3rd ed. Natl. Mastitis Council, Arlington, VA.
12. Olde Riekerink, R.G.M., H.W. Barkema, D.F. Kelton, and D.T. Scholl. 2008. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 91:1366.
13. White M.E., and Montgomery M.E. 1987. The Resemblance of Clinical Attributes Between Mastitic Cows with No Growth on Bacterial Milk Cultures and those with Gram-positive Bacteria Cultured. *Can. J. Vet. Res.* 51:181.