23.05.2022

דו"ח סיכום לעבודת מחקר

705-0077-21

- שם העבודה בעברית:

מניעה של דלקת עטין חיידקית בפרות חולבות בתקופת היובש ע"י מתן תוך עטיני של פורמולציה לשחרור מושהה של כלורהקסידין

- שמות החוקרים:

ערן לביא ומיכאל פרידמן

- מוסדות החוקרים:

האוניברסיטה העברית בירושלים

- שנת פרסום המחקר:

2022

תקציר

תעשיית החלב בישראל מובילה בתנובת חלב גבוהה, הודות לפיתוחים טכנולוגיים והשבחה גנטית. עם זאת, העלייה בתנובת החלב תורמת לסיכון להתפתחות דלקת עטין. דלקת עטין, נגרמת לרוב כתוצאה מחדירה של מיקרואורגניזמים לתעלת הפטמה ולעטין. דלקת זו פוגעת ברווחת הפרה, גורמת לירידה בייצור החלב, לפסילת החלב ונזק כלכלי משמעותי. הטיפול המועדף כיום המשלב גם גורם מניעתי הוא טיפול היובש (DCT) , הכולל מתן תוך עטיני של אנטיביוטיקה בתחילתה של תקופת היובש, כחודשיים לפני ההמלטה, ואפקטיבי לכ-30 ימים בלבד מתחילת התהליך. מרבית הרפתנים משתמשים בטיפול יובש סלקטיבי (SDCT), קרי, הטיפול מותנה בזיהום תוך-עטיני, אך הרוב משתמשים בטיפול יובש גורף (BDCT), ובכך תורמים לעליה בעמידותם של חיידקים רבים לאנטיביוטיקה. לעמידות זו, השפעה דרמטית על בריאות הציבור. קיים צורך לכן למצוא תחליף לא אנטיביוטי יעיל לטיפול היובש, אשר ישמש הן כטיפול בדלקות עטין קיימות והן למניעת נגיעות חדשה. לשם כך, פותח תכשיר המכיל כלורהקסידין כחומר פעיל אנטי-מיקרוביאלי ופולוקסמרים המשמשים כנשא תרמוסנסיטיבי לצורך שחרור מושהה. מטרת המחקר הייתה לבחון את יעילות התכשיר *in vitro* ולבחון את בטיחותו *in-vivo*. בוצעו מספר ניסויי *in-vitro*, אשר כללו מדידת עיכוב צמיחת חיידקים בצלחות אגר, תמיסות סליין וחלב, וקביעת ה- Minimal inhibitory (MIC) concentration של התכשיר כנגד מספר מיני חיידקים הנפוצים כמחוללי דלקות עטין. התוצאות מציגות יעילות טובה של התכשיר בהשוואה לאנטיביוטיקה מקובלת ולמחקרים קודמים. בשלב הבא נבדקה הבטיחות של התכשיר *in-vivo* בשימוש תוך-עטיני ונמצא שהתכשיר בטוח לשימוש הן לפרות והן לבני אדם.

המחקר כלל בדיקת שאריות של כלורהקסידין באברים וברקמות שכללו: כבד, כליה, שריר, שומן, עטין ופטמת עטין. בנוסף נעשתה בדיקה פתולוגית והיסטולוגית של העטין על מנת לשלול נזק אפשרי של התכשיר לרקמות אלו. מהתוצאות שהתקבלו לא נמצאה עדות לנזק כלשהו לעטין. רמות הכלורהקסידין שנמצאו באברים שנדגמו כמו גם ברקמות היו זניחות. לפיכך נראה שניתן להשתמש בפורמולציה שפותחה במהלך תקופת היובש בפרות חלב. במחקר המשך עתידי נרצה לבדוק את יעילות הפורמולציה במניעת דלקות עטין בפרות חלב.

Abstract

The Israeli dairy industry leads on high milk yield worldwide, due to technological development and genetic enhancement. Nevertheless, the high milk yield increases the risks of mastitis. Mastitis is caused mainly by microorganism infection of the mammary gland. The inflammation affects the cow's welfare, causes a decrease in milk production and quality, leading to significant economic losses. The common practice nowadays to prevent mastitis is Dry Cow Therapy (DCT), which includes intra-mammary administration of antibiotics at the beginning of the dry period, 8 weeks before calving, and needs to be effective for approximately 30 days. Most dairy farmers use Selective Dry Cow Therapy (SDCT), i.e. only infected glands are treated, but some still use Blanket Dry Cow Therapy (BDCT), that may promote antibiotics resistance in bacteria. This resistance has a major effect on public health. Thus, effective alternatives for antibiotic DCT are needed to treat both current and new infections. A formulation containing chlorhexidine as a non-antibiotic antimicrobial agent and poloxamers as a thermal stabilizer for slow-release administration was developed. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of this formulation *in vitro* and its safety *in-vivo*. Several *in-vitro* experiments were performed including measurement of bacterial growth inhibition on agar plates, saline and milk solutions and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) against common mastitis pathogens. The results indicate good efficiency of the chlorhexidine slow-release formulation in comparison to antibiotics and to previous research. *In-vivo* experiments showed that the intra-mammary formulation was safe to the cow as well as for people. Organs that were checked for residues of chlorhexidine included: liver, kidney, fat, muscle, udder and teats.

Pathological and histological examination of the udder was done in order to find out whether there is any kind of damage by the device. According to our finding there was no any harm to the udder. The concentrations of chlorhexidine in the organs and tissues were found to be neglectable. It seems that the developed formulation is safe for use in dairy cows during the dry season. In future studies, we would like to evaluate the efficacy of the developed formulation in prevention of bovine mastitis.

מבוא

דלקת עטין (Mastitis), נגרמת לרוב על ידי מיקרואורגניזמים, ברובם חיידקים, החודרים לעטין באמצעות תעלת מבוא הפטמה, משגשגים בו ומשרים דלקת (1). מחלה זו נפוצה ברפתות החלב ברחבי העולם, ונחשבת כמחלה התדירה ביותר ברפת. לדלקת עטין השלכות כלכליות רבות, כתוצאה מירידה בייצור ואיכות החלב, הוצאה מוקדמת של פרטים, טיפול וטרינרי ורווחת החיה (2).

מבנה העטין משמש כקו ההגנה הראשון כנגד זיהום חיצוני. סביב תעלת הפטמה ישנו סוגר שרירי, שבכיווצו נמנעת זליגת חלב וכניסה של פתוגנים. כמו כן, בין החליבות, התאים בתעלת הפטמה מייצרים פקק עשוי קרטין אשר אוטם את פתח העטין ולו תכונות המעכבות שגשוג חיידקים. במידה והעטין עובר טראומה, למשל ניקוי פטמות לא היגייני במהלך החליבה, חליבת יתר ועוד, מבנה פתח העטין עשוי להיפגע, דבר המקל על פלישת פתוגנים. לאחר החליבה, הסוגר השרירי בתעלת הפטמה נשאר רפוי למשך שעה-שעתיים, ובזמן זה פתוגנים מהסביבה יכולים לפלוש דרך התעלה אל בריכת החלב ונאדיות העטין.

קו ההגנה השני, הוא התגובה הדלקתית שמתפתחת עקב שגשוג הפתוגנים בעטין. עוצמת התגובה הדלקתית תלויה בסוג הפתוגן, מספר התחלובה, גיל הפרה, מצבה החיסוני, גנטיקה ותזונה (1).

תקופת היובש, אשר משכה בין 50-60 יום, היא שלב במחזור החיים של פרות החלב ברפת, הקריטי לבריאות העטין. במהלכה, תאי האפיתל ברקמת העטין עוברים תהליך רגנרציה ופגוציטוזיס ומוחלפים בתאים חדשים. כתוצאה מכך, ייתכן ריפוי של דלקת עטין אף ללא התערבות. תקופה זו היא אופטימלית לטיפול בדלקות עטין קיימות, אולם העטין בסיכון מוגבר להדבקה בדלקות עטין חדשות (3). נמצא כי ככל שתקופת היובש ארוכה יותר כך הסכנה לנגיעות חדשה בעטין גבוהה יותר (4).

לדלקת עטין שני מופעים. המופע הקליני, מתבטא בהפרשות אבנורמליות מהעטין, חום, בצקת וירידה משמעותית בייצור ואיכות החלב ועלייה חדה בספירת התאים הסומטיים (סת"ס) בחלב (5). המופע התת-קליני, הוא הנפוץ יותר בעדרי החלב, ומתבטא בירידה מתונה בייצור ואיכות החלב, ועליה בסת"ס, שהינם תאי דם לבנים המגויסים לעטין בתגובה לדלקת (6). קיום שני מופעים אלה בתחילת התחלובה, מצביעים

על חשד שהדבקה התרחשה במהלך תקופת היובש (3). הפתוגן אשר גורם למופע הקליני הוא במרבית המקרים *Escherichia coli*, ואילו הפתוגנים אשר גורמים בדרך כלל למופע התת-קליני במרבית המקרים הם חיידקים מהסוג *Staphylococcus*. קיימים פתוגנים שהדבקה בהם יכולה לעורר את שני המופעים, למשל *non-agalactia streptococci* (7).

החיידקים הפתוגנים נחלקים לשתי קטגוריות כתלות בדרך ההדבקה. הקטגוריה הראשונה היא חיידקים מדבקים, ביניהם *S. aureus* ו-*Streptococcus agalactiae*, אשר נמצאים בעטין ומועברים בין הפרות על ידי ציוד החליבה. הקטגוריה השנייה היא חיידקים סביבתיים, ביניהם *E.coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* ו- Klebsiella, אשר פולשים לעטין מהסביבה, לרוב בין החליבות, ומהווים זיהום אופורטוניסטי. מאחר ופעולות השליטה בשתי הקטגוריות שונות, האבחון של הגורם הספציפי הוא חיוני (8) .

כ35% מהמקרים של דלקת עטין קלינית נגרמים על ידי הדבקה בחיידקים קוליפורמים, הנפוץ בהם הוא *E.coli*. מחקרים קודמים הראו כי לרוב אין צורך בטיפול אנטיביוטי במקרים אלה, מפני שהחלמה ספונטנית נפוצה, ויעילות הטיפול מוגבלת עקב המהירות בה הדלקת מתפתחת, למעט מקרים חמורים בהם יש לטפל סיסטמית (3).

קבוצת החיידקים Coagulase negative staphylococcus (CNS), ביניהם *Staphylococcus chromogenes* ו- *Staphylococcus haemolyticus*, הם בין הפתוגנים הנפוצים ביותר המבודדים מדלקות עטין קליניות ותת-קליניות ברפתות החלב. העמידות לחיידקים אלה עולה עם השנים כתוצאה משימוש לא מושכל באנטיביוטיקה ויכולתם של חיידקים אלה לייצר ביופילם (9).

למרות המאמצים הרבים המושקעים במניעה וטיפול בדלקת עטין, השכיחות שלה בקרב רפתות חלב ברחבי העולם אינה פוחתת. הסיבה לכך, היא ככל הנראה סלקציה לתכונות גנטיות הכוללות תנובת חלב גבוהה, אשר לא באות יחד עם תכונות רצויות אחרות כמו עמידות לדלקות עטין. (10).

מחקר קודם הצביע על קשר בין היארעות דלקת עטין ובין מספר התחלובה. היארעות המופע הקליני גבוהה יותר בפרות בתחלובה ראשונה, בייחוד בתקופה של כחודש לאחר ההמלטה. ייתכן ועובדה זו קשורה בכך שלפרות בתחלובה ראשונה צרכים אנרגטיים גבוהים יותר שכן הן עדיין בתהליך גדילה, ומסיבה זו הנזק הפיזי והכלכלי כתוצאה מדלקת העטין גבוה יותר. כמו כן, הפתוגנים שנמצאו בדגימות מדלקת עטין חיידקית במבכירות היו שונים מאלו בפרות בתחלובה גבוהה. במבכירות, המצאות גבוהה יותר של *S. uberis* ו- CNS, ואילו המצאות נמוכה של החיידק *S. aureus* (11).

אחוז נכבד מסך מקרי דלקת העטין הקלינית ברפתות החלב הם מקרים חוזרים. ישנם מספר פקטורים הנחשבים כתורמים לעובדה זו : גיל מבוגר יותר, ספירת תאים סומטיים גבוהה, היסטוריית הפרה במהלך החודשים האחרונים והיסטוריית דלקות העטין במהלך התחלובות האחרונות. במקרים הנקובים, אין צפי

לשיפור באמצעות טיפול אנטיביוטי ולכן זה אינו מומלץ, אלא אם כן המצב חמור ויש צורך בטיפול סיסטמי (3).

שימוש באנטיביוטיקה בתעשיית החלב מיועד בעיקר לשליטה בדלקות עטין חיידקיות. הטיפול בהן חיוני למניעת כאב כחלק מדאגה לרווחת החיה, הורדת סיכון להדבקה בעדר וממניעים כלכליים כגון מניעת ירידה בייצור ותנובת החלב. השימוש מחולק לטיפול בדלקת עטין קיימת ולמניעת זיהומים חדשים. דלקת עטין קלינית מטופלת לרוב בטיפול מקומי של אנטיביוטיקה במתן תוך-עטיני, ובמצבים חמורים במתן פראנטרלי. כמו כן, טיפול מקומי זה משמש בנוסף כמניעת נגיעות חדשה, וניתן ביום הראשון של תקופת היובש, 6-8 שבועות לפני ההמלטה. טיפול זה מומלץ לכל הפרות בתקופת היובש ונקרא Dry cow therapy (DCT). בשנת 2015, נעשה סקר צרכנים בגרמניה, בו התגלה כי 27% בלבד מהשימוש באנטיביוטיקה מיועד לטיפול בדלקת עטין קלינית, ואילו 73% מהשימוש בה מיועד ל-DCT. לטיפול זה שני תפקידים, הראשון הוא אלימינציה של הפתוגן גורם הדלקת, והשני מניעה של הדבקה חדשה במהלך תקופת היובש. טיפול זה נמצא אפקטיבי פי 1.78 בהשוואה להחלמה ספונטנית (3). עם זאת, ככל שתקופת היובש מתארכת יעילות הטיפול יורדת, זאת מכיוון שריכוז החומר האנטי-בקטריאלי יורד מתחת לריכוז האפקטיבי. מכך, שילוב מומלץ שהוצע במחקרים אחרונים הוא טיפול DCT בתוספת אטם פטמה מלאכותי העשוי מתכת טיטניום דיאוקסיד ו- 65% bismuth subnitrate. היתרון בשילוב זה נובע מכך שלאטם הפטמה המלאכותי מספר תכונות אשר משפרות את פעילות המניעה של דלקת העטין בנוסף לאנטיביוטיקה, בעיקר במניעת נגיעות חדשה. למשל, האטם אינו מושפע מאורכה של תקופת היובש, ותפקידו להוות חסם פיזי כנגד פתוגנים החודרים דרך תעלת הפטמה הפתוחה לסביבה לאחר התחלובה. עם זאת, הוא אינו מספיק יעיל במתן לבדו, ובכ-40% מהמקרים אטם זה נכשל במניעת הדבקה חדשה, מפני שאינו מכיל חומר אנטי-בקטריאלי. לכן השימוש בו צריך להיעשות בצורה אספטית, וישנו קושי ליישם זאת בתנאי סביבה ובידיים לא מיומנות, אשר יכולות בעצמן להכניס מזהמים במהלך פעולת ההזרקה (4). שיטת ה-DCT , אשר הייתה נהוגה ברפתות החלב משנת 1970, היא BDCT (Blanket dry cow therapy) בה כל רבעי העטין של כלל הפרות ברפת עברו טיפול מונע בכניסה לתקופת היובש. עם התפתחות עמידותם של חיידקים ברחבי העולם, שונה אופן הטיפול ל- SDCT (Selective dry cow therapy), בו רבעים עם ספירת תאים סומטיים נמוכה לא עוברים את הטיפול האנטיביוטי המניעתי. לפי סקרים שנערכו, לא נראה כי שינוי זה הפחית את שיעור החיידקים העמידים באופן משמעותי, אך כן הפחית עלויות לבעלי הרפתות (12).

השאיפה היא לאבחן את סוג החיידק הספציפי לפני מתן הטיפול האנטיביוטי. הכלים האבחוניים האמינים ביותר הם תרבית בקטריולוגית ובדיקת PCR. עם זאת, עוברים מספר ימים עד קבלת תוצאות הבדיקות, ובזמן זה מתקבלת לרוב החלטה על תחילת מתן אמפירי של אנטיביוטיקה. מחקרים מראים

שכ-50% מהטיפולים האמפיריים לא מהווים כיסוי מתאים לחיידק אשר נדגם. כמו כן, כפי שהוזכר לעיל, במקרים בהם נדגם חיידק גראם שלילי, בעיקר מקבוצת הקוליפורמים, אין צורך בטיפול אנטיביוטי, וזאת בניגוד למקרים בהם נדגם גראם חיובי אשר דורש טיפול אנטיביוטי. עובדה זו מדגישה גם היא את הצורך ההכרחי באבחון הפתוגן (3).

הצלחת הטיפול האנטיביוטי מוגבלת, ולשאריות האנטיביוטיקה בחלב תרומה להתפתחות עמידות. מסיבות אלה, ישנם ניסיונות למציאת טיפול אשר יחליף את השימוש באנטיביוטיקה, הן כטיפול בדלקת עטין קלינית והן כמניעת זיהום בתקופת היובש. המטרה העיקרית היא להוריד את קצב ההדבקות החדשות, New infection rate (NIR) , בתקופת היובש ובתחלובה העוקבת (3).

בשנת 2014, ממשלת בריטניה פרסמה מסמך בנוגע לנתוני העמידות לאנטיביוטיקה ברחבי העולם. נכון לשנה זו, 700,000 בני-אדם בשנה מתים מזיהומים הנגרמים על ידי חיידקים עמידים. כותבי המאמר טענו שאם לא יימצא פתרון להפחתת העמידות של חיידקים לאנטיביוטיקה, עד שנת 2050 מספר המתים יעלה ל-10 מיליון בשנה (13). כתוצאה מכך, ארגוני הבריאות העולמיים החלו בפעולות כנגד התפתחות עמידות לאנטיביוטיקה הן ברפואה הומנית והן ברפואה הווטרינרית. כחלק מפעולות אלה, ארגון הבריאות האירופאי, EMA (European Medicines Agency) , חילק את מגוון החומרים האנטיביוטיים הזמינים לשלוש קטגוריות, כאשר רק בשתי הקטגוריות הראשונות נעשה שימוש ברפואה וטרינרית. הקטגוריה הראשונה כוללת חומרים שהשימוש בהם כרוך בסיכון נמוך לבני-אדם. השימוש בהם בתעשיית החלב היה נרחב, ובבדיקות לחומרים מעכבים בחלב הנדרשות כחוק, הם נמצאו בקלות עקב רגישותן הגבוהה של הבדיקות, עובדה אשר הובילה לתקופות המתנה ארוכות ושימוש מוגבל בחומרים אלה בפועל כתוצאה מהנזק הכלכלי הנלווה (קרי, פסילת חלב עם שאריות אנטיביוטיקה). הקטגוריה השנייה, כוללת חומרים אנטיביוטיים המיועדים גם לטיפול בפרות חלב, אבל בעלי חשיבות גבוהה ברפואה הומנית, כדוגמת פלורקווינולונים וצפלוספורינים דור 3 ו-4, בייחוד אם האינדיקציה היא מתן סיסטמי. לכן השימוש בקטגוריה זו מוגבל למצבים בהם אין אלטרנטיבה טיפולית או כאשר נתקלים בעמידות (3).

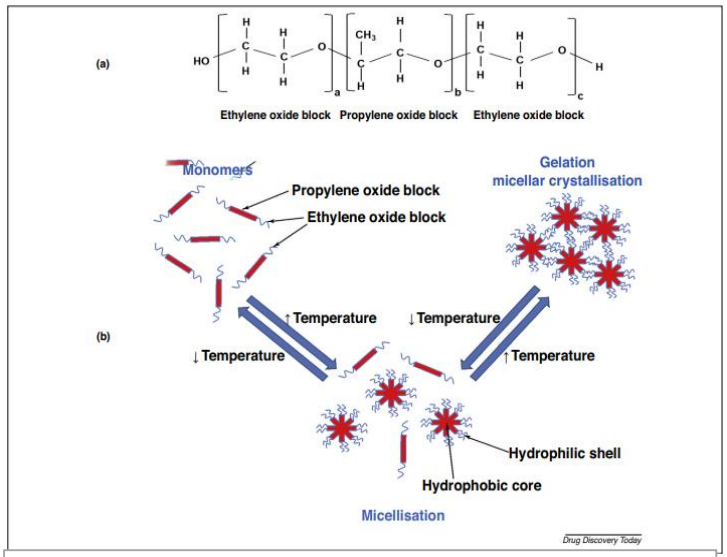
במשך עשרות שנים, היו ניסיונות רבים לפיתוח חיסון כנגד הפתוגנים אשר גורמים לדלקת עטין, כדוגמת *E.coli* ו-*S. aureus*, אשר ימנע הדבקה חדשה והתפתחות דלקות עטין. אולם, החיסונים השונים מראים יכולת הגנה מוגבלת למדי. אלטרנטיבות טיפול נוספות כללו טיפולים ביולוגיים, כגון חיידקים לקטובצילים שמשמשים כפרוביוטיקה בעטין, להורדת נגיעות חדשה ועיכוב יצירת ביופילם. עם זאת, אלטרנטיבת טיפול זו הראתה יעילות *in-vitro* בלבד. כמו כן, בוצעו ניסיונות לשימוש בחומרים אימונומודולטורים, דוגמת לקטופרין, שהראו יעילות, אך המחקרים לא היו אמינים דיים וכן החומרים עדיין לא זמינים (3).

חומר נוסף בו נעשה שימוש גובר לאורך השנים בטיפול בזיהומים הוא כלורהקסידין (Chlorhexidine). כלורהקסידין הוא חומר אנטיספטי, לא אנטיביוטי, אשר נמצא בשימוש נרחב לחיטוי העור ורקמות מוקוטיות, בייחוד ברפואת השיניים. האפקט האנטי-מיקרוביאלי של כלורהקסידין הוא תלוי ריכוז. כלורהקסידין הוא קטיון, ומכך מנגנון הפעולה שלו כולל היקשרות לפוספוליפידים טעונים שלילית בממברנת החיידקים. בריכוז נמוך, פעילותו בקטריוסטטית, ובהיקשרותו הוא משנה את המאזן האוסמוטי של תא החיידק ובכך מעכב את שגשוגו. בריכוז גבוה, פעילותו בקטריוצידית, ובכך גורם לציטוליזיס של תא החיידק. כלורהקסידין יעיל בעיקר נגד חיידקים גראם חיוביים, אך גם כנגד מספר פטריות, וירוסים ושמרים. מספר עדויות הראו שהוא יעיל גם כנגד זנים עמידים של החיידק *S. aureus*. בנוסף, נצפתה יעילות מסוימת של החומר כנגד חיידקים גראם שליליים, עם זאת, נמצא קשר ישיר בין עמידותם של חיידקים גראם שליליים לאנטיביוטיקה ובין עמידותם לכלורהקסידין. מספר מחקרים (25,26,27), מצאו כי לכלורהקסידין אפקט ציטוטוקסי וציטופטי על תאים הומניים, אפקט זה תלוי זמן וריכוז. למשל, תמיסה ובה כלורהקסידין בריכוז 0.02% הראתה אפקט ציטוטוקסי משמעותי על תאים דמויי-אודונטובלסטים אשר נבדקו במחקר. כמו כן, בריכוז גבוה נמצא כי החומר גורם לגירוי של ממברנות מוקוטיות, אך תופעה זו הפיכה בהפסקת השימוש (14).

כאמור, מולקולת הכלורהקסידין היא קטיון בסיסי אשר אינו מסיס במים, ולכן תעשיית התרופות משתמשת בפועל במלחים שלו, כדוגמת chlorhexidine diacetate ו-chlorhexidine digluconate. השימוש ב- chlorhexidine digluconate נפוץ יותר מפני שהוא המלח המסיס ביותר במים מבין מלחי הכלורהקסידין, עובדה זו מקלה ומוזילה את השימוש. תמיסות הכלורהקסידין עמידות לעליה בטמפרטורה עד 100 מעלות צלזיוס, וה-pH האופטימלי לפעילותן הוא בין 5.5-7.0. יעילותן פוחתת בנוכחות חומרים אורגניים (14).

במחקר משנת 2011, נעשה שימוש באטם פטמה מלאכותי שהכיל כלורהקסידין בריכוז 0.5%. אטם זה הוכנס לתעלת הפטמה בחליבה האחרונה, לפני הכניסה לתקופת היובש. הטיפול הראה יעילות גבוהה במניעת נגיעות חדשה בהשוואה לאטם פטמה מלאכותי ללא כלורהקסידין או ללא טיפול כלל (4).

על רקע מגבלותיו של אטם הפטמה המלאכותי אשר הוזכרו לעיל, ייעשה ניסיון בעבודה זו בשימוש בפולוקסמרים, אשר אם יעילותם תוכח, יוכלו להוות תחליף לתפקידו של אטם הפטמה. פולוקסמרים הם פולימרים סינתטיים אשר משמשים כמערכת ג'ליזציה תרמוסנסיטיבית בעלת יכולת לעבור ממצב נוזל לג'ל-מוצק, ולהיפך, תחת שינוי טמפרטורה. רוב מערכות אלה, מראות את שינוי ההתנהגות בטמפרטורה הקרובה לטמפרטורת הגוף, ולכן משמשים בתעשיית התרופות כחומר נשא. סיבה נוספת לשימוש בהם היא יכולתם להישאר יציבים בסטרילזציה בקיטור ויכולתם לשחרר חומרים רבים המצרפים אליהם ביעילות גבוהה.



תמונה 1 : מנגנון הפעולה של פולוקסמרים.

ההרכב הכימי של הפולוקסמר הוא סורפקטנט לא יוני, אשר מכיל פולימר פחמני עם זנבות הידרופיליים. כאשר הטמפרטורה עולה, נוצרים קשרי ואן-דר ולס רבים יותר בין הפולימרים ונוצרת מיצלה ברמת נוזליות נמוכה עד כדי מרקם ג'ל. תהליך זה הפיך, כאשר הטמפרטורה יורדת הקשרים בין הפולוקסמרים ניתקים והמרקם הופך נוזלי. הפולוקסמרים הנפוצים ביותר בתעשיית התרופות הם פולוקסמר 407 ו-188, מכיוון שמסיסותם במים טובה, צלילותם גבוהה, ונמצאו פחות איריטנטים לרקמות (15).

השערת העבודה

התכשיר המבוסס על פורמולציה לשחרור מושהה של כלורהקסידין על ידי תרכובת פולוקסמרים, יראה יעילות אנטי-מיקרוביאלית *in vitro* כנגד חיידקים המהווים פתוגנים נפוצים בדלקות עטין בפרות חלב וימצא בטוח בשימוש *in vivo*.

מטרת המחקר

לבחון *in vitro* את הפעילות האנטי-מיקרוביאלית של התכשיר המכיל כלורהקסידין בשחרור מושהה, כנגד מיני החיידקים הנפוצים בדלקות עטין בפרות חלב ולבחון את בטיחותו במתן תוך עטיני *in vivo* .

שיטות וחומרים

1. פיתוח התכשיר האנטיספטי

התכשיר האנטיספטי פותח בביה"ס לרוקחות, הדסה עין-כרם במעבדתו של פרופ' פרידמן. התכשיר מבוסס על מערכת נוזלית מבוססת פולוקסמרים, המשמשת כחומר נשא לחומר הפעיל כלורהקסידין דיאצטט (CHX DIA). (שם היצרן Sigma- Aldrich ושם החומר בו נעשה שימוש הוא Chlorhexidine diacetate salt hydrate, מספר מוצר C6143).

למחקר זה פותחו שני תכשירים השונים ביניהם בקצב השחרור של החומר הפעיל. הוספת NaCl (sodium chloride) לתכשיר גרמה לחיזוק קשרי הון-דר ולס בין השרשראות הפולימריות של הפולוקסמרים, לייצוב התמיסה וכך לשחרור איטי יותר של החומר הפעיל (16).

1.1 מפרט חומרים

CHX DIA 2

Material	Amount (wt%)
Poloxamer 407	17.5
Chlorhexidine diacetate	2.9
Double-distilled water	79.6

CHX DIA 5

Material	Amount (wt%)
Poloxamer 407	17.3
Chlorhexidine diacetate	2.9
Sodium chloride	0.7
Double-distilled water	79.1

CHX DIA 2 Placebo

Material	Amount (wt%)
Poloxamer 407	17.5
Double-distilled water	79.6

CHX DIA 5 Placebo

Material	Amount (%wt)
Poloxamer 407	17.3
Sodium chloride	0.7
Double-distilled water	79.1

2. עבודה ניסויית

2.1. בדיקת עיכוב צמיחת חיידקים בצלחות אגר

2.1.1 מדידת קוטר העיכוב הנוצר מעיכוב צמיחת החיידקים בהשפעת התכשיר בהשוואה לאנטיביוטיקה

ניסוי זה השווה בין עיכוב צמיחת החיידקים בהשפעת אנטיביוטיקה ובהשפעת התכשיר הנבדק.

החיידקים אשר עיכובם נבדק בניסוי הם:

שם החיידק	זן החיידק והמאגר אליו משויך
E. coli P4	NTCC - 702070
S. aureus	KVI- 2449
S. haemolyticus	KVI-1
S. uberis	KVI-9959
S. dysgalactiae	KVI-3685

חיידקים אלה, הם בידודים מדלקות עטין קליניות בשדה, ונבחרו לניסוי זה מכיוון שהם בין העיקריים הגורמים לדלקות עטין ברפתות החלב בארץ. בכל אחד מהניסויים הייתה הקפדה לבדוק גם חיידק גראם חיובי וגם חיידק גראם שלילי לשם השוואה.

תחילה, הוכנה תמיסה בריכוז קבוע של מושבות חיידקים (Colony forming unit) לכל אחד מהחיידקים הנבדקים. התמיסה הוכנה על ידי לקיחת מושבות מכל צלחת זרועה בחיידק בעזרת מחט בקטריולוגית, וערבובן במבחנה אשר הכילה 5 מ״ל 0.85% saline סטרילי. המושבות הוספו למבחנה עד הגעה לריכוז של 10^8CFU/ml. ריכוז זה נמדד באמצעות מכשיר McFarland reader.

לאחר מכן, כל חיידק נזרע על צלחת אגר נפרדת מסוג Mueller-Hinton בעזרת מטוש סטרילי. מצע זה לא סלקטיבי ולכן רוב החיידקים צומחים עליו, כמו כן מכיל עמילן אשר סופג טוקסינים של החיידקים כך שהם לא מפריעים לפעילות האנטיביוטיקה והכלורהקסידין. בנוסף, מצע זה דליל ומכך מאפשר דיפוזיה טובה של החומר ולמדידת קוטר עיכוב אמינה יותר והוא מהווה מצע סטנדרטי לבדיקות עמידות לאנטיביוטיקה (17).

לאחר הזריעה, והמתנה של 5 דקות להתייבשות המצע מזריעת החיידקים, נוקבו 6 באריות במצע, בקוטר 7 מ״מ, תוך שימוש בחלקה העגול של פיפטת פסטר סטרילית. שתי באריות מולאו בנפח של 70 מיקרו-ליטר מתכשיר ״CHX DIA 2״, או לחילופין בנפח של 60 מיקרו-ליטר מהתכשיר ״CHX DIA 5״ (מכיוון שמרקמו סמיך יותר), שתי באריות נוספות מולאו בנפח של 70 מיקרו-ליטר מהאנטיביוטיקה Nafpenzal DC® . תכשיר זה הוא הרווח כיום בשימוש בטיובות המוחדרות לעטין הפרות בתקופת היובש, המכיל: Procaine benzylpenicillin 300mg/3g, Dihydrostreptomycin sulfate 100mg/3g ו- Nafcillin as Nafcillin sodium 100mg/3g. שתי הבאריות הנותרות מולאו בפלסבו של כל אחד משני סוגי התכשירים האנטיספטיים, 60 מיקרו-ליטר מהפלסבו של תכשיר CHX DIA 5 ו-70 מיקרו-ליטר מהפלסבו של תכשיר CHX DIA 2 בהתאמה.

לכל אחת מהצלחות הנ״ל בוצעו שתי חזרות.

לאחר ההכנה, הצלחות הודגרו בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה, כאשר פני הצלחת כלפי מעלה על מנת שהחומרים שהוספו לא יישפכו. בבוקר למחרת נמדד קוטר העיכוב סביב כל אחת מהבאריות בצלחת האגר באמצעות סרגל.

האנליזה הסטטיסטית שנעשתה לניסוי זה היא מבחן Wilcoxon למדגמים תלויים, בתוכנת SPSS.

<u>2.1.2 בדיקת עיכוב צמיחת החיידקים בצלחות אגר בהשפעת התכשיר לאורך זמן</u>

לניסוי הקודם נעשתה וריאציה אשר מטרתה הייתה לשלב את הערכת קוטר העיכוב עם הערכת השחרור המושהה של החומר הפעיל מהנשא. לשם כך, התכשיר הוכנס אל קשי שתייה מפלסטיק שנחתכו בגדלים שווים של 2 ס״מ, ומוקמו על זכוכית נושאת. לאחר הכנסת התכשיר, הזכוכית הועברה בלהבת בונזן בזהירות, על מנת להפוך את מרקם התכשיר לג׳ל באמצעות הפולוקסמרים שבהרכבו. טרם הכנסת הקשים אל צלחות האגר, הן חוממו לטמפרטורה של 45°C על מנת לשמור על התכשיר במצב ג׳ל. עקב מבנה הקש, החומר עבר דיפוזיה מהחלק התחתון בלבד של הבארית בה מוקם הקש. צלחות האגר הוכנסו לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה. יום למחרת נמדד קוטר העיכוב, ולאחר מכן הקש ובתוכו החומר הועבר לצלחת אגר זרועה חדשה לאחר חימומה ב-45°C. ניסוי זה לא צלח מכיוון שהחומר זלג מהקשים למרות חימומו לטמפרטורה המתאימה בו מרקמו הופך לג׳ל. מסיבה זו, ניסוי זה בוצע בשנית תוך שימוש בצינור אינפוזיה (infusion extensor line) חתוך בגדלים שווים. ניסוי זה היה מוצלח יותר כיוון התכשיר שמר בו על מרקם הג׳ל טוב יותר. בוצעו 3 העברות לצלחות אגר חדשות, מדי שבוע, למשך 3 שבועות.

<u>2.2 בדיקת פעילותו הבקטריוצידית של התכשיר בעזרת בניית מערכת שחרור-מושהה</u>

ניסוי זה פותח על ידי הסטודנטית מיטל מרחבי, ד״ר שלמה בלום, פרופ׳ ערן לביא, ד״ר דוד קירמייר מביה״ס לרוקחות ועבודת התזה של ד״ר ברנרד פונק (18).

החיידקים אשר עיכובם נבדק בניסוי הם:

שם החיידק	זן החיידק והמאגר אליו משויך
E. coli	702070 - NTCC
S. aureus	2449 -KVI
S. haemolyticus	1-KVI
S. uberis	9959-KVI

2.2.1 תשתית הניסוי

הניסוי בוצע בתוך אמבט שמידותיו: 39.2 ס״מ אורך, 29.2 ס״מ רוחב, ו-16.5 ס״מ גובה. האמבט מולא במי-ברז עד לגובה 8.5 ס״מ והוכנס לחדר חום בטמפרטורה של 37°C, למשך הלילה.

ביום למחרת, הוכנה מבחנת התכשיר. למבחנת אפנדורף הוסף נפח של 1 מ״ל מהפורמולציה CHX DIA 2.

לאחר מכן, הוכנסה המבחנה לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך 5 דקות, עד להפיכת מרקם התכשיר לג׳ל.

מבחנה זו הוכנסה בעזרת פינצטה סטרילית אל מבחנה גדולה יותר. לשם כך, הפקק של מבחנת האפנדורף נפתח וקופל כלפי חוץ על ציר האורך של המבחנה. בעזרת פינצטה אשר אחזה בחיבור הפקק אל המבחנה, הוכנסה מבחנת האפנדורף לתחתית המבחנה החיצונית. ההכנסה נעשתה בשיטה זו על מנת לקבע את מבחנת האפנדורף לדופן המבחנה החיצונית, והמכסה הפתוח אפשר דיפוזיה של התכשיר אל המבחנה החיצונית (תמונה 2).

לאחר הכנסת מבחנת האפנדורף, המבחנה החיצונית מולאה בשני מדיומים שונים. מבחנה אחת מולאה ב-0.85% saline מחומם, והמבחנה השנייה מולאה בחלב פרה מרפת המכון הוולקני, אשר ידוע שאין לה היסטוריה של דלקות עטין. החלב פוסטר ב-80°C למשך 20 דקות ונמהל פי 2. שני סוגי המדיומים חוממו ל-37° C לפני הכנסת התכשיר, תוך הימנעות ממילוי הנוזל ישירות אל תוך מבחנת האפנדורף שבה התכשיר. לכל מבחנה הוכן דופליקט.

המבחנות הוכנסו לסטנד שמוקם בתוך אמבט המים בחדר החום (תמונה 3). מרגע זה, המבחנות הושארו בכל משך זמן הניסוי בחדר החום, על מנת לשמור על מרקם הג׳ל של התכשיר.

תמונה 2: מיקום מבחנת האפנדורף ובה התכשיר במבחנה החיצונית.

תמונה 3 : מיקום המבחנה החיצונית בתוך הסטנד באמבט המים.

2.2.2 מהלך הניסוי

ניסוי זה בוצע בשתי דרכים, במטרה לשפר את הדרך הראשונה; מהלך הניסויים יפורט בהמשך.

תחילה, נעשה שימוש בארבע מבחנות חיצוניות שנפחן 15 מ״ל. שתי מבחנות, מוספרו כמבחנות 1 ו-2, ומולאו בנפח של 12 מ״ל 0.85% saline מחומם. שתי המבחנות הנותרות, מוספרו כמבחנות 3 ו-4, ומולאו בנפח של 12 מ״ל של חלב פרה כמתואר בתשתית הניסוי. אל כל אחת ממבחנות אלה הוכנסה מבחנת אפנדורף אשר תכולתה ודרך הכנסתה מתוארות לעיל. כל ארבע המבחנות מוקמו בסטנד באמבט המים בחדר החום.

בכל יום, במשך שבוע, נשאב נפח של 1 מ״ל משטח הפנים העליון של המבחנה החיצונית, על ידי פתיחת הפקק תוך הזזה מינימלית של המבחנה מהסטנד. במהלך חמשת הימים הראשונים, הדגימה נלקחה ממבחנות 1 ו-3, ולאחר 3 ימי ניסוי הדגימה נלקחה ממבחנות 2 ו-4, על מנת לשמור על נפח מספק במבחנה החיצונית ולא לרוקנה. הדגימה שנלקחה הועברה למבחנת אפנדורף חדשה שהוכנסה להקפאה בטמפרטורה של 80- °C, עד לביצוע שלב הניסוי הבא שנערך בסיום האיסוף.

בשלב הבא, הוכנו תמיסות החיידקים *E.coli* ו-*S. aureus*, אשר עיכובם נבדק בניסוי. לשם כך, נלקחו מספר מושבות מצלחת זרועה בעזרת מחט בקטריולוגית, והוכנסו תוך ערבוב למבחנה אשר הכילה 5 מ״ל 0.85% saline, עד לקבלת ריכוז 10^8CFU/ml אשר נמדד במכשיר ה-McFarland reader . לאחר מכן תמיסה זו נמהלה לריכוז של 10^6CFU/ml.

עבור כל חיידק נאספו 7 דגימות במהלך שבוע הניסוי. לאחר האיסוף החל השלב הבא, שבו למבחנה חדשה הוספו 25 מיקרוליטר ממבחנת כל חיידק (10^6CFU/ml) ו-250 מיקרוליטר מכל דגימה (לאחר הפשרתה). לאחר ההוספה המבחנה עורבלה בוורטקס והושארה בטמפרטורת החדר למשך שעה. בסופה של ההמתנה, הוכנו מהתמיסה 3 מיהולים עשרוניים, על מנת להקל את פעולת ספירת מושבות החיידקים (CFU).

בשלב הבא, נשאבו 3 טיפות של 20 מיקרוליטר מכל מיהול אשר נזרעו על צלחת אגר דם סטרילית. הצלחות הודגרו בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה, ובבוקר למחרת נספרו מושבות החיידקים בכל טיפה שנזרעה.

במקביל לניסוי זה, בביה"ס לרוקחות נעשה ניסוי אשר בדק את אחוז השחרור של החומר הפעיל מתרכובת הפולוקסמרים בתמיסת סליין, תחת אותם תנאי סביבה בניסוי הנ"ל. תוצאות ניסוי זה הושוו לתוצאות עיכוב החיידקים ומוצגות בפרק התוצאות והדיון.

לניסוי זה היו מספר מגבלות אשר יפורטו בפרק הדיון, ולכן הוא בוצע בשנית בתוספת מספר שינויים, אשר כללו שימוש במבחנות חיצוניות בנפח 50 מ"ל במקום 15 מ"ל, על מנת שנפח התמיסה יושפע פחות משאיבת הדגימות. המבחנות מולאו בנפח של 40 מ"ל שהכיל 0.85% saline או חלב מחומם. כמו כן, מהלך הניסוי ערך 10 ימים, ובכל יום נלקחה דגימה בנפח 2 מ"ל מחלקה העליון של המבחנה החיצונית. בניסוי חוזר זה נוספו לבדיקה שני חיידקים נוספים *S. uberis* ו- *S. haemolyticus*.

כמו כן, מאחר ואחת מגבלות הניסוי הייתה זיהום בחלב למרות פסטורו, נעשה ניסוי בביה"ס לרוקחות ליצירת חלב מלאכותי אשר ישמש לשלבי הניסוי במקום חלב הפרה הגולמי. הניסוי נעשה על פי המחקר של N. Spanos וחובריו (19). תוצאות הניסוי מובאות בפרק התוצאות.

2.3. קביעת ה-MIC (Minimal inhibitory concentration) עבור התכשיר Chlorhexidine diacetate

2.3.1. הכנת האינוקולום

בניסוי זה נבדק עיכובם של החיידקים הבאים:

שם החיידק	זן החיידק והמאגר אליו משויך
E. coli	NTCC - 702070
S. aureus	KVI- 2449
S. aureus	KVI- 25923
S. haemolyticus	KVI-1
S. haemolyticus	KV-13
S. chromogenes	KVI-24
S. chromogenes	KVI-27
S. uberis	KVI-9959
S. uberis	KV-3694
S. dysgalactiae	KVI-3685
S. dysgalactiae	KVI-1989
S. dysgalactiae	KVI-3634

S. agalactiae	334-KVI
S. agalactiae	332-KVI
Pseudomonas aeruginosa	ATCC

כל חיידק נזרע על פלטת אגר דם חדשה וסטרילית יום לפני תחילת הניסוי, אשר הוכנסה לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה.

בבוקר למחרת, נלקחו מושבות חיידקים מפלטות האגר של כל חיידק בעזרת מחט בקטריולוגית סטרילית, והוכנסו בערבוב אל מבחנה ובה 5 מ״ל 0.85% saline, עד לריכוז 10^8CFU/ml, במכשיר ה- McFarland reader. פעולה זו בוצעה רבע שעה לפני תחילת הניסוי.

לאחר מכן תמיסת כל חיידק נמהלה ביחס 1:100 עד לקבלת 10^6CFU/ml. פעולה זו בוצעה על ידי הוספה של 50 מיקרו-ליטר ממבחנת החיידק אל מבחנה ובה 4.95 מ״ל של מצע Muller-Hinton broth (MHB) וערבובה בוורטקס. לאחר ביצוע המיהולים בוצעה זריעת ביקורת של כל מיהול על פלטת אגר דם.

2.3.2 הכנת תמיסת החומר הפעיל

ריכוז הכלורהקסידין בו נעשה שימוש בניסוי זה הוא 0.01%. ריכוז זה התקבל על ידי הוספת 4 מ״ג אבקת chlorhexidine diacetate אל 40 מ״ל מצע MHB. התמיסה עורבבה בוורטקס והוכנסה לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה, יום לפני תחילת הניסוי, לשם מסיסות הומוגנית ומיטבית.

תחילה, בוצע שימוש בכלורהקסידין בריכוז 0.1%, תוך הסתמכות על ריכוז של 0.12-0.2% המופיע בתכשירים הדנטליים, והוכח שלא גורם נזק לממברנות מוקוטיות בחלל הפה (14). אך, ריכוז זה נמצא כלא מסיס במצע ה-MHB ולכן הריכוז לצורך הניסוי הופחת ל-0.01%.

2.3.3. מהלך הניסוי

הניסוי נערך בפלטה המכילה 96 באריות.

8 השורות בעמודה מספר 1 מולאו ב-100 מיקרו-ליטר מצע MHB המכיל CHX בריכוז 0.01% (איור 1).

לאחר מכן, 8 השורות בעמודות 2-11 מולאו ב-50 מיקרו-ליטר מצע MHB נקי.

בשלב הבא, נעשה מיהול של הCHX בבאריות על ידי שאיבת 50 מיקרו-ליטר מעמודה מספר 1 והעברתם לעמודה מספר 2. לאחר פעולה זו הוחלפו הטיפים בפיפטור, ובעזרתו נעשה ערבוב הנוזל בבארית על ידי העלאה והורדה שלו. לאחר הערבוב, הועברו 50 מיקרו-ליטר מעמודה מספר 2 לעמודה מספר 3, וכך הלאה עד לעמודה מספר 10 ממנה הוצאו 50 מיקרו-ליטר שנזרקו לפח הביולוגי. בסיום שלב זה, התקבלו 50 מיקרו-ליטר של מצע MHB המכיל CHX בריכוזים הולכים ויורדים בעמודות 1-10.

עמודה מספר 11 שימשה כביקורת חיובית לצמיחת החיידקים, ולכן לא מולאה בתמיסת החומר הפעיל, אלא רק ב-50 מיקרו-ליטר מצע MHB נקי.

עמודה 12 שימשה כביקורת שלילית, בה לא נצפה לראות צמיחת חיידקים. לשם כך, אל באריות A-C בעמודה זו, הוספו 50-מיקרוליטר מצע MHB בלבד, ואל באריות D-F 50 מיקרו-ליטר של מצע MHB +CHX.

לאחר פעולות אלו, נוספו 50 מיקרו-ליטר מהחיידק הנבדק הראשון לשורה A (עמודות 1-11), 50 מיקרו-ליטר מהחיידק הנבדק השני לשורה B, וכך הלאה עד לשורה H. כך שבכל פלטה נבדקו 8 חיידקים.

לכל פלטה הוכן טריפליקט. לאחר סיום הוספת כלל המרכיבים, נעשה ערבוב של הפלטה על ידי תפיחה קלה בעזרת היד, אטימתה בנייר פראפילם והעברתה להדגרה באינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה.

ביום למחרת בוצעה קריאה של הMIC במכשיר ה-Plate reader.

מכל בארית, בריכוז MIC ומעלה, בה לא נראתה עכירות מצמיחת חיידקים, נלקחו 10 מיקרו-ליטר מהנוזל ונזרעו על צלחת אגר דם. למחרת, פלטות אלה נבדקו לצמיחת חיידקים על מנת לקבוע את ה-MBC (Minimal bactericidal concentration).

ניסוי זה בוצע בשנית על זני חיידקים נוספים על מנת לבסס את קביעת ה-MIC .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.01% (100µg/ml)	0.005% (50µg/ml)	0.0025% (25µg/ml)	0.00125% (12.5µg/ml)	0.000625% (6.25µg/ml)	0.000313% (3.12µg/ml)	0.000156% (1.56µg/ml)	0.00008% (0.78µg/ml)	0.00004% (0.4µg/ml)	0.00002% (0.2µg/ml)	MHB+ Bacteria	Clean MHB
B	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	Clean MHB
C	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	Clean MHB
D	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	0.01%
E	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	0.01%
F	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	0.01%
G	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	
H	0.01%	0.005%	0.0025%	0.00125%	0.000625%	0.000313%	0.000156%	0.00008%	0.00004%	0.00002%	MHB+ Bacteria	

איור 1 : מבנה תכולתה של פלטת ה-MIC במהלך הניסוי. אותיות A-H מייצגות חיידק נפרד אשר נבדק בכל אחת משורות הפלטה.

4. מבחני בטיחות במתן התכשיר תוך-עטינית לפרות (מספר אישור אתי 897/21IL) :

שלוש פרות מרפת וולקני שיועדו להוצאה מהעדר (מספרים : 3628, 3505 ו- 4068) שימשו לבדיקת בטיחות התכשיר. לפני החדרת כל אחד מהתכשירים מכל רבע עטין נלקחה דוגמא אספטית של חלב לבדיקת המצאות תאים סומטיים כמו גם בדיקת תרבית לחיידקים.

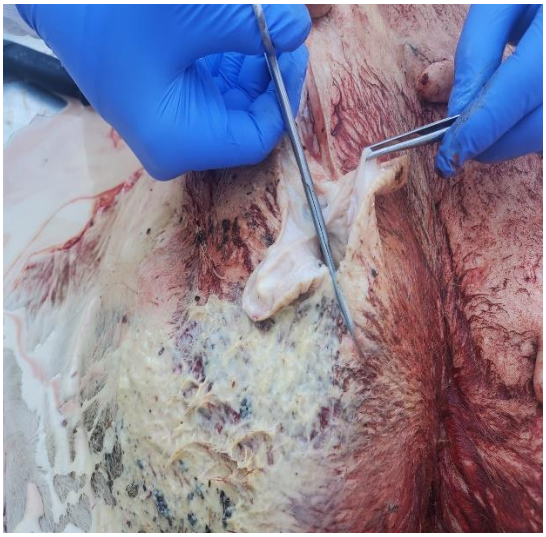
כל אחד מהרבעים קיבל את אחד מהטיפולים הבאים: התכשיר שפותח שהכיל כלורהקסידין בשחרור מושהה (CHX5), התכשיר שפותח שהכיל רק את הנשא ללא החומר הפעיל (פלסבו) או התכשיר המסחרי Nafpenzal כביקורת חיובית או ללא טיפול כלל. כל אחד מהתכשירים הוחדר תוך עטינית באמצעות מזרק ייעודי כמופיע בתמונה 4.

תמונה 4: החדרת התכשיר שפותח תוך עטינית.

פירוט הטיפולים:

Cow number	3628	3628	3628	3628	3505	3505	3505	3505	4068	4068	4068	4068
Quarters	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
CHX 5	+		+				+			+	+	
Polymer		+		+		+			+			
Antibiotic												+
No treatment												+

עשרה ימים לאחר החדרת התכשיר הפרות הוקרבו ונלקחו דוגמאות מהאברים והרקמות הבאים: פטמות העטין, העטין, כבד, כליה, טחול, ריאות, לב, בלוטות לימפה, שריר ושומן.



תמונה 5 : לקיחת דוגמא מפטמת העטין ב-PM.

לאחר המתת הפרות במכון הווטרינרי בוצעו הבדיקות הבאות :

1. בדיקה בקטריולוגית (מהחלב שנותר).
2. Gross pathology ובדיקה היסטולוגית.
3. קביעת ריכוזי הכלורהקסידין באברים וברקמות (פטמות, עטין, כבד, כליה, שריר ושומן).

תוצאות

1. בדיקת עיכוב צמיחת חיידקים בצלחות אגר

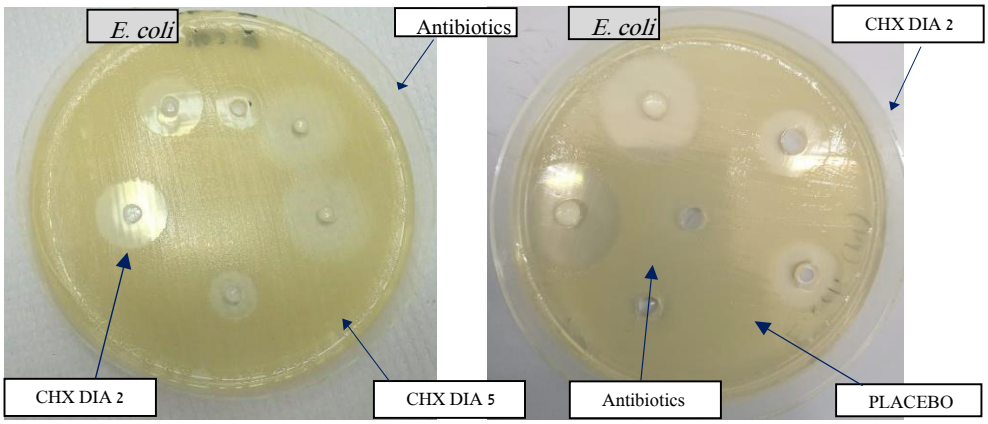
1.1 מדידת קוטר העיכוב הנוצר מעיכוב צמיחת החיידקים תחת השפעת התכשיר בהשוואה לאנטיביוטיקה

קוטר העיכוב הממוצע שיצר התכשיר כתוצאה מעיכוב צמיחת החיידקים, היה דומה לזה שהתקבל בהשפעת התכשיר Nafpenzal DC®, אך מעט נמוך יותר. קוטר העיכוב של chlorhexidine diacetate 5 היה נמוך מזה של chlorhexidine 2 בכלל התוצאות, אך נתונים אלה היו צפויים שכן השחרור שלו איטי יותר כתוצאה מהרכבו (טבלה 1, תמונות 1-2).

טבלה 1- תוצאות מדידת קוטר העיכוב של החיידקים *E.coli*, *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* ו- *S. haemolyticus*, בהשפעת התכשיר (chlorhexidine diacetate 2+5), הפלסבו והאנטיביוטיקה.

	קוטר עיכוב (ממוצע וסטיית תקן, בס"מ)

שם החיידק	זן החיידק והמאגר אליו משויך	CHX DIA 2	Placebo CHX DIA 2	CHX DIA 5	Placebo CHX DIA 5	Antibiotics
E. coli	702070 - NTCC	2.5±0.0	0	1.4±0.2	0	2.4±0.15
S. aureus	2449 -KVI	2.9±0.15	0	2±0.0	0	4.8±0.28
S. dysgalactiae	3685-KVI	4±0.0	0.5	-	-	6±0.0
S. uberis	3694-KVI	3.1±0.6	0.3	2±1.0	0	5.1±1.0
S. haemolyticus	1-KVI	3.1±0.14	0	2±0.0	0	4.4±0.0



תמונות 6 ו-7- צלחות אגר בהן זרוע החיידק *E. coli*. בתמונה מימין, ניתן לראות את קוטר העיכוב בהשפעת התכשיר (CHX DIA 2) chlorhexidine diacetate 2 בבאריות הימניות, בהשפעה האנטיביוטיקה בבאריות השמאליות, וסביב הבאריות המרכזיות המכילות פלסבו לא נצפה עיכוב. בתמונה משמאל, ניתן לראות את קוטר העיכוב בהשפעת התכשיר (CHX DIA 2) chlorhexidine diacetate 2 בבאריות השמאליות, chlorhexidine diacetate 5 (CHX DIA 5) בבאריות המרכזיות, אותן ניתן להשוות לקוטר העיכוב הנוצר סביב הבאריות הימניות המכילות אנטיביוטיקה.

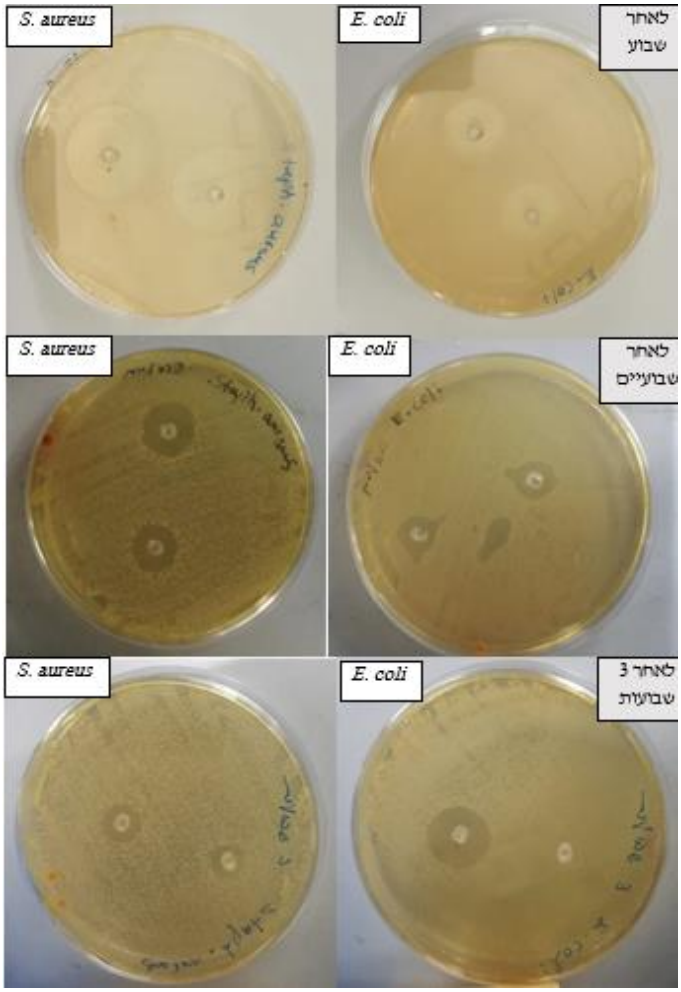
במבחן WILCOXON ה-P value שהתקבל היה 0.2%, כלומר יש הבדל מובהק ביכולת העיכוב בין שני החומרים שנבדקו, כלורהקסידין ואנטיביוטיקה. ממוצע קוטר העיכוב של האנטיביוטיקה היה גבוה יותר מאשר של הכלורהקסידין, וכך גם החציון. בנוסף, השונות בקטרי העיכוב תחת השפעת האנטיביוטיקה הייתה גבוהה יותר מאשר זו בהשפעת הכלורהקסידין, בהשוואת התוצאות של החיידקים השונים. לא נמצא הבדל מובהק בין תכשירי הפלסבו השונים בהם נעשה שימוש בניסוי.

1.2 בדיקת עיכוב צמיחת החיידקים בצלחות אגר תחת השפעת התכשיר לאורך זמן

לשם בדיקת יעילות השחרור המושהה של התכשיר, לניסוי מדידת קוטר העיכוב בצלחות האגר נוספו פעולות נוספות, המוזכרות בפרק השיטות. השחרור נמדד לאורך 3 שבועות, בהן בוצעו 3 העברות של התכשיר לצלחות אגר חדשות על מנת לבדוק האם השחרור של התכשיר נמשך. התוצאות הראו שאף לאחר 3 שבועות, השחרור של החומר הפעיל מתוך התכשיר ממשיך וגורם לעיכוב צמיחה של החיידקים הנבדקים (טבלה 2, תמונות 8-3). עם זאת, קוטר העיכוב נעשה קטן יותר בכל שבוע, ככל הנראה כי נפח התכשיר ירד. לא היה הבדל משמעותי בעיכוב בהשוואה בין שני החיידקים. לאחר 3 שבועות מתחילת הניסוי, תכשיר רב מדי אבד ולכן הניסוי הופסק.

טבלה 2- תוצאות מדידת קוטר העיכוב של החיידקים *E.coli* ו- *S. aureus*, בהשפעת התכשיר chlorhexidine diacetate 2 שמוקם ב-line extensor והועבר לצלחת אגר זרועה חדשה בכל שבוע.

שם החיידק	**זן החיידק והמאגר אליו משויך**	**קוטר עיכוב נמדד בממוצע (ס"מ)**		
		לאחר שבוע (העברה ראשונה)	**לאחר שבועיים** (העברה שניה)	**לאחר 3 שבועות** (העברה שלישית)
E. coli	NTCC - 702070	2	1	1.25
S. aureus	KVI- 2449	2.5	1.5	1



תמונה 8- בתמונות ניתן לראות מימין צלחות אגר בהן זרוע החיידק *E. coli* ומשמאל החיידק *S. aureus*. בתוך האגר מונחות שתי חתיכות line-extensor בהן התכשיר chlorhexidine diacetate 2 (CHX DIA 2). ניתן להתרשם מקוטר העיכוב הנוצר סביב התכשיר לאחר שבוע, שבועיים ו-3 שבועות בהתאמה.

2. בדיקת פעילותו הבקטריוצידית של התכשיר בעזרת בניית מערכת שחרור-מושהה

1.2. תוצאות הניסוי הראשון לבדיקת פעילותו הבקטריוצידית של התכשיר בעזרת בניית מערכת שחרור-מושהה למשך שבוע

עקב קבלת תוצאות גבוליות בניסוי המוזכר לעיל (סעיף 1.2) בקביעת יעילות השחרור המושהה של התכשיר, תוכנן ניסוי חדש ובו מערכת אשר בודקת את השחרור על פני תקופה רציפה של שבוע (איור 3-2, טבלה 3). תוצאות הניסוי לא התאימו באופן מובהק סטטיסטית לצפי שעם חלוף הזמן עיכוב צמיחת החיידקים יהיה משמעותי יותר, כתוצאה מנפח רב יותר של החומר הפעיל שישתחרר מהתכשיר לתמיסה החיצונית. מדד Spearman הראה קשר שלילי בין הזמן שחלף לצמיחת החיידקים, אך תוצאה זו אינה

מובהקת עקב גודל המדגם הנמוך של מספר הדגימות (טבלה 3). ביום הדגימה הראשון, הציפייה הייתה שה-CFU של כל חיידק יהיה הרב ביותר, מפני שביום זה הכמות הנמוכה ביותר של החומר הפעיל בתמיסה החיצונית. ציפייה זו תאמה לתוצאות המדידה של החיידק *S. aureus* (איור 3), אך כשמשווים תוצאות אלה לחיידק *E. coli* נראה שיום הדגימה השני הוא זה שהראה את מדידת ה-CFU הרבה יותר (איור 2). עם זאת, תוצאות מדידת ה-CFU של החיידק *S. aureus* הראו עליה משמעותית ביום הדגימה השלישי (איור 3), תוצאה שאינה תואמת את ציפיות הניסוי.

כפי שהוזכר בפרק השיטות, ניסוי זה כלל לקיחת דגימות ממבחנות אשר הכילו תמיסה חיצונית של חלב מהול ובתוכה התכשיר. תוצאות אלה אינן מוצגות מפני שהיה זיהום בכלל הדגימות של חיידקי bacilli שמקורם בחלב, למרות שהחלב עבר תהליך פסטור טרם תחילת הניסוי.

בכל אחד *E. coli* איור 2: תוצאות ספירת המושבות של החיידק chlorhexidine diacetate משבעת ימי הדגימה, בהשפעת התכשיר (מבחנות מספר 1 ו-2). saline בתמיסת ה-2

S. aureus איור 3: תוצאות ספירת המושבות של החיידק chlorhexidine diacetate משבעת ימי הדגימה, בהשפעת התכשיר (מבחנות מספר 1 ו-2). saline בתמיסת ה-2

האנליזה הסטטיסטית שנעשתה בדקה האם יש קורלציה בין מספר מושבות החיידקים (CFU) לזמן שעבר מתחילת הניסוי, עבור כל אחד מהמיהולים העשרוניים שנבדקו. מקדם המתאם שנבחר לשם כך הוא Spearman, עקב מדגם הניסוי קטן, 7 דגימות בלבד. התקבלה תוצאה של קשר שלילי חזק בין שני המשתנים, כלומר ככל שעובר הזמן ה-CFU יורד (טבלה 3). הקשר השלילי ביותר בין שני המשתנים היה במיהול מספר 2, ולכן תוצאותיו הן אלו שנבחרו להצגה בכלל האיורים. P value היה מעט גבוה מ-0.05 ולא מובהק ולכן ההשערה לא התקבלה.

<u>טבלה 3-</u> נתוני הרצת מקדם מתאם Spearman למציאת קורלציה בין הזמן שחלף בניסוי ובין מספר מושבות החיידקים (CFU) של החיידקים אשר נבדקו. הקורלציה השלילית מודגשת באדום.

TIME	CFUממוצע		

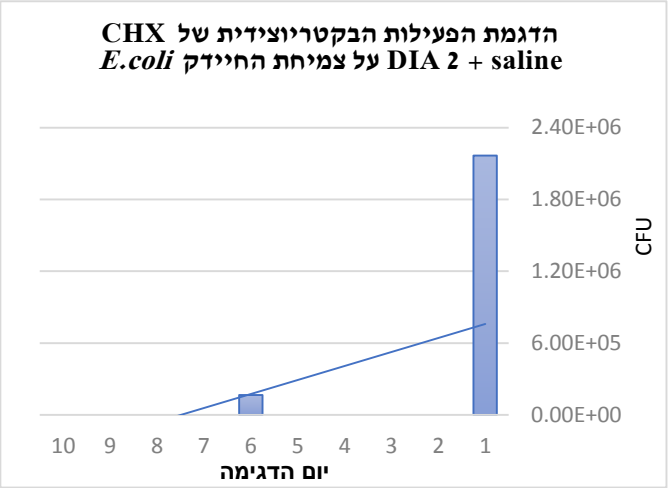
E. coli	Spearman's rho	CFUממוצע	Correlation Coefficient	1.000	-0.670
			Sig. (2-tailed)		0.100
			N	7	7
S. aureus	Spearman's rho	CFUממוצע	Correlation Coefficient	1.000	-0.709
			Sig. (2-tailed)		0.074
			N	7	7

2.2. תוצאות הניסוי השני לבדיקת פעילותו הבקטריוצידית של התכשיר בעזרת בניית מערכת שחרור-מושהה למשך 10 ימים

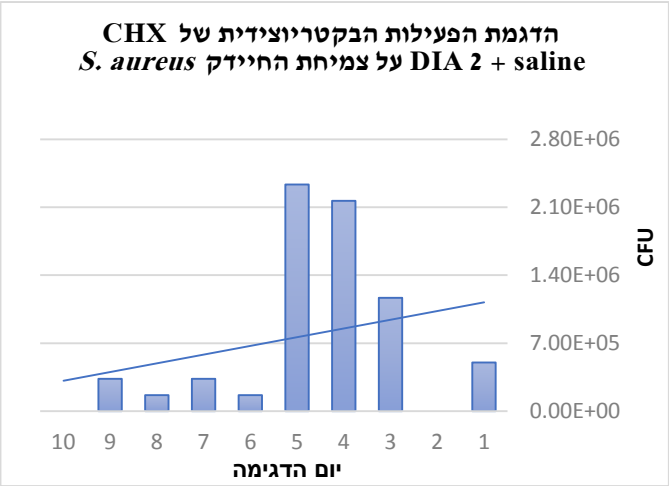
מאחר שהניסוי הקודם דרש שיפור ודיוק, הוא התבצע בשנית לאחר מספר שינויים המוצגים בפרק השיטות, ביניהם הארכת זמן איסוף הדגימות, הגדלת נפח המבחנה החיצונית, שיפור איסוף הדגימות תוך הקפדה על סטרילויות ובדיקת חיידקים נוספים להשוואה נוספת.

בהשוואה לניסוי הראשון, ניתן לראות באופן כללי השפעה טובה יותר של התכשיר בתמיסה החיצונית לעיכוב החיידקים הנבדקים, בייחוד כאשר מתבוננים על החיידקים *E. coli* ו-*S. haemolyticus* (איור 4,7). באיור 7, המציג את תוצאות העיכוב של החיידק *S. haemolyticus*, נראה כי היה עיכוב מוחלט לכל אורך הניסוי של צמיחת החיידק, למעט יום 4 בו הייתה צמיחה משמעותית, אבל לאור התוצאות האחרות ייתכן וזו הייתה טעות טכנית. השפעה מעכבת משמעותית נצפתה גם על החיידק *S. aureus*, אך זו התרחשה רק ביום השישי לניסוי ונמשכה עד ליום העשירי (איור 5). תוצאות עיכוב החיידק *S. uberis*, אינן מתיישבות עם התוצאות הצפויות לפני תחילת הניסוי, שכן בששת הימים הראשונים לניסוי הוא עוכב משמעותית, אך מהיום השביעי תמיסת הניסוי ובה הכלורהקסידין, גרמה לעיכוב חלקי בלבד של צמיחת חיידק זה, אשר הלך ופחת בימי הניסוי העוקבים (איור 6).

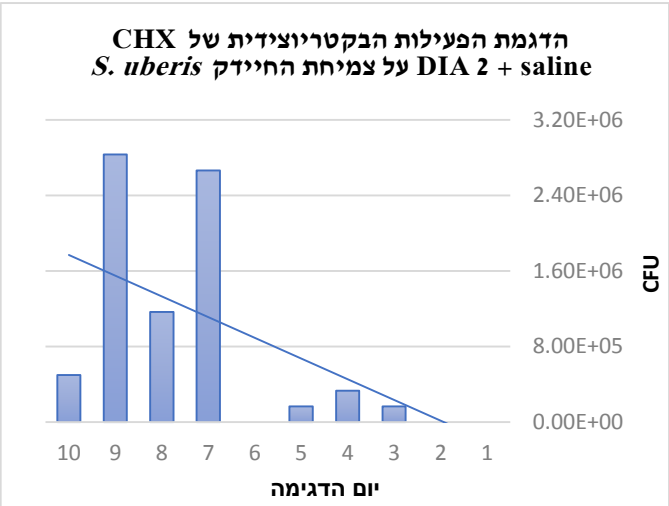
לצורך השוואה בין נפח התכשיר הצפוי להשתחרר לתמיסה ובין עיכוב צמיחת החיידקים, נבדק בבי"ס לרוקחות אחוז השחרור של התכשיר לאורך תקופה של שבועיים (איור 8). בבחינת העקומה המייצגת את 2CHX (התכשיר אשר נבדק על החיידקים בניסוי זה) ניכר כי אחוז השחרור של החומר הפעיל הולך ועולה עם חלוף הזמן, עובדה שתאמה את רוב תוצאות עיכוב צמיחת החיידקים (איור 7-4).



איור 4: תוצאות ספירת המושבות של החיידק *E. coli* בכל אחד מעשרת ימי הדגימה במהלך הניסוי החוזר, בהשפעת התכשיר chlorhexidine diacetate 2 בתמיסת ה-saline (מבחנות מספר 1 ו-2).

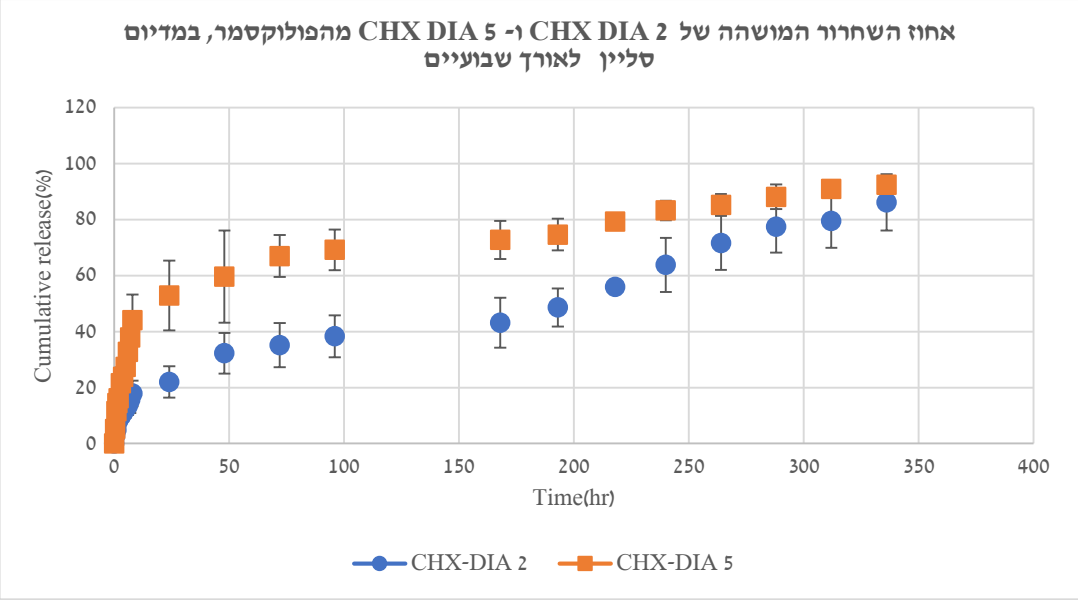


איור 5: תוצאות ספירת המושבות של החיידק *S. aureus* בכל אחד מעשרת ימי הדגימה במהלך הניסוי החוזר, בהשפעת התכשיר chlorhexidine diacetate 2 בתמיסת ה-saline (מבחנות מספר 1 ו-2).

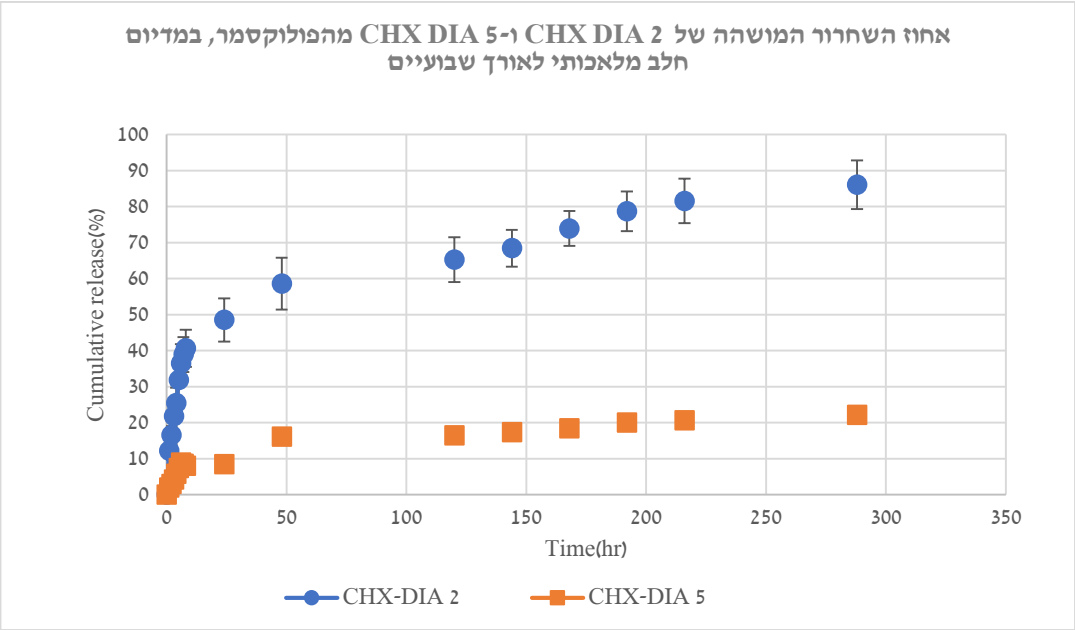


איור 6: תוצאות ספירת המושבות של החיידק *S. uberis* בכל אחד מעשרת ימי הדגימה במהלך הניסוי החוזר, בהשפעת התכשיר chlorhexidine diacetate 2 בתמיסת ה-saline (מבחנות מספר 1 ו-2).

איור 7: תוצאות ספירת המושבות של החיידק *S. haemolyticus* בכל אחד מעשרת ימי הדגימה במהלך הניסוי החוזר, בהשפעת התכשיר chlorhexidine diacetate 2 בתמיסת ה-saline (מבחנות מספר 1 ו-2).



איור 8 : תוצאות השחרור המושהה של התכשירים chlorhexidine 2+5 במשך שבועיים במדיום סליין, בבדיקה שנערכה בבי"ס לרוקחות.



איור 9 : תוצאות השחרור המושהה של התכשירים chlorhexidine 2+5 במשך שבועיים במדיום חלב מלאכותי, בבדיקה שנערכה בבי"ס לרוקחות.

למרות שיפור תנאי הניסוי כמוזכר בפרק השיטות ושמירה על סטריליות, גם בניסוי זה התקיים זיהום של חיידקי bacilli בדגימות אשר נלקחו ממבחנות החלב המהול +תכשיר, ולכן תוצאות אלה אינן מוצגות.

האנליזה הסטטיסטית שנעשתה בניסוי זה זהה לניסוי הראשון, תוך שימוש במקדם מתאם Spearman, לבדיקת הקורלציה בין מספר משבות החיידקים (CFU) לזמן שעבר מתחילת הניסוי, עבור כל אחד מהמיהולים העשרוניים שנבדקו. גם כאן, התקבלה קורלציה שלילית בין המשתנים עבור החיידקים הנבדקים, למעט החיידק *S. uberis*, לו יצאה קורלציה חיובית בין המשתנים. עם זאת, התוצאות שהתקבלו לא היו מובהקות, למרות הגדלת גודל המדגם בשלושה ימי דגימה נוספים (טבלה 4).

טבלה 4 - נתוני הרצת מקדם מתאם Spearman למציאת קורלציה בין הזמן שחלף בניסוי ובין מספר מושבות החיידקים (CFU) אשר נבדקו. קורלציה שלילית מודגשת באדום וקורלציה חיובית מודגשת בירוק.

				CFUממוצע	TIME
E. coli	Spearman's rho	CFUממוצע	Correlation Coefficient	1.000	-0.389
			Sig. (2-tailed)		0.266
			N	10	10
S. aureus	Spearman's rho	CFUממוצע	Correlation Coefficient	1.000	-0.373
			Sig. (2-tailed)		0.288
			N	10	10
S. uberis	Spearman's rho	CFUממוצע	Correlation Coefficient	1.000	.769**
			Sig. (2-tailed)		0.009
			N	10	10
S. haemolyticus	Spearman's rho	CFUממוצע	Correlation Coefficient	1.000	-0.174
			Sig. (2-tailed)		0.631
			N	10	10

3. קביעת ה-MIC (Minimal inhibitory concentration) עבור החומר Chlorhexidine diacetate

תוצאות ה-MIC שהתקבלו בניסוי הראו עקביות בהשוואת זנים שונים של אותו חיידק (טבלה 6). כמו כן, תוצאות ה-MBC זהות ברובן לאלו של ה-MIC, למעט חיידקים עמידים יותר, כדוגמת *Pseudomonas aeruginosa*, אשר לא עברו קטילה מוחלטת על ידי התכשיר. סטיית התקן הראתה מגמה עקבית של תוצאות הניסוי בכל אחת מהחזרות, למעט החיידקים *E.coli* 702070 ו- *S. aureus* 2449.

טבלה 5- תוצאות קריאת ה-MIC של chlorhexidine diacetate באמצעות מכשיר הPlate reader עבור כל אחד מהחיידקים שנבדקו, תוך השוואה לנתוני ה-MIC עבור חומר זה כמוזכר בספרות, ונתוני ה- MBC (Minimal bactericidal concentration) שנבדקו ידנית.

שם החיידק	זן החיידק והמאגר אליו משויך	MIC (µg/ml) ממוצע, הנקרא במהלך הניסוי	MIC (µg/ml) ממוצע מהספרות	MBC (µg/ml) ממוצע
E. coli	702070 - NTCC	5.1±3.7	2.7	4.7±2.7
S. aureus	2449 -KVI	4.4±3.8	4	4.2±1.8
S. aureus	25923 -KVI	4.1±1.8	4	4.2±1.8
S. haemolyticus	1-KVI	3.3±1.4	8	3.1±0.0
S. haemolyticus	13-KVI	4.1±1.8	8	4.2±1.8
S. chromogenes	24-KVI	3.1±1.5	8	3.1±0.0
S. chromogenes	27-KVI	2.6±0.9	8	2.6±0.9
S. uberis	9959-KVI	2.9±1.7	9	5.2±1.8
S. uberis	3694-KVI	3.1±2.7	9	3.1±2.7
S. dysgalactiae	3685-KVI	3.1±2.2	9	2.3±1.1
S. dysgalactiae	1989-KVI	3.1±2.7	9	3.1±2.7
S. dysgalactiae	3634-KVI	1.5±0.0	9	1.6±0.0
S. agalactiae	334-KVI	3.3±2.1	9	4.7±2.2
S. agalactiae	332-KVI	2.6±0.9	9	2.6±0.9
Pseudomonas aeruginosa	ATCC	10.4±3.2	80	25±0.0

i. Amorim, C.V.G., Mayer, M.P.A. (2004). Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Endodontics,* 18(3): 242-246.

ii. Popovich, K.J., Hayden, M.K. (2012). Relationship between Chlorhexidine Gluconate Skin Concentrationand Microbial Density on the Skin of Critically 111 Patients Bathed Daily with Chlorhexidine Gluconate. *Infection control and hospital epidemiology,*Vol. 33 , NO. 9, pp. 889-896.

iii. do Vale, B.C.M., de Melo, M.C.N. (2019). Decreased susceptibility to chlorhexidine and distribution of qacA/B genes among coagulase-negative Staphylococcus clinical samples. *BMC* , 19: 199: pp. 1-5.

4. ניסוי *in vivo* בפרות

1.4 מבחני בקטריולוגיה

טבלה 6

מבחני בקטריולוגיה, CMT ו- SCC של החלב טרם מתן התכשיר

DATE	COW N	QUARTER	BACT	CMT	SCC
10.11.2021	**4068**	**1**	**no growth**	**0**	**49500**

	4068	**2**	**no growth**	**0**	**38700**
	4068	**3**	**no growth**	**1**	**365000**
	4068	**4**	**no growth**	**0**	**55500**
10.11.2021	**3505**	**1**	**no growth**	**0**	**202000**
	3505	**2**	**no growth**	**0**	**172000**
	3505	**4**	**no growth**	**0**	**196000**
22.11.2021	**4068**	**1**	**no growth**	**ND**	**61500**
	4068	**2**	**no growth**	**ND**	**75000**
	4068	**3**	**no growth**	**ND**	**153000**
	4068	**4**	**no growth**	**ND**	**71000**
	3505	**1**	**no growth**	**ND**	**454500**
	3505	**2**	**no growth**	**ND**	**577000**
	3505	**4**	**no growth**	**ND**	**461000**
	3628	**1,2,3,4**			**<200,000**

CMT – California Mastitis Test

SCC- Somatic Cell Count

2.4 ריכוזי כלורהקסידין באברים וברקמות

<u>טבלה 7</u>

ריכוזי כלורהקסידין ברקמת העטין ובפטמות שנחשפו לפורמולציה הניסויית שפותחה

Cow number-Quarter number	**CHX Conc. (ng/g fresh weight))**
4068-2 udder (CHX 5)	21452.5
4068-2 teat (CHX 5)	4128.79
3628-1 teat (CHX 5)	458.72
3628-1 teat (CHX 5)	360.61
3628-1 udder (CHX 5)	13955.09
3628-1 udder (CHX 5)	12305.08
3628-3 teat (CHX 5)	1084.13

3628-3 teat (CHX 5)	1230.62
3628-3 udder (CHX 5)	10903.89
3628-3 udder (CHX 5)	8250.56
4068-3 teat (CHX 5)	6172.84
4068-3 teat (CHX 5)	4840.76
4068-3 udder (CHX 5)	20954.74
4068-3 udder (CHX 5)	24263.66

טבלה זו מורה על רכוזי הכלורהקסידין שנמצאו ברקמת העטין והרקמות 10 ימים לאחר המתן התוך עטיני הפורמולציה הנבחנת כלורהקסידין בשחרור מושהה (CHX 5).

ריכוזי הכלורהקסידין נבדקו בשיטת HPLC – high performance liquid chromatography

על פי התוצאות ניתן לראות שריכוזי הכלורהקסידין בעטין נמוכים מאד והם הרבה מתחת לסף הפוטנציאל הטוקסי שמופיע בספרות (דו"ח 1996 EMEA).

יצויין שנכון להיום אין עדיין MRL - Maximum Residue Limit מקובלים לגבי כלורהקסידין בפרות.

<u>טבלה 8</u>

ריכוזי כלורהקסידין ברקמת העטין ופטמות שלא נחשפו לפורמולציה שפותחה (פלצבו או Nafpenzal)

Cow number-Quarter number	**CHX Conc. (ng/g fresh weight))**
4068-4 teat(control)	15.24
4068-4 udder(control)	31.07
3505-2 udder(placebo)	15.22
3505-2 udder(placebo)	9.92
3505-2 teat(placebo)	6.43
3628-2 teat(placebo)	10.28
3628-4 teat(placebo)	19.95
3628-4 udder(placebo)	5.84
3628-2 udder(placebo)	9.55

טבלה זו מורה על כך שריכוזי הכלורהקסידין ברקמת העטין כמו גם בפטמות שלא נחשפו לפורמולציה הנבחנת באופן ישיר היו זניחות.

טבלה 9

ריכוזי כלורהקסידין באברים וברקמות של הפרות שבניסוי – כבד, שומן, כליה ושריר

Sample Name	**CHX Conc. (ng/g fresh weight))**
3628 liver tissue	282.4
4068 liver tissue	207.15
3505 liver tissue	68.67
3505 fats	4.53
3628 fats	3.61
4068 fats	9.44
4068 kidney R	207.57
3628 kidney R	322.82
3505 kidney R	106.2
3628 kidney L	341.1
3628 femoral muscles	12.13
3628 thoracic muscles	4.22
Sample 24 3628 longos muscle	6.65
Sample 25 3505 muscle	2.87
Sample 26 4068 longissimus muscle	5.85

טבלה זו מורה על ריכוזי כלורהקסידין באברים פנימיים כבד וכליה כמו גם ברקמות שריר ושומן זניחים שהם הרבה מתחת לריכוזים בעלי פוטנציאל טוקסי.

התוצאות שלעיל מורות על כך שהתכשיר שפותח המכיל כלורהקסידין בשחרור מושהה בטוח לשימוש במתן תוך עטיני בחית היעד - פרות חלב.

3.4 פתולוגיה והיסטולוגיה של רקמת העטין והפטמות

שלושת הפרות שהוצאו מהעדר והשתתפו בניסוי הבטיחות של הפורמולציה הנבחנת הוקרבו 10 ימים לאחר תחילת הניסוי. במהלך הימים מעת תחילת הניסוי לא דווחה תופעת לוואי כלשהי באף אחת מהפרות. במבחני פתולוגיה והיסטולוגיה שבוצעו לרקמות העטין והפטמות שקיבלו את הטיפולים שונים במתן תוך עטיני לא נמצאו הבדלים בין הטיפולים השונים ולא נמצא נזק לרקמות שנגרם ע״י הפורמולציה הנבחנת כלורהקסידין בשחרור מושהה (CHX5).

לסיכום, בהסתמך על מבחני ה- *in vitro* בהם הפורמולציה המפותחת המכילה כלורהקסידין בשחרור מושהה הראתה יעילות כנגד חיידקי מטרה הקשורים בהתהוות דלקות עטין כמו גם מבחני הבטיחות *in vivo* שהראו בטיחות בשימוש הפורמולציה במתן תוך עטיני, יש צידוק להמשיך למבחני יעילות בפרות חלב בעת תקופת היובש.

דיון

חשיבות המחקר היא במציאת תחליף לטיפול האנטיביוטי הנהוג היום בפרות חלב בתקופת היובש, עקב העלייה בעמידות לאנטיביוטיקה של חיידקים רבים ברחבי העולם והדרישה ההולכת וגוברת להגביל ועד לאסור את השימוש באנטיביוטיקה לצרכים מניעתיים בענפי בעלי החיים היצרניים.

עבודה זו נעשתה בהמשך לעבודת הגמר של ד"ר דנה ברקן, אשר בדקה את יעילותו של תכשיר המתבסס על מערכת פולימרית נוזלית המכילה בתוכה CHX המשמש כחומר האנטיספטי. לאחר נידוף החומר הממס, נוצר ציפוי פולימרי על פטמת העטין שמתוכו משתחרר בצורה מבוקרת ומושהית CHX. הנשאים בהם השתמשו לצורך השחרור המושהה היו Hydroxypropyl-cellulose (HPC) ו-Ethyl cellulose , ודרך המתן בה השתמשו הייתה טבילת הפטמות בתכשיר. מתוצאות העבודה ניכר כי אין עדויות לחומר הפעיל לאחר 24 שעות, ולכן אינו משמש ככיסוי מספק לתקופת היובש. בשל כך, פותח התכשיר במחקר זה אשר לו תכונות של שחרור-מושהה, אך גם תכונות תרמוסנסטיביות שתורמת להישארותו בתעלת הפטמה בדומה לאטם פטמה מלאכותי, וכמו כן מאפשרת מתן תוך עטיני אשר יגן על התכשיר במהלך תקופת היובש, במטרה שיישאר פעיל למשך כל אורכה.

תוצאות המחקר הנוכחי, מראות יעילות טובה של התכשיר בעיכוב הצמיחה של מרבית החיידקים מעוררי הדלקת שנבחרו לצורך הניסויים. יעילות זו, לא נמוכה באופן משמעותי מזו של האנטיביוטיקה שנבחרה לשם השוואה במהלך הניסויים (טבלה 1, תמונות 1,2, איור 1). עם זאת, ניסוי זה היה מוגבל מבחינת אמינות תוצאותיו, שכן התכשיר והאנטיביוטיקה אשר הוכנסו לבאריות באגר היו במרקם נוזלי, אשר לעתים זלג לצדדים, וכמו כן הדיפוזיה של החומרים לא הייתה זהה לחלוטין, בהשוואה לזו הנוצרת מדיסקיות אנטיביוטיקה המונחות על שטח הפנים העליון של מצע האגר. יחד עם זאת, ניסוי פרלימנרי זה המחיש את היתכנות השימוש בתכשיר על בסיס כלורקסידין כנגד החיידקים הרלוונטיים בעטין.

החומר האנטיספטי שנבחר לביצוע הניסויים הוא chlorhexidine diacetate, בשונה ממחקרים קודמים בהם בחרו להשתמש ב- chlorhexidine digluconate (8). בחירה זו נבעה מהעובדה שהאינטראקציה בין chlorhexidine digluconate לפולוקסמרים חזקה יותר ולכן פחות חומר צפוי להשתחרר. כמו כן, על מנת לבחון את קצב השחרור המושהה של התכשיר נבדקו שתי וריאציות כפי שמופיע בפרק השיטות, chlorhexidine diacetate 2 ו-5. chlorhexidine diacetate 5 הכיל סודיום כלוריד (NaCl), אשר האט את

שחרור הכלורהקסידין לסביבה החיצונית וניתן לראות את ההשלכה לכך בגודל קוטר העיכוב (טבלה 1, תמונות 1,2). תוספת הסודיום גורמת ל-Salting out effect, בו נוצרת אינטראקציה חזקה יותר בין המלח לשרשראות הפולוקסמרים, התמיסה הופכת יציבה יותר וטמפרטורת הג'לציה יורדת, כך שפחות חומר פעיל יכול להשתחרר (16).

לאור תוצאות אלה, נעשו מספר ניסויים על מנת לבחון את השפעת השחרור המושהה, הן מבחינת משך פעולה והן מבחינת נפח השחרור. בניסוי 1.2 (טבלה 2, תמונה 6), אמנם נצפה שחרור של התכשיר לאורך 3 שבועות הניסוי אשר גרם לעיכוב צמיחת החיידקים, אך לניסוי זה היו מספר מגבלות. הצורך להכניס את הצינור החתוך ובו התכשיר אל הבאריות, גרם לחוסר אחידות של נפח התכשיר במגע עם האגר, דבר שככל הנראה השפיע על התוצאות. כמו כן, בפעולה זו, למרות שבוצעה בעזרת פינצטה סטרילית ובעדינות רבה, אבד חומר בכל פעם. הסיבה לשימוש בקשי השתייה וצינור האינפוזיה מלכתחילה, נועדה להעברת התכשיר בין צלחות האגר על מנת לבחון את המשך השחרור המושהה, מטרה זו לא הושגה באופן האופטימלי, ודורשת חשיבה נוספת לשיפור. מגבלה נוספת בניסוי זה, הייתה השהות הארוכה של צלחות האגר באינקובטור למשך שבוע, אשר גרמה לאידוי מסוים של התכשיר ופגיעה בהרכבו. האידיאל בתחילת הניסוי היה לבדוק את שחרור התכשיר לאורך 60 ימים, על מנת להתאים את המסקנות למשך תקופת היובש של פרות החלב, אך הוא לא מומש עקב בעיות טכניות ולוגיסטיות אלה.

לצורך הרחבת חקר השחרור המושהה של התכשיר והשפעתו על עיכוב צמיחת החיידקים, נבנתה מערכת הניסוי אשר מוצגת בסעיף מספר 2 בפרק השיטות ותוצאותיה באיורים 7-2. לשם בניית המערכת, נעזרתי בתזה של ד"ר ברנרד פונק (18), אשר השתמש במחקרו גם כן בשילוב כלורהקסידין כחומר אנטיספטי עם פולוקסמרים כחומר תרמוסנסיטיבי, עם זאת, היחס בין הפולוקסמרים לכלורהקסידין היה גבוה יותר, מזה שבניסוי הנוכחי. יחס גבוה זה אמנם גורם ליציבות גבוהה של התכשיר, אשר אינו מתפרק בקלות במדיום החיצוני, אך גורם לשחרור מואט יותר של התכשיר עקב אותה יציבות. מסיבה זו, שמרנו על יחס נמוך יותר, אשר יאפשר שחרור של נפח משמעותי יותר של חומר פעיל במחשבה שהחיידקים איתם אנו מתמודדים בדלקות העטין בפרות החלב עמידים יותר, מאשר החיידק *Enterococcus faecalis* שנבדק בניסויי התזה ורלוונטי לרפואת השיניים. החיסרון בבחירה של יחס זה הייתה יציבות נמוכה יחסית של התכשיר שהקשתה על מגוון הניסויים אותם ביצענו לבדיקת השחרור המושהה, ביניהם ניסוי צלחות האגר המוצג בטבלה 2 ותמונה 6.

הניסוי הראשון (סעיף 2.1 בפרק התוצאות), אשר נערך לראשונה לאחר בניית המערכת, כלל מספר תקלות טכניות אשר השפיעו על תוצאות הניסוי שאמינותן נפגעה. הסיבות שייתכנו לתוצאות אלה, קשורות באופן בלעדי לבחירת תנאי הניסוי ולקיחת הדגימות, ומפורטות להלן. נפח המבחנות היה מועט מידי בהשוואה לנפח הדגימה שנלקח בכל יום, ולכן נוצר חוסר אחידות ברמת התכשיר בתמיסה החיצונית. כמו כן,

פתיחת המבחנה החיצונית ולקיחת דגימה בכל יום, העלתה את הסיכוי להכנסת זיהום מהסביבה החיצונית אל מבחנת הניסוי. בנוסף, המעבר ללקיחת דגימות מהדופליקט של כל מבחנה לאחר 3 ימי ניסוי גרם לחוסר דיוק בתוצאות, שכן עד לקיחת הדגימה חומר רב השתחרר לתמיסה החיצונית (התכשיר עבר חלקית לפאזה נוזלית), וקיים סיכוי סביר שזו הסיבה לעיכוב המשמעותי יותר בצמיחת החיידקים בימי ניסוי 4-7 (איור 2-3). בעייתיות נוספת בניסוי זה, היא שלא נעשתה ביקורת חיובית ושלילית לצורך השוואת תוצאות הניסויים, עובדה שמערערת גם היא את אמינות התוצאות. עם זאת, תוצאות הניסוי, לאחר תיקונו ושיפורו במהלך הניסוי השני (2.2), באו בקנה אחד עם הציפייה שככל שנפח התכשיר בתמיסה החיצונית יהיה גבוה יותר כך קטל החיידקים יהיה רב יותר, ובנוסף שהשחרור לתמיסה החיצונית יימשך בכל יום (איור 4-8). כפי שהוזכר בפרק התוצאות, התכשיר עיכב בצורה יעילה את צמיחתם של החיידקים *E.coli* ו-*S. haemolyticus* מהיום השני, ואת החיידק *S. aureus* מהיום השישי (איור 4-5,7). תוצאות עיכוב הצמיחה האיטי של החיידק *S. aureus* בניסוי, תואמות לרקע הידוע של עמידותו של חיידק זה, אשר סביר שידרוש ריכוז תכשיר גבוה יותר שהצטבר בנפח התמיסה לאורך ימי הניסוי. עם זאת, התוצאות כן מראות עיכוב של החיידק ומכך מבשרות טובות שכן חיידק זה נפוץ בדלקות עטין עמידות בפרות חלב, ולכן תכשיר אנטי-בקטריאלי שיעילותו מוכחת הוא צורך נדרש. החיידק *S. uberis* עוכב בצורה משמעותית באמצעות הדגימות שנלקחו בימי הניסוי הראשונים, אך לא עוכב באמצעות הדגימות שנלקחו ביום השביעי עד התשיעי (איור 6). סיבה אפשרית לתוצאות אלה היא טעות טכנית במהלך ביצוע הניסוי, או בעת שאיבת החיידקים, בה ייתכן ונשאב נפח רב יותר או לחילופין, ייתכן ונפח הדגימה המכילה את התכשיר היה נמוך יותר מהנדרש.

מטרה נוספת לניסוי זה הייתה לבדוק האם התכשיר אפקטיבי במדיום חלב, מתוך המחשבה שבהחדרת התכשיר אל תעלת הפטמה בתחילתה של תקופת היובש, היא מכילה עדיין מעט חלב שעלול לפגום בתכשיר במידה והוא רגיש לכך. כמוזכר בפרק התוצאות, תוצאות הניסויים במדיום החלב לא מוצגות, מפני שכלל הדגימות שנלקחו ממבחנות החלב שהכילו את התכשיר הזדהמו ע״י חיידקי bacilli ככל הנראה ממקור בחלב. למרות החזרה על חלק זה בניסוי מספר פעמים, תוך החלפת החלב הגולמי ולקיחת חלב מפרה חולבת אחרת במכון החליבה ופסטורו מספר פעמים, הדגימות נותרו עם זיהום בחיידקים אלה, שהתכשיר לא צלח בקטילתם. אי לכך, נעשה ניסיון בבי״ס לרוקחות, ליצור מדיום חלב מלאכותי אשר ישמש לניסוי זה תוך מניעת הסיכון לזיהום. מדיום החלב המלאכותי הוכן במעבדה על סמך נתונים ממחקרים קודמים (22). בבדיקה פרלימינרית במעבדה בבי״ס לרוקחות, נראה כי השחרור של התכשיר במדיום זה מהיר יותר מאשר במדיום הסליין (איור 8-9) החזרה על הניסוי תוך שימוש בחלב המלאכותי לא בוצעה במהלך מחקר זה ותיבדק בניסויי המשך בעתיד.

תוצאות קריאת ה-MIC עבור Chlorhexidine diacetate שהתקבלו בניסוי, נמצאו ברובן נמוכות יותר מאשר התוצאות שהתקבלו במחקרים קודמים, עובדה המצביעה על יעילות החומר בקטילת החיידקים אשר נבדקו (טבלה 6). כמו כן, במרבית המחקרים אליהם הושוו תוצאות הניסוי, נעשה שימוש בריכוז גבוה יותר של Chlorhexidine diacetate, דבר המחזק גם כן את יעילות החומר בניסוי זה בהשוואה לספרות ((19), (20), (21)). תוצאות אלה מאששות את הצלחתו של התכשיר בעיכוב מגוון חיידקים, גראם חיוביים וגראם שליליים, ואף חיידקים הנחשבים לעמידים. יחד עם זאת, על פי הניסוי שנעשה בביה"ס לרוקחות ובשילוב עם תוצאות ניסוי מספר 2.2 (איורים 8-4), ניכר כי שחרור התכשיר נמשך לאורך זמן וריכוזו מעל ה-MIC של מרבית החיידקים. בכך, יכול התכשיר להוות תחליף ראוי לאנטיביוטיקה המשמשת היום בטיפול היובש. יש לזכור שהצלחה זו הוכחה בתנאי *in-vitro* בלבד ויש להמשיך לחקור את פעילותו *in-vivo* על מנת להעריך את יעילותו למניעה וטיפול בדלקות עטין, ובטיחות השימוש בו ברקמת העטין.

השימוש בכלורהקסידין למניעת דלקת עטין מוזכר בספרות מספר פעמים, כשימוש כחומר אנטיספטי חיצוני לפני ואחרי החליבה. במחקר שפורסם לאחרונה נמצא כי שימוש בכלורהקסידין 0.2% כחומר טבילה לחיטוי העטין יעיל כנגד מספר חיידקים המעורבים בדלקות עטין ובכך מסייע במניעת התפתחות דלקת חדשה (25). אולם, השימוש בכלורהקסידין במתן תוך עטיני אינו מוזכר בספרות, למעט מחקר אשר בדק שימוש באטם פטמה מלאכותי המכיל כלורהקסידין למניעת דלקת עטין בתקופת היובש, ונמצא יעיל רק בפרות ללא דלקת עטין קלינית ובעלות ספירת תאים סומטיים נמוכה (4).

לאור זאת, המחקר הוא חדשני ופורץ דרך בנושא מציאת תחליף לטיפול האנטיביוטי בפרות החלב, אשר נעשה בו שימוש נרחב ולו נזקים רבים בקנה מידה עולמי.

מסקנות

מטרת מחקר זה הייתה להעריך את יעילותו של תכשיר המכיל את החומר האנטיספטי chlorhexidine במערכת שחרור-מושהה, כחלופה לטיפול האנטיביוטי הניתן לפרות חלב בתקופת היובש. ההערכה בוצעה במספר שיטות אשר נועדו לבחון את יעילותו הבקטריוסטטית והבקטריוצידית של התכשיר *in-vitro* , על מגוון חיידקים הנפוצים כמחוללי דלקת עטין. התוצאות הציגו פעילות טובה של התכשיר על כלל החיידקים, בהשוואה לאנטיביוטיקה Nafpenzal DC® המשמשת כטיפול היובש הרווח כיום. בנוסף, נתוני ה-MIC של התכשיר שנמצאו במחקר זה היו נמוכים יותר מאלה שהוצגו במחקרים קודמים. לאור זאת נמצא שלתכשיר שנבדק בתנאי *in-vitro*, ובשלב הבא נבחן במבחני בטיחות *in vivo* , קיים פוטנציאל להוות תחליף ראוי

לאנטיביוטיקה כטיפול ומניעה של דלקות עטין חיידקיות בפרות בתקופת היובש. לשם כך דרוש ניסוי המשך שיבדוק הלכה למעשה את יעילות התכשיר בתקופת היובש בפרות חלב.

רשימת ספרות

1. Bailey, G.M., Jones, T.L. (2009). Understanding the Basics of Mastitis. *VirginiaTech*, 233-404: 1-5.

2. Heikkilä, A. M., Nousiainen, J. I., and Pyörälä, S. (2012). Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J. Dairy Sci.* 95: 139–150.

3. Krömker, V., Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction Domestic Animals*, 52(Suppl. 3): 21–29.

4. Petrovski, K. R., Tucker, I. G. (2011). Efficacy of a novel internal dry period teat sealant containing 0.5% chlorhexidine against experimental challenge with Streptococcus uberis in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 94 : 3366–3375.

5. Kelton, D. F., Lissemore, K. D., and Martin, R. E. (1998). Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81: 2502–2509.

6. Heringstad, B., Klemetsdal, G., and Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest. Prod. Sci.* 64: 95–106.

7. Koeck, A., Loker, S., Miglior, F., Kelton, D. F., Jamrozik, J., and Schenkel, F.S. (2014). Genetic relationships of clinical mastitis, cystic ovaries, and lameness with milk yield and somatic cell score in first-lactation Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 97: 5806–5813.

8. Hyde, R.M., Green, M.J. (2020). Automated prediction of mastitis infection patterns in dairy herds using machine learning. *Scientific Reports*, Article number: 4289: 10.

9. Phophi, L., Qekwana, N. (2019). Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from subclinical mastitis cow

milk samples submitted to the Onderstepoort Milk Laboratory. *BMC Veterinary Research* 15: 420: 1-9.

10. Rupp, R., and Boichard, D. (2003). Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 34: 671–688.

11. McDougall, S., Arthur, D. G., Bryan, M. A., Vermunt, J. J., and Weir, A. M. (2007). Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *N. Z. Vet. J.* 55: 161–170.

12. Scherpenzeel, C. G. M. and Lam, T.J.G.M. (2018). Economic optimization of selective dry cow treatment. *J. Dairy Sci.* 101: 1530.

13. O'Neill, J. (2014).Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health. *Issue Review on Antimicrobial Resistance*: 1-16.

14. Karpińsk, T.M., Szkaradkiewicz, A.K. (2015).Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*,19: 1321-1326.

15. Soliman, K. A., Singh, T.R.R. (2019). Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. *Drug Discovery Today*, volume 24, number 8: 1575-1586.

16. Galgatte, U.C. and Chaudhari, P.D. (2014). Preformulation study of poloxamer 407 gels: Effect of additives. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*Vol 6, Issue 1: 130-133

17. Bhattarai, P. (2018). Antibiogram of mercury resistant pseudomonas aeruginosa fron sewage samples of eastern Nepal., Project Report of department of microbiology central campus of technology, Tribhuvan university.

18. Funk, Dr. Bernhard. (2018). Biological Effects of Sustained Release Gels on Enterococcus faecalis' biofilm. *M.Sc. Research Thesis, s.l. : The Hebrew University of*

Jerusalem, Hadassah School of Dental Medicine, International Bio-Medicine Graduate Program.

19. do Vale, B.C.M. and de Melo, M.C.N. (2019). Decreased susceptibility to chlorhexidine and distribution of qacA/B genes among coagulase-negative Staphylococcus clinical samples. BMC 19: 199, s.l. : 1-5.

20. Popovich, K.J., Hayden, M.K. (2012). Relationship between Chlorhexidine Gluconate Skin Concentrationand Microbial Density on the Skin of Critically 111 Patients Bathed Daily with Chlorhexidine Gluconate. *Infection control and hospital epidemiology,* VOL. 33 , NO. 9: 889-896.

21. Amorim, C.V.G., Mayer, M.P.A. (2004).Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Endodontics*, 18(3): 242-246.

22. Spanos, N., Koutsoukos, P.G. (2007). Precipitation of Calcium Phosphate from Simulated Milk Ultrafiltration Solutions.*Crystal growth design*, NO: 1: 25-29.

23. Martin, P., Miglior, F.(2018). Symposium review: Novel strategies to genetically improve mastitis resistance in dairy cattle. 101: 2724-2736.

24. Varhimo, E., Savijoki, K. (2011). Alpha- and b-casein components of host milk induce biofilm ormation in the mastitis bacterium Streptococcus uberis. *Veterinary Microbiology* , 149: 381–389.

25. Schwenker, J. A., Schotte, U., Holzel, C.S. (2022). Minimum inhibitory concentrations of chlorhexidine- and lactic acid-based teat disinfectants: An intervention trial assessing bacterial selection and susceptibility. Journal of dairy science. 105: 734-747.

הבעת תודה

בשם כל החוקרים, הסטודנטים וצוות המעבדה אנו מבקשים להודות למועצת החלב על מתן המימון באמצעות הקרן שאפשר לנו לממש ביצוע מחקר זה.