

ד"ר ח מסכם להצעת מחקר מס 339-0016-20

היארעות, מאפיינים מולקולאריים, ניתוח ההתפשטות וגורמי סיכון משקיים לדלקת העטין עקב סטאפילוקוקוס אאורוס במשקי בקר בישראל.

מוגש למועצת החלב ע"י:

פרופ' עמוס אדלר	מרכז רפואי סוראסקי, תל-אביב
ד"ר רמה פלק	מאל"ה, מועצת החלב
ד"ר עדין שווימר	מאל"ה, מועצת החלב
תמר דה-לוי	מרכז רפואי סוראסקי, תל-אביב
מיכל לסנוי	מרכז רפואי סוראסקי, תל-אביב
קטיה לויצקי	מרכז רפואי סוראסקי, תל-אביב

הממצאים בד"ר ח זה הנם תוצאות ניסויים, ולא מהווים המלצות לחקלאים

שם החוקר הראשי: פרופ' עמוס
אדלר

חתימה:



תאריך: 12.10.22

תקציר:

רקע: דלקת עטין היא מחלה רב-גורמית השכיחה ושבגינה הנזק הכלכלי הגבוה ביותר ברפתות חלב. החיידק *Staphylococcus aureus* הוא פתוגן מדבק-עיקרי ואלים הגורם לדלקת עטין (ד"ע) קלינית ותת-קלינית, אשר הינה קשה ביותר לטיפול וביעור. בשנים האחרונות חלה עליה בתחלואת ד"ע סטפילוקוקלית זו אשר התבטאה בעליה במספר המשקים הנגועים בישראל. בבדיקת זני ה-*S. aureus* ממכלי חלב נמצא זן יחיד (spa t2873) האחראי לרוב הבידודים (65%). הסיבה לעליה בנגיעות אינה ברורה.

מטרות המחקר: 1. בדיקת היארעות דלקת העטין הנגרמת על ידי *S. aureus*. 2. אפיון מולקולרי, לפי טיפוס SPA, של בידודי *S. aureus* במקורם בדלקות עטין בישראל. 3. בדיקת תהליך ההתפשטות של זן אפידמי מסוים (SPA-type ספציפי) במשק נבחר עם היארעות גבוהה, עם בדיקת המתאם בין תהליכי החליבה לתבנית המולקולרית. 4. אפיון גורמי האלימות המולקולאריים הקשורים להתפשטות זן אפידמי זה. 5. בדיקת גורמי הסיכון המשקיים לנגיעות ב-*S. aureus*.

שיטות: במסגרת המחקר נאספו זני *S. aureus* מכלל דגימות מכלי החלב ודגימות לאבחון גורמי ד"ע, הנשלחות למעבדה לבריאות העטין במשך שנה. בזנים אלו בוצע אפיון מולקולארי על ידי *spa typing* ובדיקות רגישות לאנטיביוטיקה. נבדקו המתאמים בין מאפייני הרפתות והפרות להיארעות ד"ע. בידודים השייכים לזן האפידמי ברפת שבה נמצאה היארעות גבוהה במיוחד, נבדקו על ידי ריצוף גנומי, במטרה להבין את מנגונוני ההתפשטות באותה הרפת ולאפיין את הגנים לאלימות ועמידות באותו הזן. גורמי הסיכון המשקיים נבדקו באמצעות תשאול טלפוני של הרפתנים ומדריכי הרפתות.

תוצאות: במהלך שנת המחקר נאספו ונבדקו 409 זני *S. aureus* על ידי סווג מולקולארי. הממצאים מראים כי t2873, הזן האפידמי שזוהה כבר בסקר הקודם, אחראי גם כעת ל-69% מהבידודים ונמצא ביותר ממחצית המשקים החיוביים. ממצאים משמעותיים נוספים הם המצאות הזן t529 ב-22 משקים ו-46 בידודים, והתפרצויות מבודדות של הזנים t1250 ו-t543. בדיקות רגישות בוצעו ב-326 בידודים. MRSA נמצאו ב-13 בידודים בלבד (4%), בקרב סוגי spa שונים. המספר הגבוה ביותר (25) של בידודי *S. aureus* מ-*spa type t2873*, נמצא במשק 'A'. באמצעות ריצוף ניתן היה לעקוב אחר העברת החיידק בין הפרות בתוך קבוצות החליבה ובהתאם לסדר החליבה, וכן מעבר בין הקבוצות בהתאם להעברת פרות מקבוצה לקבוצה. כמו כן נמצא כי *spa type t2873* מכיל גנים המקודדים לחלבוני הצמדות שונים, המיוחסים לוירולנטיות. בסקר האפידמיולוגי נמצא שהגורמים המפחיתים את הסיכון להיארעות גבוהה הם שימוש במתקן חליבה מקבילי וטיפול יובש סלקטיבי. בניתוח רב משתני, הגורמים שנמצאו קשורים לסיכון מופחת להארעות *S. aureus* היו (1) טיפול יובש סלקטיבי בהשוואה לכללי ($p=0.059$) ו-(2) מבנה מחלבה מקבילי ($p=0.002$).

מסקנות: ממצאי הסקר עד כה מצביעים על התפשטות של זן בודד, t2873, ברוב המכריע של הזנים בארץ. אל אף שזוהו גורמים התורמים להפחתת הסיכון, יש למצוא דרכים להפחתת התפשטות החיידק בין הרפתות.

מבוא ותיאור הבעיה:

החיידק *Staphylococcus aureus* הינו חיידק גרם-חיובי המהווה את אחד מגורמי המחלות החשובים ביותר בבני אנוש ובבקר. בפרות, *S. aureus* הינו אחד מהגורמים החשובים ביותר לדלקת עטין (ד"ע) קלינית וכן לד"ע תת-קלינית [1]. הדבקה ב-*S. aureus* עלולה להביא לד"ע כרונית שהיא קשה ביותר למיגור ע"י טיפול אנטיביוטי בלבד ומביאה במקרים רבים להפסקת התחלובה בפרות הנגועות [2] ולהוצאה מאולצת. לפיכך, הדבקה ב-*S. aureus* עשויה לגרום לפגיעה קשה בתנובת החלב וברווחיות הרפת. עקב הקושי הניכר במיגור הנגיעות ברפת, ישנה חשיבות רבה למניעת התפשטות החיידק ע"י שורה של אמצעים הכוללים אמצעי היגיינה, בעיקר בחליבה, ציוד חליבה תקין המונע פגיעה בעטין, הוצאת פרות הנגועות כרונית, טיפול אנטיביוטי בפרות הנגועות ובידודן משאר העדר [1,2]. בנוסף לכך, *S. aureus* עשוי להיות מועבר אל ומצוות הרפת ובכך לגרום לתחלואה בבני אנוש עצמם, אשר נעה בחומרתה מזיהומי עור לאלח דם וזיהומים מסכני חיים אחרים [3].

זני *S. aureus* ניתנים לאפיון והשוואה באמצעות שיטות מולקולאריות שונות המבוססות ברובן על בדיקת רצפי DNA. באופן זה נמצא כי זני ה-*S. aureus* הגורמים לתחלואה בבקר שונים ככל הנראה מאלו הגורמים לתחלואה באדם ומתאפיינים בגורמי אלימות ספציפיים [4,5]. אחד הזנים אשר מדווחים בשכיחות רבה באירופה בבקר ובחיות משק נוספות נקרא clonal complex (CC)-398 והוא נמצא בשכיחות גבוהה גם בקרב חוואים המטפלים בחיות הנגועות [6]. זן זה, העמיד למטיצילין מתואר בספרות כ- livestock-associated (LA) MRSA, גרם להתפרצות בישראל בבקר (<https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2018/09/IDF-Animal-Health-Report-Web.pdf>) אבל שכיחותו הכוללת נותרה נמוכה.

בשנים האחרונות נצפתה מגמה מדאיגה של עליה במספר ובשיעור הרפתות הנגועות ב-*S. aureus* בישראל. עליה זאת עשויה להיות מוסברת בשינויים בנהלי החליבה, במיוחד במשקים גדולים אשר מגבילים את האפשרות לשגרת חליבה היגיינית מלאה. עם זאת, לאור העלייה בנגיעות במספר גדול של משקים שונים (43% מסה"כ הרפתות שנדגמו בשנת 2017) מוצע הסבר נוסף והוא הופעה והתפשטות של זן אפידמי חדש של *S. aureus* קרי, זן בעל פוטנציאל ביולוגי להתבססות והתפשטות ברפתות.

במחקר הקדמי שערכנו בבידודים מדגימות חלב בשנים 2015-2016 נמצא כי זן אחד הנקרא spa t2873 אחראי ל-35/54 (65%) מהבידודים של *S. aureus* רגישים למטיצילין (MSSA). הזן spa t2873 אותר ב-32 מהרפתות. זן זה, אף על פי שאינו ידוע כגורם מחלה בבני אנוש, דווח בעבר באירופה בבידודים מפרות או חלב [4]. ממצא זה מעלה את החשש כי העלייה הדרמטית במספר המשקים הנגועים ב-*S. aureus* קשורה להופעתו של זן זה בישראל.

לפיכך, לשם נקיטת אמצעים לבלימת העליה בנגיעות, ישנה חשיבות רבה להבנת הקף הנגיעות ברפתות בארץ, מציאת הגורמים העשויים להיות קשורים לה והבנת התפשטותה.

מטרות המחקר:

1. בדיקת היארעות דלקת העטין הנגרמת עקב *S. aureus* ברפת החלב הישראלית החל מ-01.09.2019 ועד ל-31.08.2020
2. אפיון של הבידודים המתקבלים בתקופה זאת לפי זנים אפידמיים ע"פ spa typing
3. בדיקת תהליך ההתפשטות של זן אפידמי מסוים (SPA-type ספציפי) במשק נבחר עם היארעות גבוהה, כולל מעקב אחר התפשטותו ברפת
4. אפיון גורמי האלימות המולקולאריים הקשורים להתפשטות זן אפידמי זה
5. בדיקת גורמי הסיכון המשקיים לזיהום עקב *S. aureus*.

שיטות:

1. בחינת היארעות דלקת העטין הנגרמת עקב *S. aureus* בכלל וזנים אפידמיים אחרים בפרט (spa t2873 או אחרים) נבדקו ע"י איסוף פרוספקטיבי של כלל הבידודים מדגימות של דלקת העטין ומדגימות מכלי חלב הנשלחות למעבדה לבריאות העטין – מאל"ה, בקיסריה במשך שנה, מה-1.9.19 ועד ה-31.8.20.
2. שיטות מיקרוביולוגיות: דגימות חלב ממכלי החלב ומדלקת העטין נשלחות בשגרה למעבדת מאל"ה, בקיסריה. הדגימות תורבתו לחיידקים שונים, כולל *S. aureus* והחיידקים מזוהים ע"פ מבחנים ביוכימיים מקובלים (קואגולז, DNAse). בדיקות הרגישות נערכו במרת"א ע"י disk-diffusion.
3. אפיון מולקולארי - DNA גנומי הופק מכל הבידודים באמצעות קיט של חברת QIAGEN לשם ביצוע הבדיקות המולקולאריות להלן. בדיקת המבנה השבטי של הזנים התבצעה באמצעות בדיקת spa typing. ניתוח הרצפים נעשה באמצעות DNAGear [8].
- לשם אפיון הזן המרכזי בישראל (t2873) וחקירת התפשטות הזן במשק נבחר, נבחרו כלל הבידודים מאותו המשק (n=25) לשם ניתוח גנומי באמצעות Next generation sequencing (NGS) אשר בוצע באמצעות מכשיר MiSeq Illumina במרת"א. עיבוד של נתוני הריצוף, השוואת הגנום לגנומים אחרים של החיידק וזיהוי גנים ספציפיים בוצע ע"י תוכנת CLC Genomics Workbench [9]. באמצעות המידע הגנומי התווה מסלול ההתפשטות של החיידק באותה רפת.
- בנוסף, הגנום של הזן האפידמי t2873 הושווה in-silico לגנום של זני *S. aureus* אחרים ב-NCBI כדי להגדיר גנים לאלימות המאפיינים זן זה בהשוואה לזנים אחרים.
4. מחקר אפידמיולוגי - בכדי לבדוק את גורמי הסיכון לדלקת העטין עקב *S. aureus* בכלל והזן האפידמי בפרט, נבדקו גורמי הסיכון בכלל המשקים אשר שלחו דגימות חלב, כולל אלו שבהם לא

נמצאו דגימות חיוביות. המשתנים שנבדקו כוללים (1) מאפיינים כלליים של סביבת המחיה והמשק: מיקום הרפת, סוג המשק (שיתופי/משפחתי), כמות הפרות במשק, סוג מכון החליבה, יחס בין כמות הפרות במשק לגודל מכון החליבה; (2) מאפיינים הנוגעים לממשק של מניעת זיהומים: חיטוי עטין לפני ואחרי חליבה, שימוש במברשת הכנה, טיפול יובש כולל/סלקטיבי, הפרדת פרות נגועות, ניוון רבע נגוע, סוג האנטיביוטיקה בטיפול יובש. מאפייני המשקים נאספו בחלקם ע"י שאלון טלפוני מהרפתנים ובחלקם מהמדריכים הממונים על אותן רפתות.

גורמי הסיכון חושבו ע"י המתאמים בין המשתנים הבלתי תלויים למשתנים התלויים ע"י מבחן t או מבחן פירסון. משתנים עם $p < 0.1$ נכללו בניתוח רב-משתני שבוצע ע"י ריגרסיה לוגיסטית או ע"י מודל לינארי כללי. הניתוח הסטטיסטי בוצע ע"י תוכנת SPSS.

תוצאות:

1. היארעות *S. aureus* במשקי החלב בישראל

במהלך השנה שבה נאספו בידודים של *S. aureus* (ספטמבר 2019 ועד לאוגוסט 2020) החיידק אובחן ב-1.7% מכלל הדגימות, ב-152 משקים מבין 547 המשקים ששלחו דגימות למעבדה לבריאות עטין בתקופה זו. בסה"כ נאספו בתקופה זאת 440 בידודים של החיידק, 394 מהם מפרות פרטניות ו-46 מדגימות מיכל. מבין הדגימות הפרטניות אובחנו 165 בידודים מדגימות 'קליניות' ו-180 מפרות להן ספירות תאים סומטים (סת"ס) גבוהות (תת-קליניות).

2. מאפיינים מולקולריים של בידודי *S. aureus*

ההתפלגות של חיידקי *S. aureus* לפי סוגי *spa* מוצגת בטבלה 1. זן MSSA t2873 נמצא ב-284 בידודים (64.5%) ב-112 חוות (73.6% מהחוות הסובלות), הן בדגימות בודדות והן במיכלים. ההתוויות הנפוצות לדגימות בודדות היו זיהום קליני (n=126) וספירת תאים סומטיים גבוהה (n=100). סוגים נפוצים אחרים של MSSA (n>10) היו t1250, t9303, t529.

זן ה-MRSA השכיח ביותר היה t011 שזוהה בשלוש חוות. ככלל, שיעור ה-MRSA היה נמוך מאוד (13/440, 3%), כאשר סוגי MRSA אחרים כללו את t034 ואת t2346, זן בודד בכל אחד.

Spa type	Farms (n)	Isolates (n)	Sample type ¹ (n)
11	3	11	I (10), T (1)
34	6	9	I (7), T (2)
127	2	2	I (1), T (1)
355	2	3	I (3)
529	22	46	I (36), T (10)
543	1	9	I (9)
937	2	2	I (2)
1250	1	13	I (13)
2873	112	284	I (259), T (25)
2970	1	5	I (4), T (1)
9303	12	34	I (32), T (2)
11253	1	7	I (7)
16822	2	2	I (1), T (1)
19690	2	2	I (2)
19693	1	2	I (2)

טבלה 1. התפלגות סוגי ה-*spa* השונים בקרב בידודי *S. aureus* במשקי החלב

¹-I-individual sample, T-bulk-tank sample. Other *spa* type that were present in only one sample included 111, 701, 1534, 2346, 2802, 2876, 19691, 19692 and non-typeable.

3. בדיקות רגישות לאנטיביוטיקה

שיעור ה-MRSA שנמצא נמוך מאוד (13 מבין 440, 3%) שיעור הרגישות לאנטיביוטיקה היה גבוה מאוד (בסדר עולה, בהתאמה): דוקסיצילין, ציפרופלוקסצין, ג'נטמיצין, קלינדמיצין, אריתרומיצין, ריפאמפין, טרימתופרים-סולפמתוקסאזול ולינזוליד בשיעורים הבאים: 100, 99.3, 98.8, 97.7, 95.6, 63.4%, בהתאמה.

4. ההתפשטות של spa t2873 במשק 'A'

תיאור של משק 'A': רפת משותפת לשלושה משקים, בה כ-1,000 חולבות, הממוקמת בנגב. הפרות נחלבות שלוש פעמים ביום, במכון "קרוסלה" עם 32 עמדות. חיטוי פטמות, אחרי הסרת אשכול החליבה, בריסוס עם זרוע אוטומטית, עם חומר על בסיס יודופור. עשר קבוצות חליבה בסדר התחלובות: מבכירות (תחלובה ראשונה) תחלובה שניה, תחלובה שלישית וכן הלאה. פרות הנגועות בחיידקים מדבקים (*S. aureus* ו-*Streptococcus dysgalactiae*) מועברות לקבוצה שנחלבת אחרונה. בכל קבוצת חליבה בין 90 ל-120 פרות. הפרות נשארו באותה קבוצת חליבה בתקופת המחקר להוציא מקרים בהם אובחנו החיידקים המדבקים *S. aureus* ו-*Streptococcus dysgalactiae* בעטין ופרות לקראת "יובש" (קבוצה 39) שנחלבות לפני הקבוצה האחרונה. שגרת הניטור ברפת קבועה מזה שנים וכוללת (כך גם במהלך תקופת המחקר) משלוח של דגימות מכל "רבע" קליני, תת-קליני – לפי סת"ס מעל 400,000/במ"ל חלב) 4-7 ימים לאחר המלטה, לקראת "יובש" ולמעקב אחרי טיפול.

פירוט לגבי 25 הבידודים, שהתקבלו מהמשק לפי חודשי השנה ובהתאם לקבוצות החליבה אליהן השתייכו הפרות באותה העת, מתואר בתמונה 1a. ניכר פיזור ספורדי לאורך השנה, להוציא צבר של בידודים מקבוצה 7, בין החודשים ינואר-אפריל 2020. בעזרת אנליזה WGS ניתן היה לנתח את ההעברה של הזן במשק, והיא מתוארת בתמונות 1b ו-1c. ניתן לכמת את המרחק בין הבידודים לפי השינויים ברצף חומצות הגרעין, כמתואר בתמונה 1b. מקורם של רב הבידודים, (68%) 17/25, מפרות שהיו במגע לפחות עם פרה אחת נוספת עם בידוד מאוד דומה/קרוב.

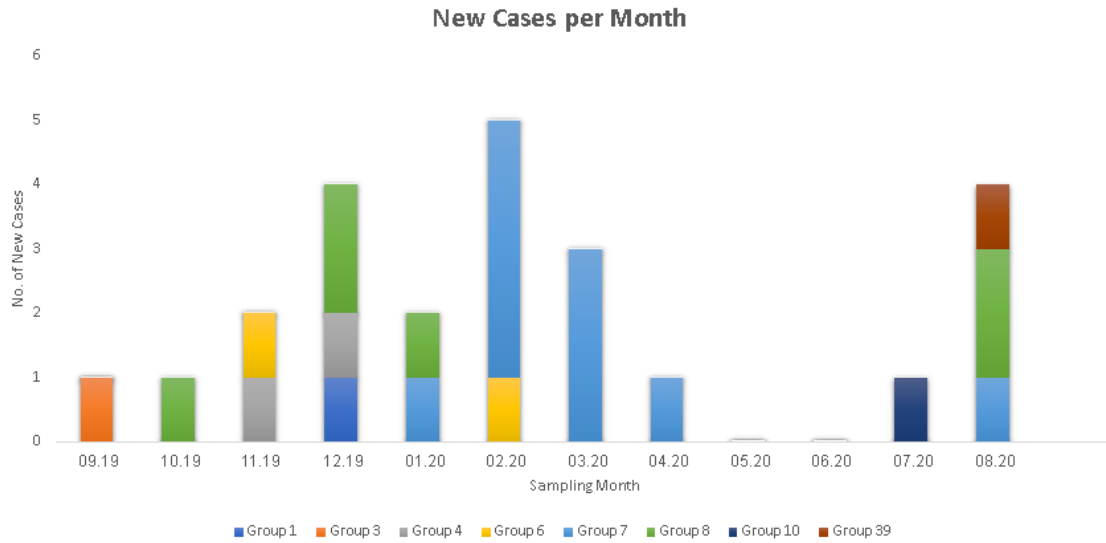
לא ניתן היה להגדיר מסלול ברור של הדבקה לאורך זמן ומקום באמצעות הבדיקות הפילוגנטיות (תמונה 1b), אולם ניתן היה לזהות מצבור של בידודים שעבר בין קבוצות החליבה (תמונה 1c): מעקב פרטני אחר המעבר של הפרות בין הקבוצות, המיוצג ע"י החיצים, אפשר מעקב אחר התפשטות החיידק.

כך לדוגמא, הצבר הגדול – בסגול – הכולל שמונה פרות, זוהה בשלוש קבוצות החליבה 1, 4, ו-8. קבוצה מס' 7, יועדה לפרות עם נגיעות תוך-עטינית (IMI). כך למשל פרה 286 מקבוצה 1, ופרות 184 ו-251 מקבוצה 2) ובנוסף שימשה קבוצה זאת גם כמוקד להדבקה נוספת (כמו למשל בפרה 141). אפשר לראות כי המעבר של החיידק בין קבוצות החליבה התרחש לעיתים דרך קבוצת חליבה נוספת. כך קרה כאשר פרות 37 ו-88, נדבקו כאשר היו יחד בקבוצה 39, הן הועברו לקבוצות אחרות והדביקו פרות נוספות: פרה 419 מקבוצה 6 נדבקה מפרה 88 לפני שעברה לקבוצה 7.

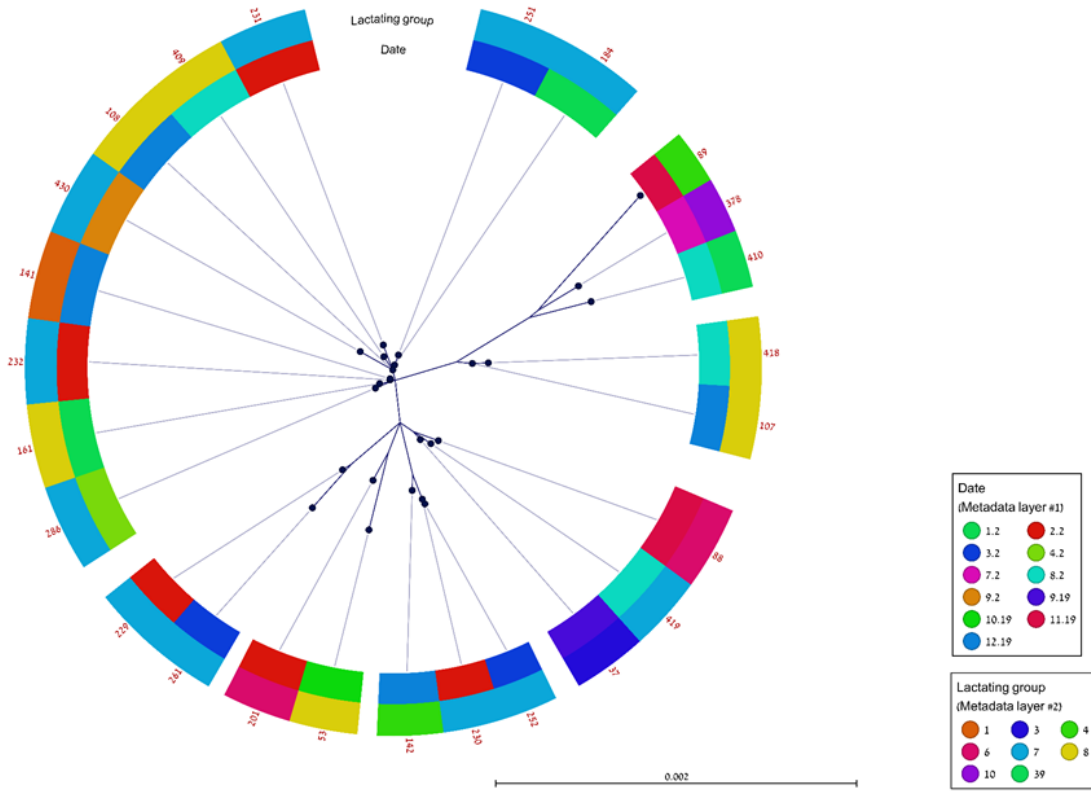
- ניתן להבחין בשני מקרים של העברה של החיידק בין קבוצות חליבה בגלל סדר החליבה:
- העברה בין פרה 142 ופרה 230 שנגרמה ככל הנראה מחליבה של קבוצה 3 לאחר קבוצה 4
 - העברה בין פרות 141 ו-108 ככל הנראה עקב חליבה של קבוצה 8 אחרי קבוצה 1 בצבר בודד, בצבע צהוב, לא נמצא כל הקשר אפידמיולוגי.

תמונה 1. מעקב אחר העברה של *S. aureus* מזן t2873 במשק A

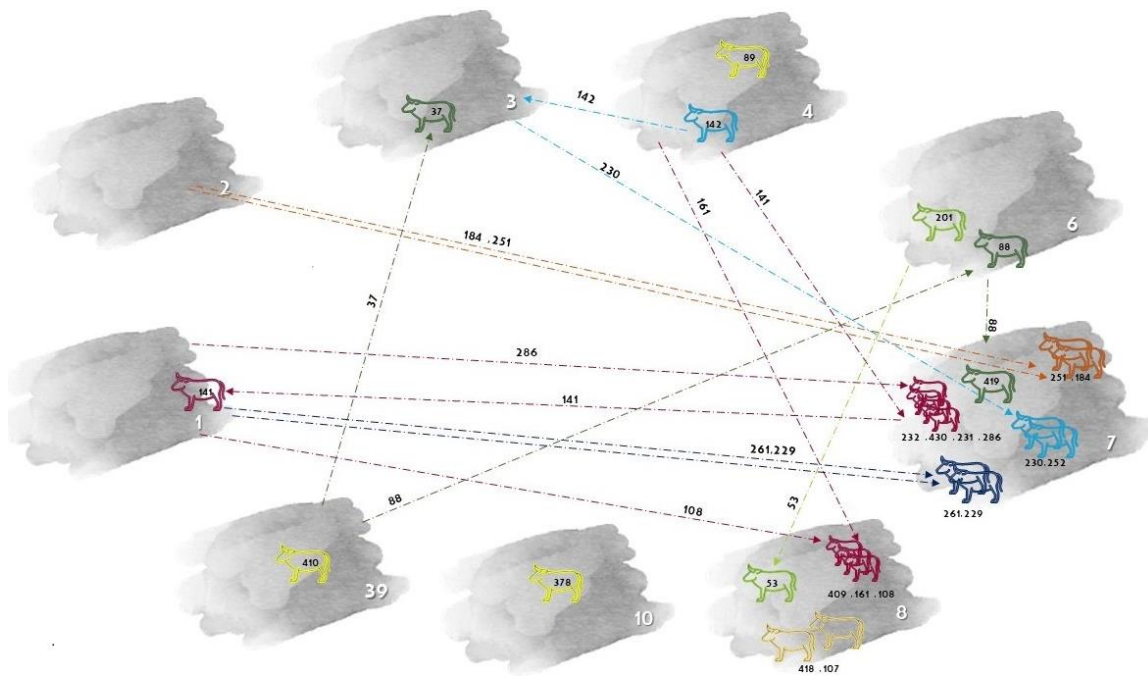
תמונה 1a: התפלגות מס' האבחונים של *S. aureus* בין ספטמבר 2019 לאוגוסט 2020



תמונה 1b: אנליזה פילוגנטית של הבידודים



תמונה 1c: העברת פרות בין קבוצות החליבה



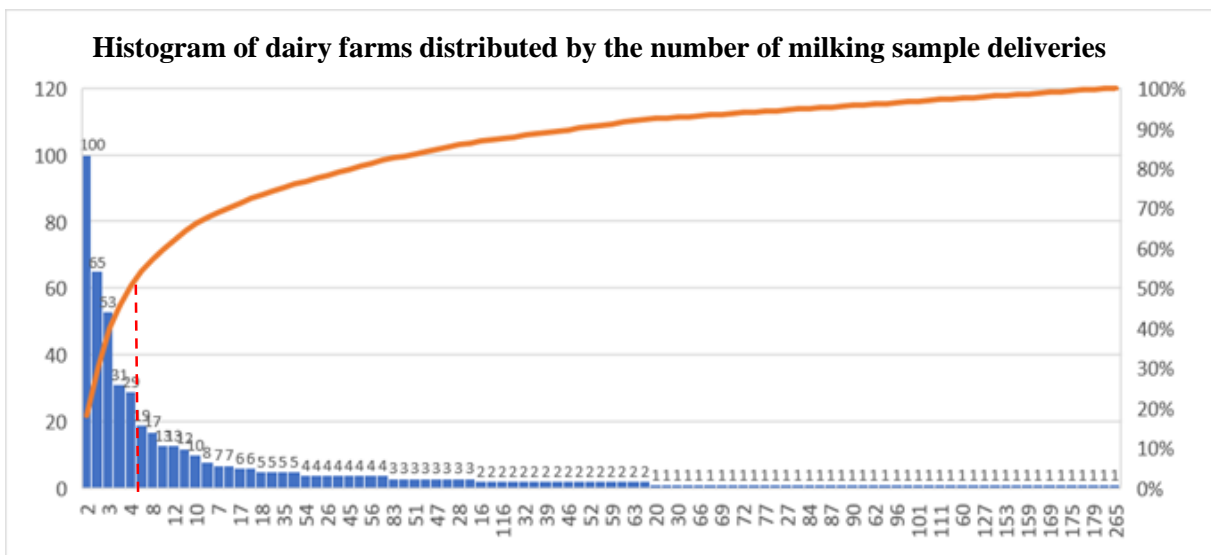
5. מאפיינים מולקולאריים של הזן האפידמי 2873

ניתחנו את מנגנוני העמידות וגורמי האלימות האפשריים של זן 2873 באמצעות WGS. גן העמידות היחיד שהתגלה היה הגן *tetM*, שגורם לעמידות לטטרציקלין אך לא לדוקסיציקלין. הזן הכיל גנים למספר גורמי וירולנטיות פוטטיביים, כולל המוליזינים (*hla*, *hly*, *hld*, *hlyA-B-C*), אורוליזין (*aur*), ליפאז (*lip*), חלבוני הידבקות תוך-תאיים (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*), חלבון הידבקות קולגן (*can*), גנים לקפסולה (*cap8A*, C-E, G, H-P), ציסטאין פרוטאז (*sspB-C*) ומערכת הפרשה מסוג VII (*esaA-C*, *essA-C*, *esxA-B*).

6. ממצאי הסקר האפידמיולוגי

במהלך תקופת המחקר, מה-01.09.2019 ועד ל-31.08.2020 התקבלו דגימות מ-547 רפתות. מספר המשלוחים שהתקבלו מכל משק לאורך פרק זמן זה נע בין שני משלוחים ל-22 משלוחים, והחציון הנו חמישה משלוחים (תמונה 2). מבין כלל המשקים נכללו בסקר האפידמיולוגי משקים ששלחו לפחות שישה משלוחים (מעל חמישה משלוחים, החציון) והם כללו 269 משקים, כאשר ב-123 מהם אובחן *S. aureus* וב-146 משקים לא אובחן.

תמונה 2: התפלגות מס' המשקים לפי מס' המשלוחים ששלחו דגימות למעבדה



על הציר האופקי-מס' המשלוחים, מס' המשקים ואחוז המשקים לכל עמודה, על הצירים האנכיים-שמאל וימין בהתאמה. הקו האדום מראה את הצטברות העמודות באחוזים, והמקווקו את ערך הסף של שישה משלוחים

בטבלה 2 מוצגים המאפיינים הכלליים של המשקים שנכללו בסקר האפידמיולוגי וכן מאפיינים הקשורים בממשק כללי ובכל הקשור להתנהלות המשק בתחום בריאות העטין והחליבה בהקשר לנגיעות תוך-עטינית ב-*S. aureus*. בטבלה 3 מובא ניתוח סטטיסטי של ההקשרים בין מאפיינים ממשקיים לבין הנגיעות בחיידק.

נמצא כי מספר החולבות במשקים בהם אובחן החיידק גדול בצורה מובהקת מבמשקים בהם לא אובחן החיידק (20 ± 2339 לעומת 273 ± 214 , $p=0.015$), וכמו כן העומס במכון החליבה, הנמדד במספר עמדות חלבה למספר חולבות, היה גדול יותר משמעותית ברפתות בהן החיידק אובחן (0.12 ± 0.06 לעומת 0.09 ± 0.04 , $p < 0.01$). נעשה שימוש במספר האבחונים של החיידק לכל 1,000 חולבות לצורך השוואה בין סוגי המכונים השונים. כך נמצא כי במשקים בהם משתמשים במכון מטיפוס 'קרוסלה' (המצויים בשימוש רק בכ-9% מהמשקים), נמצאה נגיעות תוך-עטינית גבוהה יותר בצורה מובהקת מאשר במכונים מטיפוס 'שדירת דג' (הנפוץ ביותר מבין סוגי המכונים), מהמשקים בהם מכונים מטיפוס 'מקבילית', וכן כאשר משווים לכלל המכונים שאינם מטיפוס 'קרוסלה', ועמד על 8.22, 5.6, 2.41 ו-4.45 בהתאמה ($p < 0.01$). עוד נמצא כי הנגיעות בחיידק במשקים בהם חולבים במכון מסוג 'שדירת דג' גבוהה בצורה מובהקת מאשר במשקים בהם חולבים במכון מסוג 'מקבילית' ($p < 0.01$).

כפי שניתן לראות בטבלה 3 נמצאו קשרים חיוביים מובהקים בין השימוש במברשת הכנה, בטיפול אנטיביוטי גורף (BDT) בהפרדה של פרות נגועות לקבוצת חליבה אחרונה, ובייבוש של פרות בהן אובחנה נגיעות בחיידק, לבין הנגיעות בחיידק. לעומת זאת לא נמצאה מובהקות בין ניוון של רבע ושל חיטוי פטמות לפני החליבה לבין הנגיעות בחיידק. היות שבכל המשקים נהוג לחטא בתום החליבה, משתנה זה לא נכלל בניתוח. חלק מהגורמים הקשורים לניהול רפת עם פרות נגועות (הפרדת הפרות הנגועות מהעדר או בזמן החליבה) לא נכללו מאחר ונראה כי הממצא משקף הטיית מידע, קרי-הרפתנים ברפתות שאינן נגועות לא ידעו וכמובן לא ישמו אמצעים אלו.

בניתוח רב משתני של הסיכון לנגיעות כלשהיא נכללו המשתנים (1) שימוש במברשת הכנה; (2) צפיפות הרפת; (3) ניהול הרפת. כמו כן, סוג המחלבה נותח בשני אופנים, כאשר הסוג הנבחר (קרוסלה או מקבילית) הושווה לשאר הסוגים. הגורמים שנמצאו קשורים לסיכון מופחת לנוכחות *S. aureus* באופן בלתי תלוי הם (1) ניהול פרטי בהשוואה לשיתופי ($O.R.=0.218$, 95% C.I. 0.116-0.411, $p < 0.001$) ו- (2) מבנה מחלבה מקבילי ($O.R.=0.199$, 95% C.I. 0.095-0.416, $p < 0.001$).

בניתוח רב משתני של הסיכון להיארעות גבוהה של *S. aureus* נכללו המשתנים (1) שימוש במברשת הכנה; (2) חיטוי פטמות לפני חליבה; (3) טיפול יובש. כמו כן, סוג המחלבה נותח בשני אופנים, כאשר הסוג הנבחר (קרוסלה או מקבילית) הושווה לשאר הסוגים. הגורמים שנמצאו קשורים לסיכון מופחת לנוכחות *S. aureus* באופן בלתי תלוי הם (1) טיפול יובש סלקטיבי בהשוואה לכללי ($p=0.059$) ו- (2) מבנה מחלבה מקבילי ($p=0.002$).

		No. of farms in category, N (%)	Mean No. of milking cows per farm \pm SD	<i>S. aureus</i> Detected, N (%)	<i>S. aureus</i> Not Detected, N (%)	P-value
covariate						
<i>continuous covariates</i>						
No. of milking cows in Farm (mean \pmSD)	farms (N)			119 339 \pm 220	145 273 \pm 214	0.02
Crowdedness in Milking Parlor (milking stations/head) (mean \pmSD)	farms (N)			116 0.09 \pm 0.04	90 0.12 \pm 0.06	<0.01
<i>categorical covariates</i>						
Milking parlour structure, N (%)		264		119	145	
	'Herring Bone'	168 (64)	231 \pm 143	81 (48)	87 (52)	0.01 ¹
	Rotary	24 (9)	578 \pm 233	18 (75)	6 (25)	
	Parallel	59 (22)	380 \pm 265	17 (29)	42 (71)	<0.01 ¹
						<0.01 ²
	Tandam	6 (2)	137 \pm 98	2 (33)	4 (64)	0.05 ¹
	Robotic	7 (3)	93 \pm 23	1 (14)	6 (86)	<0.01 ¹
Farm Management, N (%)		266		120	146	
	Private (Moshav)	123 (46)	142 \pm 98	35 (28)	88 (72)	<0.01
	Cooperative (Kibbutz)	143 (54)	415 \pm 209	85 (59)	58 (41)	
Pre-Milking Udder Disinfection, N (%)		209		119	90	
	Yes	201 (96)	296 \pm 213	116 (58)	85 (42)	0.26
	No	8 (4)	435 \pm 304	3 (38)	5 (62)	
	Unknown	57		1	56	
Post-Milking Udder Disinfection, N (%)		209		119	90	
	Yes	209 (100)	300 \pm 219	119 (57)	90 (43)	

	No	0 (0)		0	0	
	Unknown	57		1	56	
Preparation Brush, N (%)		208		118	90	
	Yes	25 (12)	404±239	19 (76)	6 (24)	0.04
	No	183 (88)	287±213	99 (54)	84 (46)	
	Unknown	58		2	56	
Dry Cow Therapy, N (%)		194		104	90	
	Collective	172 (89)	294±218	94 (55)	78 (45)	0.42
	Selective	22 (11)	299±171	10 (45)	12 (55)	
	Unknown	72		16	56	
Separation of Infected Cows for Milking Last, N (%)		187		98	89	
	Yes	93 (50)	342±218	55 (59)	38 (41)	0.07
	No	94 (50)	234±173	43 (46)	51 (54)	
	Unknown	79		22	57	
Removal of Infected Cows, N (%)		179		90	89	
	Yes	101 (56)	343±221	65 (64)	36 (36)	<0.01
	No	78 (44)	229±166	25 (32)	53 (68)	
	Unknown	87		30	57	
Infected Quarter-Udder Drying, N (%)		179		89	90	
	Yes	69 (39)	300±212	34 (49)	35 (51)	0.88
	No	109 (61)	287±204	55 (50)	54 (50)	
	Unknown	88		31	57	

טבלה 2: התפלגות הנגיעות התוך-עטינית ב-S. aureus בהתאם למאפיינים כלליים של המשק ולהתנהלות המשק בכל הקשור לבריאות העטין.

.P-Value was calculated comparing each category to a Rotary parlor; 2 P-value comparing parallel parlor to a fish bone parlor 1

<i>categorical covariates</i>	No. of <i>S. aureus</i> cases per category (N)	No. of milking cows per category (N)	Rate of <i>S. aureus</i> detection per category (per 1000 milking cows)	P-value
Milking Parlor structure				
Fish Bone	216	38,577	5.6	<0.01 ¹
Rotary	114	13,869	8.22	<0.01 ¹
Parallel	53	22,029	2.41	<0.01 ²
Tandam	4	819	4.88	0.4 ¹
Robotic	3	652	4.6	0.5 ¹
Farm Management				
Private (Moshav)	86	17,157	5.01	0.8
Cooperative (Kibbutz)	309	58,888	5.25	
Pre-Milking Udder Disinfection				
Yes	378	59,167	6.39	0.1
No	14	3,481	4.02	
Post-Milking Udder Disinfection				
Yes	390	62,406	6.25	
No	0	0		
Preparation Brush				
Yes	103	10,103	10.19	<0.01
No	283	52,161	5.43	
Dry Cow Therapy				
Collective	318	50,502	6.30	<0.01
Selective	19	6,276	3.03	
Infected cows milked last				
Yes	239	31,823	7.51	<0.01
No	81	21,745	3.73	
Removal of Infected Cows				
Yes	240	34,334	6.99	<0.01
No	70	17,865	3.92	
Infected Quarter-Udder Drying				
Yes	118	20,393	5.79	0.7
No	190	31,301	6.07	

טבלה 3: ניתוח סטטיסטי של ההקשרים בין מאפיינים ממשקיים לבין הנגיעות ב-*S. aureus*

¹ P-Value was calculated comparing each category to a Rotary parlor; ² P-value comparing parallel parlor to a fish bone parlor.

דיון:

- שיעור הנגיעות ב-*S. aureus* במשקים שנדגמו הנו 27.7% [3], והוא דומה לשיעור הנגיעות במקומות אחרים בעולם [13-15] אם כי אין אפשרות לערוך השוואה ישירה בשל הבדלים במבנה ובשיטות הדיגום.

במהלך המחקר התגלה כי אחד הזנים, t2837, נמצא בשיעור גבוה במיוחד של משקים, 73.6%, והיווה 64.5% מכלל הבידודים בתקופת המחקר. זהו ממצא חריג, שאין שני לו בעולם, למיטב ידיעתנו:

הזן הנפוץ ביותר בסקר שנערך בקרואטיה [7], אובחן בקרב 14% מהבידודים בלבד; בצפון גרמניה, הזן הנפוץ ביותר אובחן רק ב-27% מהבידודים [5]; בדנמרק אובחנו שני זנים בשיעור דומה של 27% כל אחד [16] בסקר שבחן המצאות בחזירים, עופות ובקר, כאשר t2873 אובחן בבידודים מבקר בלבד; בסקר נוסף שכלל את ארה"ב, איטליה וישראל אובחן הזן ST479, המקביל ל-t2873, רק בבקר [17].

- האם ההסבר לתופעה הזאת טמון ברצף המייחד את הטיפוס t2873?

האפיון הגנומי של טיפוס זה גילה הימצאותם של מספר גנים שיכולים להיות מקושרים לוורולנטיות, בהם בעיקר גנים להמוליזינים, הצמדות לקולגן (*cna*), וחלבוני הצמדות תוך-תאיים. אולם הקשר בין המצאות גנים מסוימים לבין מאפיינים קליניים של דלקות עטין אינו ברור [6, 17]. במחקר שבדק את ההתאמה בין גנים ספציפיים לבין מאפייני הדלקת (קלינית לעומת תת-קלינית) לא נמצאה התאמה לגנים מסוימים, אבל נמצאה התאמה בין מאפיינים של דלקות קליניות לבין הימצאותם של זנים מסוימים של החיידק, ובהם הזן CC479, אשר כולל גם את טיפוס t2873 [18]. כלומר, לא נמצא הסבר מלא לתופעה ברפת הישראלית בהימצאותם גנים מסוימים, ואפשר לשער כי הטיפוס t2873 עבר בין הרפתות, בעיקר דרך סחר של עגלות והעברתן בין הרפתות וכך התפשט בכל הארץ.

- הזן השני בשכיחותו בקרב בידודי *S. aureus*, הנו t529, המוכר כגורם לדלקות עטין ממקומות אחרים בעולם [5, 7, 17] אשר אובחן ב-22 משקים ובידודים.

- בידודים של MRSA היו נדירים (3%, 13/440), ורובם (n=13) מטיפוס t011, המשתייך לקלון הקשור בחיות משק CC298.

- ניתן היה לעקוב אחר המעבר של החיידק במשק 'A' באמצעות אנליזה של כלל הגנום (WGS) –

רב העברות החיידק היו בתוך קבוצות החליבה, במקרים בהם הפרות נחלבו אחת אחרי השנייה.

העברות החיידק בין קבוצות החליבה קרו כאשר הייתה העברה של פרות בין הקבוצות.

זהו המחקר הראשון העוקב אחר העברות של *S. aureus* רגיש בתוך המשק באמצעות WGS. מחקרים כאלה נעשו בעבר לגבי MRSA [19,20].

- מממצאי הסקר האפידמיולוגי עולים מספר ממצאים, אשר יש לנתח אותם לאור המגבלות המתודולוגיות שלו: 1) חלק מהמאפיינים (כגון, מידת הניקיון) לא היו ניתנים לאיסוף; 2) מידת ההיענות והידע של המשתתפים הייתה מוגבלת בחלק משמעותי של המשקים; 3) חלק מהתשובות הנוגעות למדיניות הטיפול נבעו מהטיית מידע. כך למשל נמצא קשר בלתי הגיוני בין קיום מדיניות של העברת פרות נגועות בחיידק לקבוצה, נחלבה אחרונה והוצאת פרות הנגועות כרונית, לשיעור גבוה של נגיעות בחיידק. קרוב לוודאי שממצא זה נובע מכך שרק ברפתות הנגועות המדיניות הייתה מוכרת.

ביצענו את הניתוח בשני אופנים, כאשר המשתנה התלוי (הנגיעות בחיידק) נבדק הן כמשתנה רציף (היארעות שנתית) והן כמשתנה בינארי. בנייתוח הבינארי נמצא סיכון מוגבר במשקים שיתופיים, אך ממצא זה נבע מכך שבממוצע אלו רפתות עם מספר פרות גדול יותר ולכן הממצא נעלם בנייתוח הרציף.

סוג המכון נמצא כקשור לנגיעות בחיידק. למרות שנראה היה כי במכון "קרוסלה" שיעורי הנגיעות גבוהים יותר, הבדל זה לא נמצא משמעותי בנייתוח רב-משתני. לעומת זאת, נמצא כי צורת חליבה "מקבילית" (parallel) קשורה לסיכון מופחת לנגיעות בהשוואה לכל סוגי המכונים האחרים. למיטב ידיעתנו ממצא זה לא תואר בעבר ולכן יש צורך באיסוף מידע ממדינות נוספות בטרם ניתן יהיה להמליץ על צורת מכון זו כאמצעי למניעת זיהומים תוך-עטיניים והדבקה.

ממצא מעניין הוא כי טיפול אנטיביוטי גורף, בתקופת ה"יובש" (BDT) היה קשור בשיעור נגיעות גבוה יותר בחיידק בהשוואה לטיפול "יובש סלקטיבי" (SDT). קשר זה בין טיפול אנטיביוטי נרחב לסיכון מוגבר מוכר היטב ברפואה ההומנית וייתכן כי הדבר נובע בשל פגיעה בכלל אוכלוסיית החיידקים עם השימוש הגורף בטיפול אנטיביוטי והעלאת הסיכון לזיהום בסופו של דבר. כמו כן יתכן מעצם הטיפול התוך-עטיני מעלה הסיכון לפגיעה באפיתל תעלת-מבוא הפטמה ובאופן משני לסיכון גבוה יותר לנגיעות תוך-עטינית חדשה; נושא שמצריך מחקר המשך, בפני עצמו.

איתור גורמי הסיכון המשקיים הוא חשוב אולם הממצא העיקרי של המחקר כי הנגיעות בחיידק מקורה בזן אחד, מחשיד כי העברתו בין הרפתות השונות הוא המנגנון העיקרי להתפשטותו בישראל. מומלץ לכן לחשוב על דרכים לשליטה ומניעה של התפשטות זו, המבוססת על מחקר המשך אפידמיולוגי.

מקורות:

- [1] Zecconi A. Staphylococcus aureus mastitis: What we need to know to control them. *Isr J Vet Med* 2010;65:93–9.
- [2] Christina Petersson-Wolfe, Isis K. Mullarky GMJ. Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control. *Virginia Coop Ext* 2010;404:7. doi:10.1007/s11250-012-0183-4.
- [3] Wassenberg MWM, Bootsma MCJ, Troelstra A, Kluytmans JAJW, Bonten MJM. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (ST398) in Dutch hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:316–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03260.x.
- [4] Boss R, Cosandey a, Luini M, Artursson K, Bardiau M, Breitenwieser F, et al. Bovine Staphylococcus aureus: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *J Dairy Sci* 2016;99:515–28. doi:10.3168/jds.2015-9589.
- [5] Kahila Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehricht R, Monecke S, Leitner G. Host-specificity of Staphylococcus aureus causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet Microbiol* 2015;176:143–54. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.007.
- [6] Fluit AC. Livestock-associated Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:735–44. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03846.x.
- [7] Boss R, Naskova J, Steiner a, Graber HU. Mastitis diagnostics: quantitative PCR for Staphylococcus aureus genotype B in bulk tank milk. *J Dairy Sci* 2011;94:128–37. doi:10.3168/jds.2010-3251.
- [8] Bouzinbi N, Brunel A-S, Shahbazkia HR, Bañuls A-L, Corne P, AL-Tam F. DNAGear- a free software for spa type identification in Staphylococcus aureus. *BMC Res Notes* 2012;5:642. doi:10.1186/1756-0500-5-642.
- [9] Davis R, Hossain MJ, Liles MR, Panizzi P. Complete Genome Sequence of Staphylococcus aureus Tager 104, a Sequence Type 49 Ancestor. *Genome Announc* 2013;1:1–2. doi:10.1128/genomea.00706-13.