

דוח לתכנית מחקר מספר 705-0026-11

**פיתוח מערכת של חומרים אנטיספטיים בשחרור מושהה, למניעה וטיפול בזיהומים תוך-  
עטיניים בפרות חלב ב"תקופת היובש"**

**ע"י**

ערן לביא - בית הספר לרפואה וטרינרית, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית

מיכאל פרידמן – בית הספר לרוקחות, הפקולטה לרפואה, האוניברסיטה העברית

גבריאל לייטנר – המחלקה לבריאות העטין, המכון הווטרינרי, בית דגן

עדין שווימר – מאל"ה

מור פריד – מאל"ה

מרץ 2014

אדר ב' תשע"ד

**הממצאים בדו"ח הינם תוצאות ניסויים**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים" כן/לא**

חתימת החוקר

## תקציר-

דלקת עטין הינה תגובה אימונולוגית ופיסיוולוגית רב - גורמית הגורמת לנזק כלכלי רב ביותר ברפת החלב, ונוצרת בעיקר מזיהום חיידקי בבלוטת החלב. הטיפול המקובל בישראל לכל הפרות בכניסתן לתקופת היובש הינו מניעתי וטיפולי, ומבוסס על החדרת אנטיביוטיקה לתוך כל אחד מרבעי העטין דרך תעלת מבוא הפטמה. החשש העיקרי בטיפול זה הוא ששימוש נרחב באנטיביוטיקה עלול לגרום להגברת העמידות לאנטיביוטיקה בחיידקים וכפועל יוצא בבעל החיים ובאדם. בנוסף, מציאת שיירי אנטיביוטיקה בחלב בעיקבות הטיפול גורמת להפסדים כלכליים לרפתן היות ולא ניתן לשווקו. הבעיות הנ"ל, משמשות כבסיס לצורך פיתוח תכשיר טיפולי אחר אשר ישפר את בריאות הפרה, בריאות הציבור ואיכות המוצר כאחד.

מטרת המחקר לפתח פורמולציה המכילה חומר אנטיספט-כלורהקסידין בשחרור מושהה במתן מקומי, ולבחון את השפעותיה כחלופה לטיפול המקובל כיום באנטיביוטיקה. העבודה מתמקדת ב:

1. בדיקת הישארות התכשיר האנטיספטי על גבי הפטמה ובתוכה לאחר הטבילה בתכשיר.
2. בדיקת יעילות התכשיר במתן חוץ עטיני (טבילה חיצונית) למניעת נגיעות חדשה לעומת "טיפול היובש" המקובל כיום.

תחילה בוצעו ניסויים *In vitro* בשימוש בפטמות כרותות אשר נטבלו בתכשיר. התכשיר נבחן להמתת חיידקים בפרק זמן נתון בפרוטוקול A. בנוסף, נבחנה יעילות התכשיר לאורך זמן (עד שלושה שבועות בהקפאה) באמצעות טבילת פטמות בתכשיר, חיתוך "פרוסות" והנחתן על צלחת אגר מוצק הנזרע באחד משלושה חיידקים שונים. פעילות ויעילות נמדדה בקוטר העיכוב. בשני המבחנים יעילות התכשיר נמדדה כנגד שלושה חיידקים: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ו-*Streptococcus dysgalctiae*. בשני הניסויים נמצאה פעילות של התכשיר כנגד שלושת החיידקים. בהמשך בוצעו ניסוי *In vivo* בו נטבלו פטמות כיממה לפני שחיטת פרות. בכל פרה פטמה אחת לא נטבלה ושמשה ביקורת. הפטמות הוקפאו ונחתכו לדיסקיות והונחו על מצע של *Escherichia coli*. נצפה עיכוב גדילה לעומת צלחת הביקורת ב-24 השעות הראשונות. החתכים הועברו לצלחות חדשות לאחר 3 ו-6 ימים והודגרו מחדש. התוצאות מראות שיכולת עיכוב התכשיר פחתה.

מסקנת העבודה היא שהתכשיר הינו בעל פעילות אנטימיקרוביאלית כל זמן שנשאר על או ספוג בעור הפטמה. על מנת לקבוע אם קיימת פעילות לטווח ארוך בדומה לטיפול יובש ידרשו ניסויים נוספים.

## רקע מדעי-

דלקת עטין הינה תגובה אימונולוגית ופיסיוולוגית לגירוי, בעיקר של חיידקים פתוגנים, בבלוטת העטין הגורמת במקרים מסוימים לתחלואה בבעל החיים, וכן לפגיעה, נגיעות תוך עטינית ותגובה דלקתית בבלוטה. שכיחה ביותר ברפת החלב ובעלת משמעות כלכלית רבת משקל. דלקת עטין יכולה להופיע

בכל אחת מתתי האוכלוסיות בעדר, לרבות עגלות. בארצות-הברית בלבד הנזק לחקלאי מוערך בשני מיליארד דולר לשנה. השפעותיה הכלכליות העיקריות הן:

1. ירידה בכמות ובאיכות החלב.
  2. עליה בהוצאות רפואיות וטרינריות.
  3. עליה בשיעור יציאתן של פרות מהרפת.
  4. שפיכת חלב עקב הגברת הימצאות של חומרים מעכבים (אנטיביוטיקה).
- מסיבות אלה, העבודה מתמקדת במציאת טיפול חלופי למניעת הידבקות בדלקת עטין. טיפול זה יבטיח את בטיחות המוצר ויפחית הפסדים כלכליים לרפתן.

## מטרת המחקר

מטרת המחקר לפתח פורמולציה המכילה חומר אנטיספטי במתן מקומי-עטיני בשחרור מבוקר ולבחון את השפעותיו כחלופה לטיפול המקובל היום באנטיביוטיקה על מניעת הידבקות במיקרוארגניזם גורמי דלקת עטין בתקופת היובש.

כחלק ממחקר זה העבודה התמקדה:

- בדיקת הישארות התכשיר האנטיספטי על גבי העטין ובתוכו לאחר הטבילה בתכשיר.
- בדיקת יעילות התכשיר במתן חוץ עטיני (טבילה חיצונית) למניעת נגיעות חדשה לעומת "טיפול היובש" המקובל כיום.

## תוצאות:

### In vitro.1

פיתוח תכשיר אנטיספטי: 1.2+1.3. פרוטוקול A+ פרוטוקול A עם מודיפיקציה:

הטבלאות המוצגות מטה מתארות את השינוי בלוגים בכמות החיידקים בתמיסת ה-NB לאחר שימוש בתכשיר הנבדק לפי פרוטוקול A ופרוטוקול A עם מודיפיקציה. כל טבלה מתארת את השינוי בנוגע לחיידק שונה בנקודת זמן שונה ומשווה את השינוי לביקורת שלילית (לא הוטבלו פטמות בתכשיר) וביקורת חיובית (יוד).

השינוי בכמות החיידק *E. coli* היה הרב ביותר. עם תחילת הניסוי, לאחר הדגרה של לילה, ישנו שינוי של 3 לוגים בכמות החיידקים עם וללא תוספת חומר אורגני (טבלה 3). הירידה בכמות החיידקים נשארת זהה ללא חומר אורגני גם לאחר יומיים של השארת הפטמות בקירור (טבלה 4). כמות החיידקים יורדת לאחר שבוע בלוג אחד, ולאחר שבועיים לחצי לוג בלבד (טבלאות 5,8). לעומתו, השינוי בכמות *Staphylococcus aureus* היה קטן יותר עם שינוי ירידה של 2.5 לוגים (לוג וחצי יותר מ-*E. coli*) לאחר שבוע (טבלה 6) וירידה של 1.5 לוגים לאחר שבועיים (טבלה 9). החיידק הנוסף שנבחן הוא *Streptococcus dysgalactiae* שאותו התכשיר הוריד בכמות של כלוג אחד בלבד לאחר שבוע וחצי (טבלה 7) ולוג בלבד לאחר שבועיים (טבלה 10).

(P4) *E. coli*

מספר החיידקים (מושבות) בתמיסת המקורית עמד על  $5.1 \times 10^8$

| טיפול               | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן     | השינוי (קטל) |
|---------------------|-------------|----------------------------|--------------|
| ביקורת שלילית       |             | $5.1 \times 10^7 \pm 0.16$ | (רפרנט לקטל) |
| ביקורת חיובית (יוד) |             | $2.3 \times 10^3 \pm 0.25$ | >4 log       |
| ללא חומר אורגני     | מקור        | $0.5 \times 10^4 \pm 0.13$ | >3 log       |
| בתוספת חומר אורגני  | מקור        | $1.1 \times 10^4 \pm 0.12$ | >3 log       |

טבלה 3: עיכוב גדילת *E. coli* ב-NB עם וללא תוספת חומר אורגני

### יומיים

(P4) *E. coli*

מספר החיידקים (מושבות) בתמיסת המקורית עמד על  $4.9 \times 10^8$

| טיפול           | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן     | השינוי (קטל) |
|-----------------|-------------|----------------------------|--------------|
| ביקורת שלילית   |             | $6.3 \times 10^7 \pm 0.13$ | (רפרנט לקטל) |
| ללא חומר אורגני | מקור        | $1.5 \times 10^4 \pm 0.66$ | >3 log       |

טבלה 4: עיכוב גדילת *E. coli* ב-NB לאחר יומיים של השארת הפטמות טבולות במקרר

### שבוע

(P4) *E. coli*

| טיפול           | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן      | השינוי (קטל) |
|-----------------|-------------|-----------------------------|--------------|
| ביקורת שלילית   |             | $2.35 \times 10^7 \pm 0.40$ | (רפרנט לקטל) |
| ללא חומר אורגני | מקור        | $1.3 \times 10^6 \pm 0.88$  | 1 log        |

טבלה 5: עיכוב גדילת *E. coli* ב-NB לאחר שבוע של השארת הפטמות טבולות במקרר

(ZO3984) *Staphylococcus. aureus*

| טיפול | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן | השינוי (קטל) |
|-------|-------------|------------------------|--------------|
|-------|-------------|------------------------|--------------|

|                 |      |                             |                 |
|-----------------|------|-----------------------------|-----------------|
| ביקורת שלילית   |      | $3.2 \times 10^7 \pm 0.62$  | (רפרנט לקטל)    |
| ללא חומר אורגני | מקור | $9.21 \times 10^4 \pm 0.31$ | $\sim 2.5 \log$ |

טבלה 6: עיכוב גדילת *Staphylococcus aureus* ב-NB לאחר שבוע של השארת פטמות טבולות במקור

*Streptococcus. dysagalactiae*

(VL1989)

|                 |             |                            |               |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------|
| טיפול           | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן     | השינוי (קטל)  |
| ביקורת שלילית   |             | $2.5 \times 10^6 \pm 0.68$ | (רפרנט לקטל)  |
| ללא חומר אורגני | מקור        | $3.1 \times 10^5 \pm 0.95$ | $\sim 1 \log$ |

טבלה 7: עיכוב גדילת *Streptococcus dysagalactiae* ב-NB לאחר שבוע של השארת פטמות טבולות במקור. אנא ראי תוספת נדרשת לעיל

### שבועיים

(P4) *E.coli*

|                 |             |                            |              |
|-----------------|-------------|----------------------------|--------------|
| טיפול           | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן     | השינוי (קטל) |
| ביקורת שלילית   |             | $1.5 \times 10^7 \pm 0.20$ | (רפרנט לקטל) |
| ללא חומר אורגני | מקור        | $5.6 \times 10^6 \pm 0.72$ | 0.5 log      |

טבלה 8: עיכוב גדילת *E. coli* ב-NB לאחר שבועיים של השארת הפטמות טבולות במקור

(ZO3984) *Staphylococcus. aureus*

|                 |             |                            |              |
|-----------------|-------------|----------------------------|--------------|
| טיפול           | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן     | השינוי (קטל) |
| ביקורת שלילית   |             | $1.3 \times 10^7 \pm 0.32$ | (רפרנט לקטל) |
| ללא חומר אורגני | מקור        | $5.1 \times 10^5 \pm 0.31$ | 1.5 log      |

טבלה 9: עיכוב גדילת *Staphylococcus aureus* ב-NB לאחר שבועיים של השארת פטמות טבולות במקור

(VL1989) *Sterptococcus.dysagalctiae*

| טיפול           | ריכוז החומר | מספר מושבות וסטית התקן     | השינוי (קטל) |
|-----------------|-------------|----------------------------|--------------|
| ביקורת שלילית   |             | $3.6 \times 10^6 \pm 0.77$ | (רפרנט לקטל) |
| ללא חומר אורגני | מקור        | $7.9 \times 10^5 \pm 1.10$ | log 0.5      |

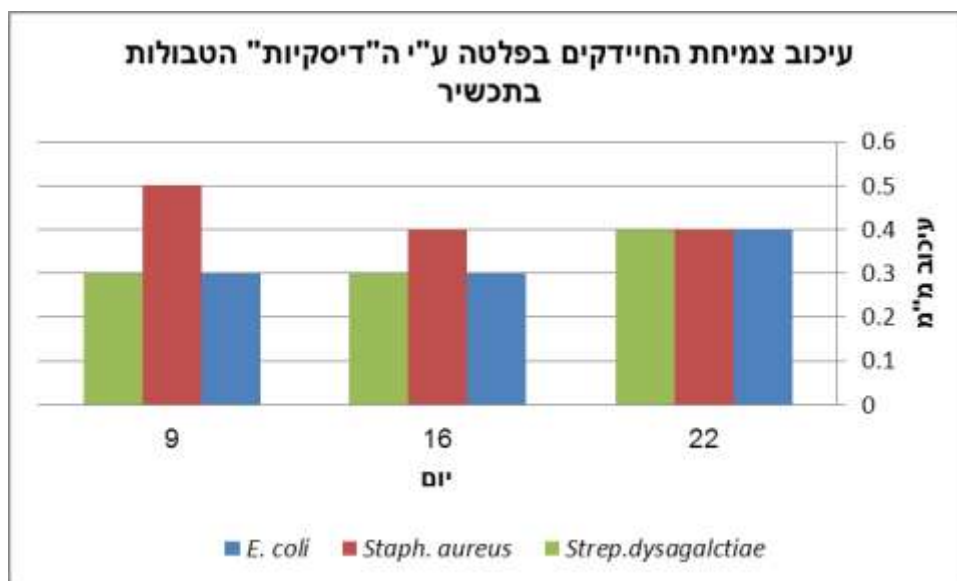
טבלה 10: עיכוב גדילת *Streptococcus dysgalactiae* ב-NB לאחר שבוע של השארת פטמות טבולות במקרר

#### 1.4 מבחנים מיקרוביאליים: חתכי פטמות In vitro

בניסוי הבא נבחנה יכולת עיכוב התכשיר על שלושה חיידקים שונים. התכשיר נבדק על רקמות שנכרתו לפני הניסוי. ניתן לראות את חדירת החומר אל תעלת מבוא הפטמה (תמונה 1, לא מוצגת) ואת יכולת העיכוב של החומר בתוך התעלה (תמונה 3). עיכוב גדילת חיידקים נראה גם מצידה החיצוני של הרקמה כאשר קוטר עיכוב מסביב לרקמה (תמונה 2, לא מוצגת). עיכוב גדילת חיידקים נצפה גם לאורך זמן. באיור מספר 1 ניתן לראות שקיים עיכוב גדילה של שלושת החיידקים הנבדקים עד 22 יום (לאחר מכן לא נבדק). עבור החיידקים *E. coli* ו-*Streptococcus dysgalactiae* קוטר העיכוב ביום 22 גבוה מזה שביום 9 ו-16. עבור *Staphylococcus aureus* נראית מגמה הפוכה. שקוטר העיכוב ביום 9 גבוה מזה שביום 16 ו-22.

#### תמונה 3: דוגמא לעיכוב חוץ פטמתי ותוך פטמתי המושג ע"י התכשיר In Vitro





**איור 1: עיכוב צמיחת החיידקים בפלטה לאורך זמן.** ניתן לראות שיכולת העיכוב של התכשיר נשמרת לאורך הימים עבור שלושת החיידקים הנבדקים.

## 2. In vivo:

סדרת ניסויי השדה כללה 10 ניסיונות של אפלקצית ההתכשיר על הפטמות ברפת. בכל פעם נצפה כמה פטמות הכילו עדויות של התכשיר 24 ו-48 שעות לאחר הטבילה (טבלה 11). ברוב המקרים אחוז הפטמות שהראה עדות לחומר לאחר 24 שעות לא עלה על 25%, פרט למקרה אחד מה-02.04.2012. במקרה זה 56% מהפטמות הראו עדות לתכשיר לאחר יממה. אך גם תכשיר זה התקלף ולאחר 48 נותרו רק 18% פטמות שהראו עדות. בניסוי זה גם ניתן היה לראות בבירור את שאריות התכשיר בפתח מבוא הפטמה שהוא המקום רצוי להתרכזות החומר כדי למנוע כניסת פתוגנים (תמונה 4).

| תאריך טבילה              | מספר פטמות | 24 שעות | 48 שעות | הערות  |
|--------------------------|------------|---------|---------|--|
| 14.7.2011<br>17.07.2011+ | 20         | -       | -       | הפרות נלקחו לבית מטבחים ב-20.7.2011<br>נשארה פטמה אחת עם תכשיר |
| 23.01.2012               | 20         | 2       | 1       |  |
| 23.02.2012               | 16         | 3       | -       |  |

|   |   |   |    |            |
|---|---|---|----|------------|
|   | 3 | 9 | 16 | 02.04.2012 |
|   | - | 2 | 16 | 19.06.2012 |
|   | - | 3 | 12 | 27.08.2012 |
| פטמות נטבלו ב-7 בבוקר. לאחר 3 שעות היו 3 פטמות שהראו עדויות לתכשיר ולאחר 12 שעות לא היו כלל עדויות לתכשיר | - | - | 3  | 13.11.2012 |
| לאחר 24 שעות הובאו מבית מטבחים והוכנסו למקפיא   | - | 2 | 2  | 28.11.2012 |
| לאחר 24 שעות הובאו מבית מטבחים והוכנסו למקפיא   | - | 3 | 3  | 29.04.2012 |

#### טבלה 11: עדויות להישארות התכשיר בניסויי שדה



**תמונה 4: פטמות טבולות מה-02.04.2012.** מצד ימין ניתן לראות עדות לתכשיר לאחר 24 שעות ומצד שמאל לאחר 48 שעות. חשובה התרכזות החומר בפתח מבוא הפטמה

ב-3 מהניסויים האלו נכללו פרות שיצאו לשחיטה יממה לאחר מכן ורקמותיהן נלקחו מבית המטבחים. מבין הפטמות שנלקחו מ-5 פרות הנטבלו בתכשיר בתאריכים 14.07.2011 ו-17.07.2011 רק בפטמה אחת ניתן היה לראות שאריות של התכשיר (תמונה 5). בשני הניסויים

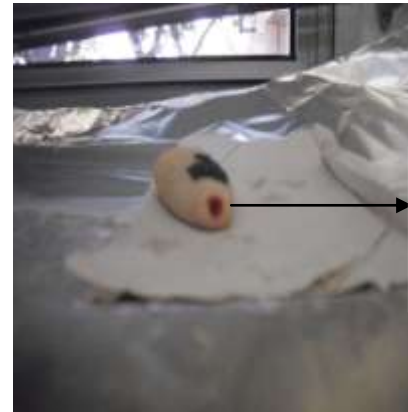


האלו הפטמות נטבלו באותו תכשיר (טבלה 1). הפטמות נזרעו על צלחות עם *E. coli* (p4) ולא נצפה עיכוב גדילה.

ניסוי נוסף מה-28.11.2012 בדק תכשיר בהרכב אחר (טבלה 1). ניתן היה לראות שארית של חומר בשתי הפטמות שנטבלו (תמונה 6). כמו-כן, בשתי הצלחות שעליהן הנוחו הדיסקיות הראו קיום של עיכוב צמיחת חיידקים (תמונה 7), לעומת צלחת הביקורת שעליה הונחה פטמה שלא הוטבלה בתכשיר ובה לא נצפה עיכוב גדילה כלל (תמונה 8).



**תמונה 6:** שארית התכשיר בפטמה כרותה לפני חיתוך לדיסקיות מה-28.11.2012



התרכוזת התכשיר בפתח מבוא הפטמה

**תמונה 5:** פטמה מניסוי שבוצע ב-14.07.2011. התכשיר מתרכז בפתח מבוא הפטמה שזהו האזור הרצוי שכן דרכו מתקיימת חדירת הפתוגנים



**תמונה 8:** צלחת הביקורת מה-28.11.2011. חתכים אלה נלקחו מאותה פרה שפטמותיה הוטבלו ומוצגות בתמונה 6 אך לא נטבלו בתכשיר ועל כן לא נצפה עיכוב צמיחה



**תמונה 7:** דוגמא לצלחת שהוזרעה בחתכי פטמות טבולים בתכשיר מה-28.11.2011. ניתן לראות את הריכוז הגבוה של החומר סביב תעלתמבוא הפטמה, ואת יכולת עיכוב התכשיר על פני השטח של הפטמה בחתכים השונים



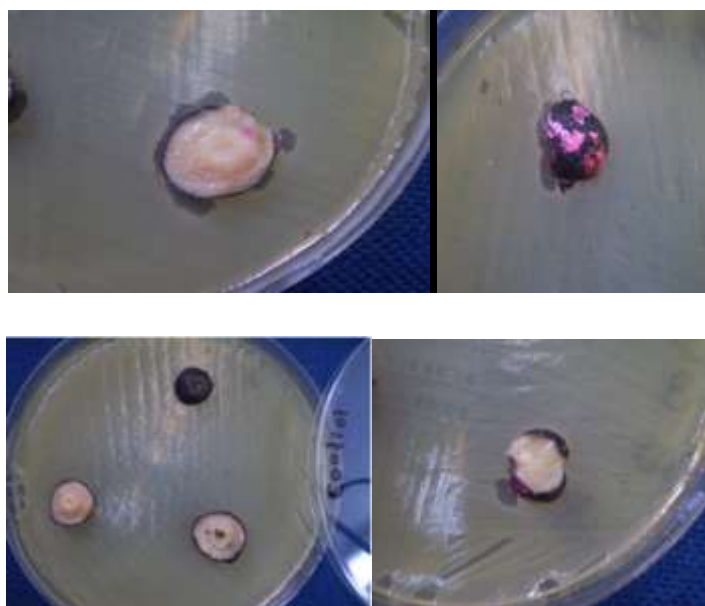
**תמונה 9: 25.04.2013** פטמות הפרה ברפת 24 שעות לפני יציאה לבית מטבחים. ניתן לראות 3 פטמות שנטבלו בתכשיר ופטמה אחת שלא נטבלה ושמשה לביקורת

בניסיון האחרון שנעשה ב- 25.04.2013 נעשה שימוש בתכשיר בו הוטבלו 3 פטמות של אותה פרה והרביעית נשארה לביקורת (תמונה 9). ניתן היה לראות שאריות של חומר בשלושת הפטמות שהוטבלו אך בצורה פחותה מזו שנראה בניסוי הקודם (תמונה 10). בניסוי זה בוצעו שתי העברות של הפטמות כמתואר בשיטות וחומרים. לאחר הדגרה ראשונה התקבלו תוצאות דומות לניסוי הקודם והיכן שישנה שארית של חומר נצפה עיכוב גדילה של חיידקים. כמו-כן בצלחת הביקורת אין עיכוב גדילה (תמונה 11).

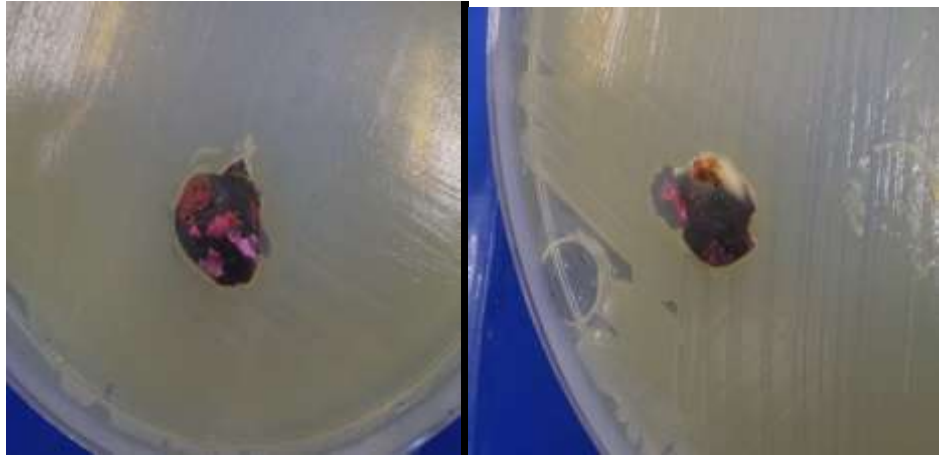
לאחר ההוצאה מאינקובציה ראשונה החתכים הנ"ל החוזרו למקרר 4 מעלות. יום לאחר מכן בוצעה העברה ראשונה של החתכים הקיימים לצלחת פטרי חדשה עם *E. coli (P4)*, ובנוסף בוצעו חתכים חדשים מאותן פטמות שנשמרו במקפיא. הועברו רק חתכים שהראו עיכוב בצלחות הראשונות. ניתן היה לראות שעדיין קיים עיכוב שהיכן שקיימת שארית של התכשיר (תמונה 12, תמונה 13). בצלחת הביקורת לא נצפה עיכוב צמיחה.

יום לאחר ההוצאה מהדגרה השנייה בוצעה העברה נוספת באותה הדרך. על מנת לנסות להדגים עיכוב מהחלקים הפנימיים של הפטמה בוצעו ניסיונות להשקיע את החתכים בתוך האגר בצורה אנכית ואופקית. בצורה זו החתכים לא הראו עיכוב צמיחה. החתכים הראשוניים שהועברו מהצלחת הראשונה עם מעט שארית של חומר עדיין הראו עיכוב צמיחה. עם זאת בשלב זה הרקמות כבר החלו להירקב וגדלו עליהן מיקרואורגניזמים המקשים על זיהוי עיכוב ברוב בחתכים במידה והוא אכן קיים. (תמונה 14).

**תמונה 10: שאריות התכשיר על הפטמה מה-**  
**25.04.2013.** אם משווים תמונה זו לתמונה מספר 5 ניתן  
לראות שיש כמות חומר נמוכה יותר. דבר זה נכון גם לגבי  
הפטמות האחרות בניסוי



**תמונה 11: דוגמא לחתכים עם התכשיר מה-25.04.2012 לאחר הדגרה ראשונה לעומת**  
**ביקורת.** ניתן לראות עיכוב גדילה של חיידקים על-ידי מגע עם התכשיר הצמוד לפטמה. מצד  
שמאל למטה נראית צלחת הביקורת שבה לא נראה עיכוב גדילה



תמונה 12: חתכי פטמות לאחר העברה ראשונה

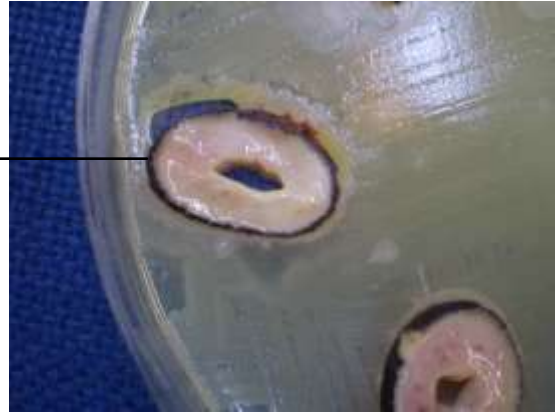


תמונה 13: חתך פטמה חדש שנשמר בהקפאה

חתך אנכי בתוך האגר



חתך שמושקע באגר



**תמונה 14: חתכי פטמות לאחר העברה שנייה.** ניתן לראות למעלה משמאל שעדיין קיים עיכוב בחתך שהועבר מהצלחת הראשונה

### דין ומסקנות:

מחקר זה הינו הראשון בארץ הבודק יישום החומר האנטיספטי CHX כטיפול מונע לדלקת עטין. חשיבותו נובעת במציאת אלטרנטיבה לשימוש הנרחב באנטיביוטיקה ברפת החלב העלול ליצור עמידויות, לגרום להימצאות חומרים מעכבים בחלב, וכתוצאה להביא לפסילתו. היתרון העיקרי של טבילת הפטמות בתכשיר הוא שתעלת מבוא הפטמה אינה נפגמת כלל וכך אין הפרעה ליצירת פקק הקרטין בנוסף לחסימה שתיווצר מה-CHX. התוצאות מראות שהתכשיר שפותח הוא בעל תכונות אנטימיקרוביאליות מתאימות, אך לעת עתה אינו יכול לשמש תחליף *In vivo* לתכשירים הקיימים בשוק.

הדרישה מחומר מעכב במבחן פטמות כרותות (פרוטוקול A) היא עיכוב של לפחות 3 לוגים של מיקרואורגניזם. על-פי תוצאות פרוטוקול A התכשיר משיג עיכוב של 3 לוגים עם או ללא נוכחות חומר אורגני (לעומת ריכוז החיידקים ההתחלתי) כאשר הוא פועל כנגד החיידק *E. coli* (טבלה 3). חשוב לציין כי פרוטוקול A בוחן חומר ל-20-30 דקות לאחר הטבילה ולכן לא ניתן להסיק מכאן שפעילותו תשמר לאורך זמן. על-כן בוצעה מודיפיקציה בניסוי והתכשיר נבחן לאורך זמן, כאשר פטמות טבולות בתכשיר נשמרו במקרר התכשיר שמר על רמה טובה של פעילות כנגד *E. coli* לאחר יומיים עם עיכוב של 2.5 לוגים (טבלה 4) אך פעילות זו הולכת ויורדת ללוג אחד לאחר שבוע ולאחר שבועיים היא עומדת על חצי לוג בלבד (טבלאות 5 ו-8). כנגד החיידק *Staphylococcus aureus* מושג עיכוב גדילה של 2.5 לוגים לאחר שבוע ללא נוכחות חומר אורגני ושל ל-1.5 לוג לאחר שבועיים (טבלאות 6 ו-9). לעומתם, כנגד *Strep. dysgalctiae* מושג עיכוב של לוג אחד בלבד לאחר שבוע, וחצי לוג לאחר שבועיים (טבלאות 7 ו-10). תוצאות ניסויים אלה זה משיגות את מטרת המחקר באופן חלקי. מחד התכשיר מראה יכולת עיכוב מספקת (בעיקר כנגד *E. coli* ו-*Staphylococcus aureus*) אך מאידך התכשיר אינו שומר על יכולת העיכוב הנדרשת לאורך זמן של שבועיים, שזוהי התקופה הרגישה ביותר בתקופת היובש לנגיעות חדשה בפתוגנים מחוללי דלקת עטין.

אמנם התכשיר פעל כנגד *Staphylococcus aureus* במעבדה, לא ברור אופן פעילותו כנגד חיידק זה בבעל-החיים. עבודות שונות מדברות על הבעיות במתן תוך עטיני של אנטיביוטיקה ובכך שהיא אינה אפקטיבית היות ואינה מתפזרת כראוי ואינה מגיעה לאזור המטרה. *Staphylococcus aureus* הינו תוך תאי (בתוך אפיתל ותאי דם לבנים-PMN) ויוצר רקמה צלקתית אשר מונעת מן החומר הפעיל להגיע לאזור המטרה. בנוסף רקמה צלקתית זו חסרת כלי דם ולכן גם מתן סיסטמי פחות יעיל. לא בוצעה בעבודה בדיקה של התכשיר כנגד *In vivo Staphylococcus aureus*. בנוסף יש לקחת בחשבון את האפשרות שזני המעבדה שנבדקו הם אינם הזנים הקיימים בבעל החיים.

בניסוי הפטמות הכרותות *In vitro* נצפה קוטר עיכוב בכל ימי הניסוי עבור כל אחד משלושת החיידקים (איור 1). המשמעות היא שעל-פי תוצאות ניסוי זה יכולת העיכוב של התכשיר נשמרת לאחר שבועיים. העלייה או ירידה של מילימטר בקוטר העיכוב בין הימים השונים אינה בעלת חשיבות שכן היא יכולה להיות מושפעת ממספר גורמים שלא נבדקו. הגורם לשובי יכולים לנבוע מגובה האגר בצלחת (ככל שהוא יותר גבוה קוטר העיכוב ייקטן), מכמות התכשיר שהפטמות נטבלו בו, מכמות החיידקים שהוזרעו על צלחת האגר ומאופי חיתוך הדיסקית (בכל פעם נחתך חלק גבוה יותר ברקמה). ייתכן וכי יכולת העיכוב נשמרה לאורך זמן הודות לכך ששהרקמות היו בתנאי מעבדה אופטימלים, ללא חיכוך שעשוי לקלף את התכשיר ובקירור.

בסדרת ניסויי ה-*In Vivo* נעשו עשרה ניסויים של טבילת פטמות במכון החליבה ברפת וולקני בבית דגן שמטרתם לפתח תכשיר אשר ישאר כמה שיותר על רקמת העטין וישחרר בשחרור מושהה את ה-CHX (טבלה 1). על אף הניסויים השונים להקטין גומרים אשר יגרמו לקילוף החומר- הישארות של חצי שעה במכון החליבה ושימוש בפרות יובש אשר אינן נחלבות התכשיר אינו נשאר ליותר מ-48 שעות וברוב הפרות כבר לא נראו עדויות לתכשיר כבר לאחר 24 שעות. קיימת אפשרות שגורמים אחרים כמו מרבץ רטוב, חיכוך שלרקמת העטין במרבץ וברגליים האחוריות גרם לקילוף של החומר. ההנחה שלא קיים יותר חומר עיכוב על הפטמה נעשתה על סמך בדיקה ויזואלית של הפטמה לנוכחות החומר שנצבע בורוד. על מנת לקבוע האם קיימת בכל זאת פעילות אנטימיקרוביאלית נלקחו הרקמות מבית המטבחיים לטובת ביצוע חתכים. כבר נמצא בעבודות *In vivo* של-CHX קיימת פעילות מעכבת כנגד מחוללי דלקת עטין. בעבודתם של (Petrovski et.al (2011) המחברים הראו שכמות המקרים הקליניים בתקופת היובש ולאחר המלטה היו הנמוכים ביותר בקבוצה עם אוטם המכיל CHX, לעומת קבוצה עם אוטם רגיל וקבוצת ביקורת. עבודתם מראה על פעילות ארוכת טווח של CHX. בחתכים שבוצעו בעבודתנו נראה שגם כן קיימת פעילות מעכבת של ה-CHX, אך היא קיימת רק היכן שנותר חומר שנצפה ויזואלית (תמונה 6). לקביעת פעילות בתוך הרקמה עצמה ולא רק על פני השטח בוצעו חתכים אורכיים ההחודרו בתוך האגר עצמו. על פי התוצאות לא נצפה עיכוב (תמונה 13). יש להטיל ספק בממצא זה היות וחתכים אלו לא בוצעו בחיתוך הראשון עם הבאת הרקמות למעבדה אלא רק לאחר מספר ימים. לכן, קיימת האפשרות שפעילות התכשיר כבר דעכה, שכן בניגוד לניסויי ה-*In Vitro* הרקמות לא הוחזקו כל הזמן בתנאי מעבדה אופטימלים. בנוסף הרקמות עצמן החלו להירקב תהליך אשר יכול להשפיע על יכולת העיכוב של התכשיר. ייתכן כי בניסוי של (Petrovski et.al (2011) נשמרה פעילות ארוכת טווח הודות לכך שהאוטם המכיל CHX עצמו נשאר פיסיית בתעלת מבוא הפטמה לאורך כל התקופה. כמו כן נבדקה השפעה של CHX נגד

*Streptococcus uberis* בלבד. עבודתו של Boddie et.al 1997 בדקה את השפעתו של CHX על *Streptococcus agalactiae* ו-*Staphylococcus aureus*. העבודה מצאה שטבילה בתכשיר המכיל 0.5% CHX הורידה את כמות המקרים החדשים של דלקות עטין. אך, עבודה זו בוצעה בפרות חולבות ולא בפרות בתקופת היובש. לכן, ייתכן שגורמים שונים כמו היחלבות הפרה (הגורם לניקוי בלוטת העטין, ומונע היווצרות לחצים על תעלת מבוא הפטמה) מסייעים במניעת היווצרות דלקת.

עדיין לא ניתן לקבוע חד משמעית האם התכשיר שפותח בעל פעילות אנטימיקרוביאלית מספקת לאורך זמן על מנת להחליף את השימוש באנטיביוטיקה כפי שנעשה היום. לעומת זאת, התוצאות הראשוניות מראות כי קיים פוטנציאל עיכוב. בעבודה ניתן להראות כי קיים עיכוב על פני השטח של הפטמה. עיכוב זה יכול לעזור בהקטנת המסה המיקרוביאלית באזור מבוא הפטמה אך השאיפה היא למנוע לחלוטין כניסה של חיידקים וזאת על ידי התקשות התכשיר בפתח מבוא הפטמה (תמונה 4) וחלחול התכשיר פנימה לתוך תעלת מבוא הפטמה (תמונות 1 ו-3). על-מנת לנסות ולהשיג מטרה זו בפרות חיות ניתן בעתיד לנסות דרך מתן תוך עטינית בדומה למה שנעשה עם אנטיביוטיקה היום. דרך זו עדיפה ממתן פומי או תוך שרירי כפי שנמצא במחקרים קודמים, אך שיטה זו מאבדת את היתרון העיקרי של הטבילה. הכנסת שפורפרת לתעלת מבוא הפטמה פוגם בה ויפגע ביכולת התעלה ליצור את הפקק שמהווה את המחסום הפיסי המונע כניסה של מק"א. היות ופעילות מערכת החיסון בבלוטת העטין חלשה קיימת סכנה גבוהה לנגיעות חדשה והתבססות של זיהום. המתן התוך עטיני באנטיביוטיקה מספק הגנה גם באזור האלבאולות בבלוטת החלב ולכן ניתן להסתכן בפגיעה קלה בתעלת מבוא הפטמה. במידה ויבוצע ניסיון לעשות זאת עם CHX יש לעשות זאת בזהירות שכן אין אנו יודעים אם הוא יכול לפעול באזורי בלוטת העטין השונים. בנוסף, יש לוודא שהתכשיר אינו מגרה את הרקמה.