

זריעת תרבות חיידקים ברפת (On Farm Culture) בחינה ראשונית של ההיתכנות והתאמה לרפת ישראלית



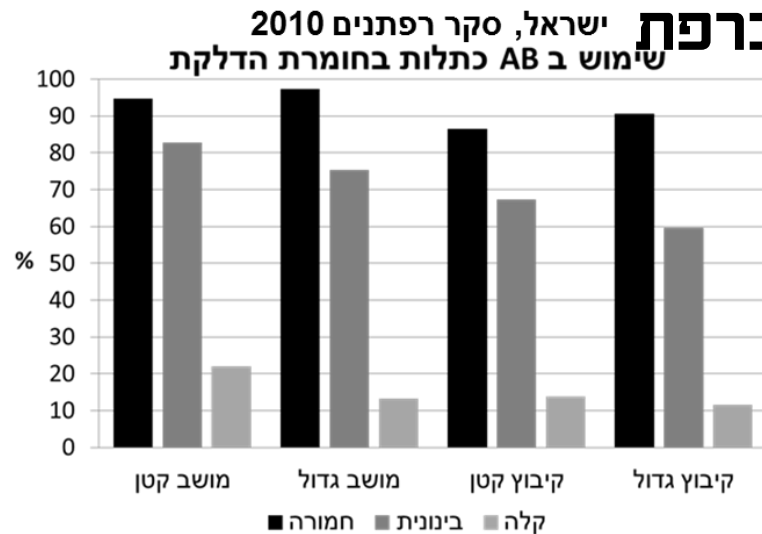
שני שיינין*^{1,2}, אריאל שלייכר³, שלומי לוי¹, אורי קורן^{1,2}, נחום שפיגל²

1. החקלאית

2. בית הספר לוטרניריה ע"ש קורט, האוניברסיטה העברית

3. רפת דנרון, מבוא חורון

טיפול בדלקת עטין קלינית



- הסיבה השכיחה ביותר לשימוש באנטיביוטיקה (AB) ברפת
- הימנעות משימוש מופרז ומיותר בתכשירים AB
- בריאות הציבור ודעת קהל
- אין הצדקה לטיפול ב AB בכל דלקת!
- אנו נדרשים לטיפול מתאים וסלקטיבי

– נגיעות תוך עטינית חיידקית קיימת

– החלמה ספונטנית

– קיים סיכוי סביר להחלמה

– יעילות טיפול מבוססת הוכחה מדעית (EBM)

- רצוי טיפול המבוסס על אבחון הפתוגן

- הטיפול ניתן בטרם התקבלה תשובה מהמעבדה

החלמה חיידיקית ספונטנית (Ruegg P.L., 2018)	דלקת עטין קלינית בבקר 2017, מאל"ה	חיידיק
80-95%	30%	א. קולי
44-66%	19%	סטפ. שאינו אוראוס
0-11%	3%	סטפ. אוראוס
28-30%	9%	סטפ. יוברים
	6.5%	סטפ. דיסגלקטיה
	3%	סטפ. אחר
75-85%	16%	ללא צמיחה
	3%	ט. פיוגנס
	10.5%	אחרים

On Farm Culture (OFC)



- יישום פשוט ומהיר ברפת לזיהוי פתוגנים בעת דלקת עטין

- כלי עזר להחלטה על שימוש AB בטיפול בדלקת עטין קלינית

- איננו מחליף את האבחון במעבדה!

- דגימת חלב סטרילית

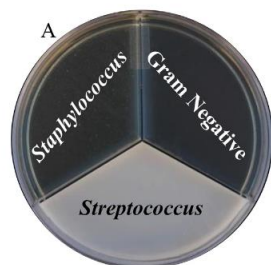
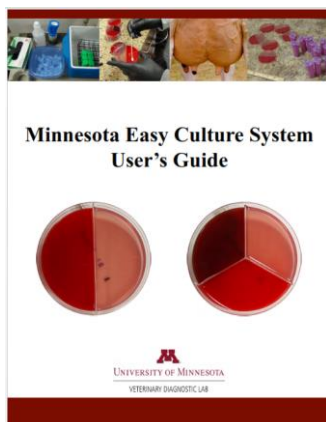
- טבילה של מטוש סטרילי בדגימת חלב

- מריחה על צלחת פטרי עם מצע סלקטיבי

- אינקובטור 37°C למשך 24 שעות

- פרשנות הממצאים בצלחת

- החלטה על טיפול בהתאם לממצאים



On Farm Culture (OFC)



יתרונות:

- פשוט
- מהיר
- לא יקר
- רמת דיוק טובה, עולה כאשר:
- קבוצות: חיובי/שלילי/ללא צמיחה/מזוהם
- זורע וקורא מיומן
- תנאי מעבדה

- בטיפול סלקטיבי המבוסס על אבחון הפתוגן
- הפחתה של כ-50% בשימוש AB
- ללא פגיעה ביעילות הטיפול (המתנה של יממה ללא השפעה שלילית)
- חסכון כלכלי: תרופות, שפיכת חלב, עבודה
- מגבלות:
- צלחות: חיי מדף קצרים, קירור
- חיידקים שאינם גדלים במצע
- אינקובטור: טמפ', לחות
- אדם מנוסה לזריעה וקריאת צלחות
- תיעוד מלא ומדויק
- לא מחליף משלוח דגימות למעבדה

Table 4
Sensitivity, specificity, positive predictive values, and negative predictive values of the Minnesota Easy Culture Bi-Plate System Bi-Plate and Tri-Plate in order to identify gram-positive bacterial growth in quarter secretion samples from clinical mastitis cases during lactation

Study	Culture System	Test Validation Location	Test Characteristics (%)		Predictive Values (%)	
			Se	Sp	PPV	NPV
Lago, ³⁸ 2011	Bi-Plate	On farm	78	83	74	86
Royster et al, ⁴⁰ 2014	Bi-Plate	In laboratory (Reader 1)	85	79	92	64
		In laboratory (Reader 2)	80	87	95	58
Royster et al, ⁴⁰ 2014	Tri-Plate	In laboratory (Reader 1)	86	76	91	66
		In laboratory (Reader 2)	80	93	97	62
McCarron et al, ³⁹ 2009	Bi-Plate	In laboratory	98	68	78	96
McCarron et al, ³⁹ 2009	Bi-Plate	In laboratory	77	78	68	85
Jones et al, ⁴¹ 2006	Tri-Plate	In laboratory	78	78	71	84

Abbreviations: NPV, negative predictive values; PPV, positive predictive values; Se, sensitivity; Sp,



מטרות המחקר

1. לבחון ולהעריך את יכולתה של שיטת האבחון OFC לזהות את הפתוגנים בעת דלקת עטין קלינית ברפת ישראלית.
2. לבחון את תרומתה של השיטה לצמצום השימוש באנטיביוטיקה ברפת.



רפת המחקר



- דנרון, מבוא חורון: שיתופית מאוחדת, כ- 600 חולבות
- ממוצע סת"ס בשיווק 180, היארעות ד.עטין גבוהה
- תיעוד איכותי של אבחנות וטיפולים בנ.ע.ה.
- משלוח רציף של דגימות חלב למעבדה, 50% גרם חיוב
- 2017 פרוטוקול טיפול מידי: AB IMM בכל דלקת קליני
- 2018 העמדת מערכת OFC ברפת דנרון, לראשונה בישראל

שולחן נקי
לזריעת צלחות

מקרר לאחסון
צלחות הזריעה

אינקובטור



OFC לראשונה בישראל



- אינקובטור (אם.אר.סי בע"מ)

- צלחות (מעבדות חי בע"מ)

- CNA Columbia + Blood / MacConkey Agar

- לימוד טכניקת זריעה במעבדה, ביה"ס לוטרינריה

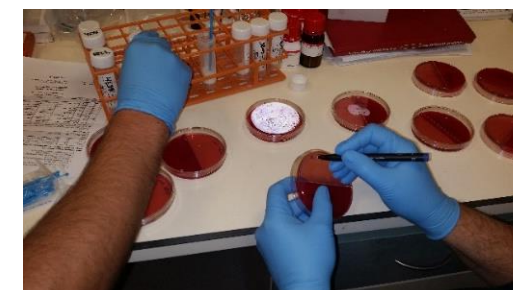
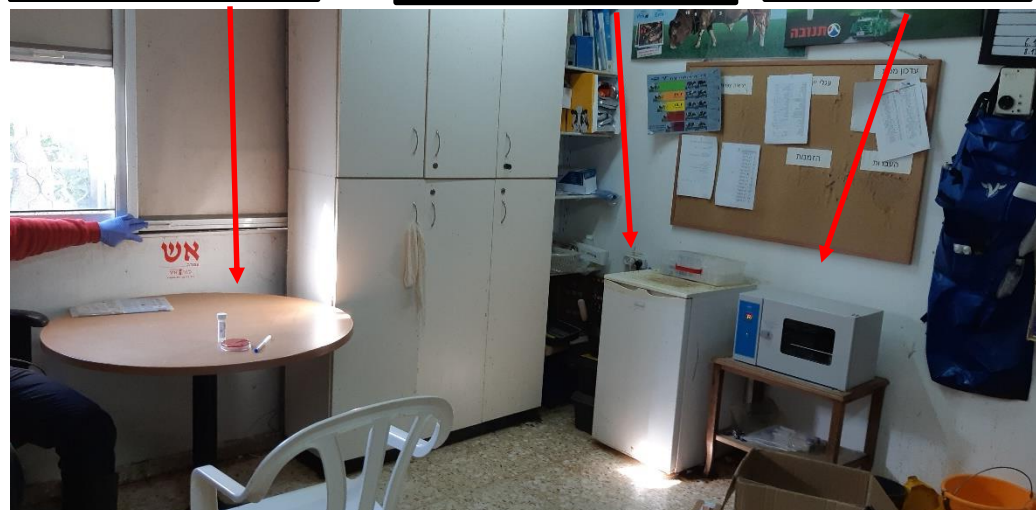
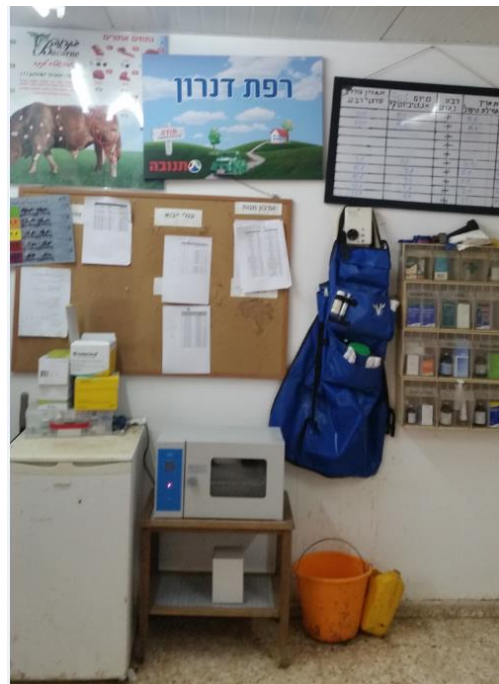
- ניסוי זריעה ברפת: ינואר-יולי 2018



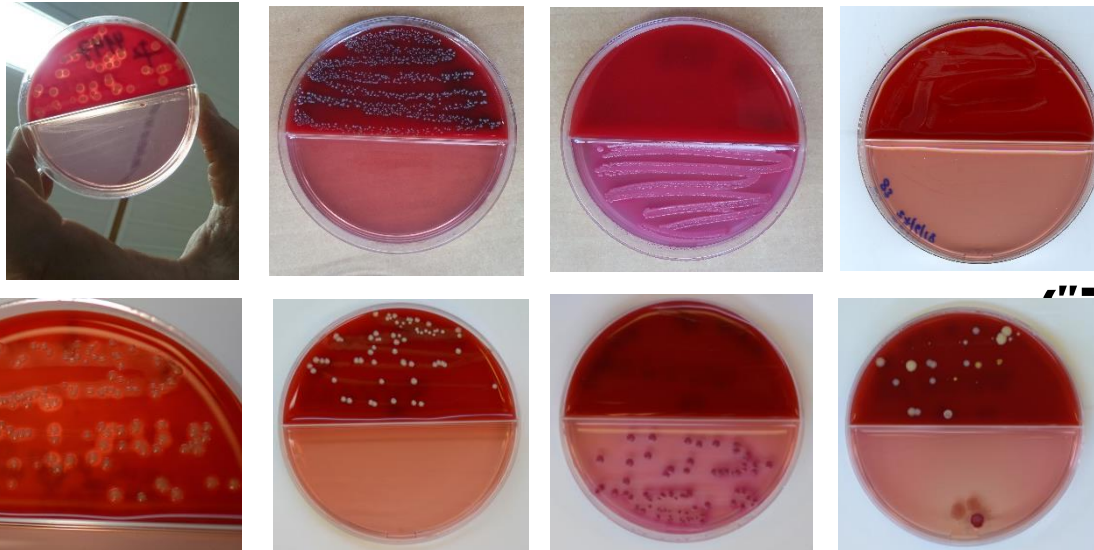
שולחן נקי
לזריעת צלחות

מקרר לאיחסון
צלחות הזריעה

אינקובטור



איסוף וניתוח הנתונים



- איסוף דגימות חלב על ידי החולבים
- שמירה בקירור/בהקפאה
- דגימה לזריעה ברפת ולמעבדה במקו
- אדם אחד זורע, מפרש ומתעד ("עיוור")
- תוצאה חיובית: $1 \geq$ מושבה
- זיהום: $2 >$ סוגי מושבות, הוצאו מהני
- מהמעבדה $n=2$, מהזריעה ברפת $n=3$

- ניתוח תוקף הבדיקה על פי 3 קבוצות: ללא צמיחה/ גרם שלילי/ גרם חיובי (+/-)

המדד	OFC	מעבדה
TP	צמיחה רק במצע +G	חיידק + G
	צמיחה רק במצע - G	חיידק - G
	צמיחה בשני המצעים G+ G-	חיידקים משני הסוגים - G + G
TN	אין צמיחה	אין צמיחה
FN	אין צמיחה	יש צמיחה כלשהיא (ללא מזוהם)
FP	יש צמיחה	אין צמיחה
	צמיחה שונה מממצאי המעבדה	צמיחה שונה מממצאי OFC

2018	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
ניסוי זריעה דגימות חלב (ד"ע) בצלחת פטרי על מצע סלקטיבי (גרם שלילי/חיובי) - הראשונים בארץ תוצאה זהה																
תאריך	מס' פרה	קב'	תח'	ימי חליבה	רבע גנוע	הערות חלב	מקור/קפוא	צמיחה במצע (+)	צמיחה במצע (-)	צמיחה ברפת	תוצאה מעבדה	הערות				
8.2.18	3296	4	8	59	א.ש		מקור			ללא צמיחה	קורנין בוביס	FN				
8.2.18	4040	4	5	509	א.י	גבן קל	מקור	V	V	קולי + משהו בגרם חיובי	א. קולי קורנין בוביס	TP				
12.2.18	4125	4	5	13	א.י		מקור			אין צמיחה	א. קולי	FN				
13.2.18	5289	1	1	5	א.ש	גבן קל	מקור	V		א. קולי	א. קולי	TP				
13.2.18	3913	4	6	333	א.י	גבן קל	מקור		V	מיקרוקוקים	מיקרוקוקים	TP				
13.2.18	4956	2	2	92	ק.ש		מקור			ללא צמיחה	קורנין בוביס					
19.2.18	4252	4	4	69	א.י		קפוא	V		דיסגליא	דיסגליא					



התפלגות הבידודים מדגימות

המחקר:



ממצא בקטריולוגי במעבדה ¹	שם הפתוגן בלטינית	מספר (n)	המצאות (%)
א.קולי	Escherichia coli	37	38.9%
קוליפורמים	Coliforms	1	1%
קלבסיאלה	Klebsiella spp	1	1%
אנטרובקטר	Enterobacter	1	1%
פרוטאוס וולגריס	Proteus vulgaris	1	1%
סטרפ. דיסגלקטיה	Streptococcus disagalactiae	10	10.5%
סטרפ. יובריס	Streptococcus uberis	4	4.2%
סטרפטוקוקים אחרים	Streptococcus spp	1	1%
אנטרוקוקוס	Enterococcus	3	3.2%
סטאפ. אוראוס	Staphylococcus aureus	5	5.3%
סטפילוקוק שאינו אוראוס	Coagulas negative staphylococci (CNS)	8	8.4%
קורינה. בוביס *	Corynebacterium bovis	7	7.4%
אין צמיחה/פתוגנים	No growth/pathogens	16	16.8%
סה"כ ארועי דלקת עטין שהשתתפו במחקר			
קבוצות החיידקים להשוואה במחקר	חיידקים גרם שליליים (G-)	41	43%
	חיידקים גרם חיוביים (G+)	38	40%
	ללא ממצא בקטריולוגי	16	17%

¹ תוצאות שהתקבלו ממעבדת מאל"ה לבריאות העטין ואיכות החלב



מדדים להערכת תוקף הבדיקה

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + \text{FN}}$$

$$\text{PPV} = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$\text{NPV} = \frac{TN}{TN + \text{FN}}$$

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{\text{Total}}$$

		Gold Standard	
		+	-
On Farm Culture	+	TP	FP
	-	FN	TN

- True Positive (TP)
- True Negative (TN)
- False Positive (FP)
- False Negative (FN)

"פיספוס": אקולי (n=7, 20%), קבובים (n=8, 100%), סטפ. שאינו אוראוס (n=3, 37%)

סטרפים (n=3, 20%)

גרם חיוביים	גרם שליליים	כלל הצלחות	תוקף הזריעה ברפת (OFC) ביחס לתוצאות המעבדה
66%	74%	70%	רגישות (Sensitivity)
		89%	סגוליות (Specificity)
100%	94%	96%	ערך מנבא חיובי (Positive Predictive Value)
		41%	ערך מנבא שלילי (Negative Predictive Value)
66%	71%	74%	דיוק (Accuracy)

כלל הצלחות במחקר

		Gold Standard		
		+	-	
On Farm Culture	+	54	2	56
	-	23	16	39
		77	18	95



תרומת OFC לצמצום שימוש AB:

• נתונים מנעה:

• שימוש בתרופות AB

1. פרות המחקר:

46% (n=44) מהפרות טופלו ב AB בתקופת המחקר

2. כלל הפרות ברפת:

טיפול AB בפרות עם דלקת עטין לפי

• סיבת משלוח דגימות למעבדה כתיעוד לדלקת עטין

– ספירה גבוהה, קליניים, מוליכות גבוהה, ירידה בתנובה, אהמל

בקטריולוגיה: "מקרים קליניים" / "עלייה במוליכות"			
ינואר-יולי 2018		ינואר-יולי 2017	
N	(%)	N	(%)
79	(27)	76	(26)
4		1	
2		1	
5		6	
90	(31)	84	(29)
13	(4.5)	2	(0.7)
34	(12)	63	(22)
15	(5)	12	(4)
25	(9)	39	(13)
6	(2)	4	(1)
10	(3)	1	
24	(8)	27	(9)
9		7	
136	(47)	155	(53)
226		239	
27		29	
37	(13)	22	(8)
290		290	
8		12	
46		28	
344		330	

מדדים להשוואה	תקופת המחקר 01-07/2018	תקופה מקבילה 01-07/2017	הפחתה בשימוש AB
מספר דלקות עטין קליניות	344	330	
התפלגות הפתוגנים	דומה	דומה	
מספר טיפולים AB בדלקת עטין	82	158	48%



אז מה למדנו?

- OFC במחקר זה נמצאה כשיטה בעלת יכולת טובה לזיהוי מהיר ואמין של קבוצות פתוגנים מדלקות עטין קליניות
- שיטת עבודה המשלבת זיהוי ראשוני ומהיר של הפתוגן ברפת יחד עם אבחון מעבדתי נלווה, תרמה לקבלת החלטת טיפול מושכלת
- עקב כך לצמצום משמעותי ואחראי בשימוש באנטיביוטיקה ברפת
- מבלי לפגוע בבריאות העטין ואיכות החלב
- אבל...



צינון ההתלהבות והמשך המחקר



- רפת אחת, יחידה, ראשונה...
- למי זה מתאים?
- רפת גדולה, היארעות שמצדיקה את ההשקעה וההשקעה ראשונית: אינקובטור 2,400 ₪
- חומר מתכלה: צלחת 4.5 ₪, מטוש סטירלי 1.3 ₪
- תיעוד איכותי והקלדת אבחנות וטיפולים בכל דלק
- משלוח דגימות למעבדה על בסיס קבוע
- החלטה לפעול לקידום בריאות העטין ואיכות החלב ברפת
- הרחבת הניסוי והמשך בחינת השיטה ברפתות נוספות



תודות:



- טל קמיאל, מנהל רפת דנרון
- אריאל שלייכר, אחראי הבריאות
- פרופ' נחום שפיגל
- ד"ר שלומי לוי
- ד"ר ליאור עופר
- החקלאית

תודה על ההקשבה