

## SLUTRAPPORT

GUDP-projekt 2019-2021

# MMPD

Mastitis Milking Parlour Diagnostic



3. FEBRUAR 2021

Af Bettina Nonnemann

Danmarks Tekniske Universitet, Center for Diagnostik

---

# Grønt Udviklings- og Demonstrationsprogram

Projektet, som er beskrevet i denne rapport, er støttet af Grønt Udviklings- og Demonstrationsprogram, GUDP, som er en erhvervsstøtteordning under Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri.

GUDP giver tilskud til projekter, der understøtter grøn og bæredygtig omstilling af fødevarerhvervet, og programmet dækker hele værdikæden fra primærproduktion til forarbejdningsindustri og afsætningsled.

Det er GUDP's ministerudpegede bestyrelse, som beslutter, hvilke projekter der skal modtage tilskud. Bestyrelsen betjenes af GUDP-sekretariatet i Landbrugsstyrelsen.

## **GUDP-sekretariatet i Landbrugsstyrelsen**

Nyrupsgade 30, 1780 København V

Augustenborg Slot 3, 6440 Augustenborg | Tlf.+45 33 95 80 00

**Mail:** [gudp@lbst.dk](mailto:gudp@lbst.dk)

**Web:** [www.gudp.dk](http://www.gudp.dk)

*Denne slutrapport er godkendt af GUDP, men det er alene rapportens forfatter/projektlederen, som er ansvarlige for indholdet. Rapporten må citeres med kildeangivelse.*

---

## SLUTRAPPORT

### MMPD

#### Mastitis Milking Parlour Diagnostic

#### FAKTA OM PROJEKTET

---

Projektperiode:

01-01-2019-30-06-2021

Projektdeltagere:

Center for Diagnostik, DTU Sundhedsteknologi, DTU Bioengineering, DTU Compute og SEGES

Bevilling fra GUDP:

8.669.871 kr.

Projektleder:

Bettina Nonnemann

#### FORMÅL

---

Formålet med Mastitis Milking Parlour Diagnostics (MMPD) projektet var at udvikle en hurtigtest baseret på den allernyeste viden inden for mastitis-forskning. Konceptet var at landmanden/dyrlægen kunne få svar på, hvilken bakterie der forårsagede yverbetændelsen inden for max. 20 minutter for at kunne igangsætte korrekt behandling af koen. Dette ville være en klar forbedring i forhold til nuværende diagnostikmetoder, som kan tage op til flere dage fra udtagelse af prøve til resultat.

#### PROJEKTETS RELEVANS

---

Et af de største velfærdsmæssige problemer hos malkekøer er yverbetændelse, også kaldet mastitis. Kombinationen af koens velfærd og besætningens økonomi afhænger af muligheden for at diagnosticere og behandle evt. mastitis-infektioner hurtigt. Diagnostik er i dag langsom og dyr, da evt. bakterier i mælken skal dyrkes i 12-18 timer i et laboratorium. Når bakterier vokser under optimale forhold har for eksempel *Escherichia coli* en fordoblingstid på kun 20 minutter. For at forhindre at koens tilstand forværres yderligere efter at mælkeprøven er udtaget sættes koen i behandling med penicillin inden resultatet foreligger. Det vil sige at koen bliver behandlet med antibiotika "i blinde" indtil et resultat foreligger.

Projektet MMPD er ikke lykkedes med at færdigudvikle en prototype med en hurtig test med svar inden for kun 20 minutter efter at mælkeprøven er udtaget, men der er udviklet en aflæsningsdevice til en evt. fremtidig papirbaseret sensor og en database til registrering af resultater. MMPD-systemet består af en sensor til engangsbrug og en smartphone app/device. Testen ville have fungeret ved at

dryppe en mælkeprøve på sensoren og analysere denne i et lateralt flow assay, som kendes fra graviditetstest. Ved tilstedeværelsen af en eller flere sygdomsfremkaldende bakterier ville en gruppe af linjer, som er specifikke for bakterien eller bakterierne, blive aktiveret. Intensiteten af linjerne skulle indikere koncentrationen af bakterien. Ved hjælp af en app og en aflæsningsdevice kunne resultatet digitaliseres og analyseres sammen med koens data fra en database mht. koens ydelse, alder og tidligere mastitis-infektioner samt de nationale behandlingsvejledninger. Den opsamlede datamængde ville give ny viden om behandlingseffekt og kunne på sigt føre til nye behandlingsanbefalinger for køer med mastitis.

## HOVEDRESULTATER

Vi har udviklet et test-scenarie for en diagnostik-løsning som fokuserer på hurtigt svar, let anvendelse for landmanden og som byder på en simpel integration med malkestalden.

Vores test-scenarie skulle udvikles som et proof of concept (POC) device der skulle være en håndholdt hurtigtest for yverbetændelsesbakterier. Den skulle baseres på en papir-chip, hvorfra bakterier i mælken skulle detekteres vha. antistoffer hvorefter resultatet skulle aflæses i et elektronisk aflæsningsdevice, hvorfra data kunne overføres til en mobil enhed via app eller direkte til en PC.

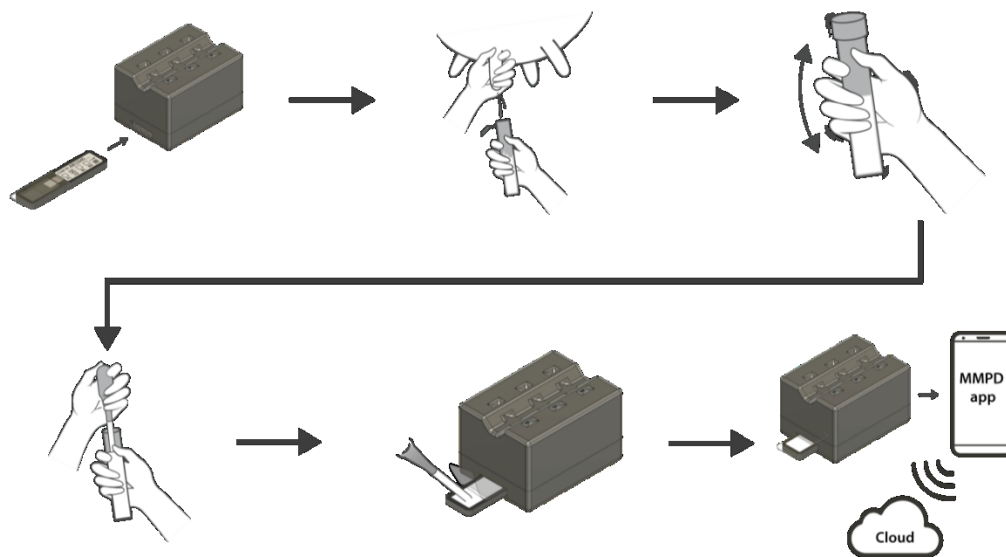


Fig. 1 Trin1: Mælk malkes ud fra koen til et rør. Trin 2 Mælken blandes og klumper homogeniseres. Trin 3 Op til 3 mL mælk udtages fra røret. Trin 4 Mælk dryppes ned på MMPD-chippen. Trin 5 Chippen indsættes i aflæsningsdevice og aflæses hvorefter data sendes til MMPD app.

Prototypen af den fysiske kassette (aflæsningsdevicet) er ud over design og udvikling af selve interfacet til papirchippet, blevet testet og optimeret for flow med papirchip systemet. Efter udviklingen af aflæsningsdevicet, er der blevet programmeret en omfattende UI applikation til IOS-baseret smartphones og tablets som ikke blot kan styre aflæsningsdevicet, men som også kan lagre, administrere og behandle den indsamlede data. I forbindelse med opbygningen af UI applikationen, er nye softwarekomponenter blevet udviklet og føjet til aflæsningsdevicet. Disse software implementeringer gør app'en mere robust, simplificerer indledende forbindelse og datakommunikation mellem app'en og devicet, datalagring og øger brugeroplevelsen af prototypen betydeligt. For at kunne opbevare data fra prøver sikkert og samtidigt gøre data tilgængelig for integration med SEGES kvægdatabase, er der blevet udviklet en web-baseret database. Denne database indeholder mælkeprøve-resultater komplet

---

til krypterede bruger data mm. som indsamles via aflæsningsdevicet og app'en. Indsamlet data transmitteres til databasen gennem app'en. Afprøvning af systemet blev udført i samarbejde med SEGES for at teste brugbarhed og brugervenlighed af den diagnostiske MMPD procedure på en mælkefarm. Under afprøvningen blev papirmembranen påført et tusch-prik som indikerede assay med antistoffer. Hver mælkeprøve fra de udpegede køer blev udsat for en homogeniseringsproces (PBS + plasmin + lipase) til opløsning af klumper i mælken, hvilket betyder at mælkeprøven får konsistens som skummetmælk og dermed frit kunne diffundere gennem papirmembranen opnås samt sikre at prøvesvaret kan foreligge inden for 20 minutter.

Løsningen viste sig at fungere succesfuldt hen over flere testkørsler i malkestalden, og demonstrerede funktionalitet selv i tilfælde hvor internetforbindelsen ikke var tilgængelig. Under projektforsøget blev kommercielle antistoffer rettet mod *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* testet. Det viste sig efter grundig afprøvning at antistofferne krydsreagerede med harmløse bakterier, som også kan være at finde i ikke-pasteuriseret mælk og derved give et falsk positivt resultat, hvilket medfører risiko for fejlbehandling af koen. Idet der ved projektstart ikke længere var kommercielle antistoffer rettet mod *Streptococcus uberis* søgte vi at få produceret polyklonale antistoffer hos Cusabio i Kina rettet mod SUAM-proteinet, som tidligere beskrevet i artikel omhandlende en diagnostisk test for *S. uberis*. Derudover blev det besluttet at indlede samarbejde med Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) i Belgien til udvikling af bakterie-specifikke nanobodies, som i teorien skulle være meget specifikke og robuste. Efter immunisering af lamaer med de tre bakterier, som vi forinden havde Co-60 bestrålet på Risø for at inaktivere dem, blev der genereret et phage display bibliotek. På trods af adskillige forsøg med selektion og screening af dette bibliotek for binding til *S. uberis*, var det ikke muligt at identificere nanobody kloner med specifik binding til *S. uberis*. Derfor blev det besluttet ikke at gå videre med selektion af nanobody kloner for binding til de øvrige bakterier.

Med hensyn til membranen var der flere krav til papirchippet, bl.a. at den skulle kunne håndtere 3 mL mælk for at sikre en god sensitivitet. Efter omfattende forsøg med adskillige papirtyper fandt vi to kandidater, Fusion 5 og Prima40. Fordelen med Fusion 5 var at den kunne suge mere end 3 ml mælk, dog var den svær at funktionalisere (sætte antistofferne fast i papiret), og signalet var for svagt, da membranen var for tyk. Prima40 kunne ikke absorbere mere end 1 ml mælk, men var meget nemmere at funktionalisere og signalerne var langt bedre. En protokol til at opkoncentrere proteiner i mælk blev udviklet ved at bruge skummetmælk og vi testede målemetoden med to antistoffer mod MecA, en protein der findes på MRSA bakterien, og mod SARS-CoV-2 som var immobiliseret på den samme membran. Det vil formodentligt også være muligt at opkoncentrere bakterier med denne metode. Det eksperiment bekræftede at det er muligt, hvis man har de rigtige antistoffer, at måle på flere end én bakterie ad gangen. Vi lykkedes også med at måle på *E. coli* i buffer, selvom sensitiviteten var lav.

## PROJEKTFORLØB OG ERFARINGER

---

Under projektforsøget tilegnede vi os ny viden fra parallelle projekter og vi blev opmærksomme på, at der er flere bakterier som kan forårsage mastitis end først antaget i den nationale og internationale litteratur. Kombinationen af dette og erfaringer med utilstrækkelig kvalitet af mange af de kommercielle antistoffer førte til enighed om at ændre projektet fra et produkt baseret på forældet viden til en

---

prototype baseret på seneste og nyeste viden inden for mastitis-forskning. I perioden hvor projektsøgningen blev indsendt og tilsagn givet, var der kommercielle specifikke antistoffer tilgængelige. Ved projektets start var antistoffer rettet mod *S. uberis* imidlertid ikke længere tilgængelige. Derfor fik vi produceret antistoffer rettet mod overflade-protein på *S. uberis* som tidligere var beskrevet i litteraturen som et antigen-target til diagnostisk test. Desuden indledte vi et samarbejde med VIB i Belgien vedr. selektion for specifikke antistoffer – de såkaldte nanobodies – i en lama mod de tre mastitis-fremkaldende bakterier. Sidstnævnte lykkedes desværre ikke, og det viste sig heller ikke muligt at anvende de kommercielle antistoffer samt de polyklonale antistoffer mod *S. uberis*, idet antistofferne krydsreagerede med harmløse bakterier som også kan være at finde i mælk og der derved opnås falsk positive svar som kan resultere i unødvendig antibiotikabehandling.

Det viste sig også at være problematisk at få klumpet mastitis-mælk gennem membranen, og problemet blev desværre ikke løst i projektet. Indledende lateral flow assays med bakterier (*E. coli* og *S. aureus*) viste en lav sensitivitet, men foreløbige resultater viste dog at en nanobeads-metode evt. kan bruges til opkoncentrering af proteiner og formodentlig også bakterier, således at en højere sensitivitet af assayet kan opnås.

Derudover lykkedes det at producere og validere et aflæsningsdevice med kontakt til en kvægdatabase.

Projektet blev udfordret da hovedansøger gik ud af projektet grundet lukning af Dianova i slutningen af 2019, Covid-19-situationen, barselsorlov og som følge deraf ny hovedansvarlig og flere projektledere. Projektledersituation blev håndteret ved at der blev udvist ekstra stor samarbejdsvilje og velvilje fra alle arbejdsparkeledere og samarbejdspartnere m.h.t. til sparring og information af projekthistorik.

## KONKLUSION OG PERSPEKTIVERING

---

Modellen for hurtigtesten kræver mere arbejde med hensyn til at identificere antistoffer, som er specifikke for sygdomsfremkaldende bakterier og en videre afprøvning af membranflowet i de tilfælde, hvor mastitis-mælken klumper. Denne "klumpning" ses jævnligt ved akut mastitis. Derudover skal papirchippens foreslåede design, dvs. den foreslåede papirmembran i kombination med opkoncentrering af bakterier vha. nanobeads valideres og optimeres. Hvis disse udfordringer bliver løst vil vores model være fremtidssikret og forberedt til at kunne inkludere flere andre yverbetændelses-scenarier – akut, kronisk mv.

Dermed vil modellen kunne have en fremtidssikret tilgang med forbedrede muligheder for løbende tilpasning af chippen, så den hele tiden er opdateret i forhold til den nyeste viden. Dette er især en fordel fordi vi gennem parallelle projekter har fået ny viden om hvilke bakterier der forårsager mastitis. Nye studier indikerer nemlig, at der er langt flere bakterier som kan forårsage mastitis end tidligere antaget både nationalt og internationalt. Ydermere vil det ikke være nødvendigt at lave omkostnings-tunge test (starte helt forfra) hvis behovet om at ændre chippen til at inkludere helt andre bakterier skulle opstå. Et kendt problem med tilgængelige tests er, at de normalt kun kan identificere én bakterieart ad gangen. Dette er et problem for de dyr som har yverbetændelse med to årsagsgivende bakterier, hvor der er risiko for at kun den ene bakterieart bliver behandlet og yverbetændelsen består

---

grundet den tilbageværende bakterieart. Det vil sige at der er udsigt til at køer med en såkaldt kombineret mastitis kan komme hurtigt i relevant antibiotikabehandling og dermed undgå fejlbehandling. Det vil ligeledes være muligt at modne hurtigtesten til internationale markeder hvilket vil indebære at IT-modellen skal akkommoderes til andre databaser, andre dataopsæt og eventuel anden dataloggivning for sygdomsfremkaldende bakterier.

#### FORMIDLING

---

Hjemmeside: <https://quicktestmaelk.dtu.dk/>

Genial test til yverbetændelse er på vej: [https://www.landbrugsinfo.dk/-/media/landbrugsinfo/public/6/1/6/kvaegnyt\\_nr8\\_web.pdf](https://www.landbrugsinfo.dk/-/media/landbrugsinfo/public/6/1/6/kvaegnyt_nr8_web.pdf)

Yverbetændelse er nøglen i innovationsvirksomheds næste væksthåb. <https://agriwatch.dk/Nyheder/Industrien/article11646603.ece>

Ny mastitis-test kan reducere forbruget af antibiotika [https://www.maskinbladet.dk/artikel/105520\\_ny-mastitis-test-kan-reducere-forbruget-af-antibiotika](https://www.maskinbladet.dk/artikel/105520_ny-mastitis-test-kan-reducere-forbruget-af-antibiotika)

Lynhurtig test for yverbetændelse er på vej

<https://landbrugsavisen.dk/kv%C3%A6g/lynhurtig-test-yverbet%C3%A6ndelse-er-p%C3%A5-vej>

Læs mere om GUDP's projekter på [www.gudp.dk](http://www.gudp.dk)

