

- A. **Omfattning**-Syftet med följande test var att avgöra huruvida produkten, EasyDECON™ (EFT DF 200), kunde neutralisera den antigena delen av två specifika mögelsvampar, *Aspergillus fumigatus* och *Alternaria alternata*, för antigenerna *Asp fl* och *Alt a1*.
- B. **Referensdokument**-Det finns inga specifika standarder för denna typ av analys, såvitt vi har kunnat utröna.
- C. **Terminologi**-
- Antigen - En kemikalie eller kemisk förening som framkallar en allergisk reaktion hos en mottaglig individ. En kemikalie eller kemisk förening som reagerar med en monoklonal eller polyklonal antikropp som har utvecklats specifikt för identifiering av kemikalien eller den kemiska föreningen.
 - q.s.-Förkortning för "Quantum Sufficit" ("tillräcklig mängd"). Den process som innebär att ett löst ämne eller en reagens tillsätts för att uppnå den önskade slutliga volymen.
- D. **Signifikans och användning**- Mögelsvamparna odlades under kontrollerade förhållanden varpå sporer skördades och behandlades med produkten enligt tillverkarens instruktioner. De resulterande materialen testades sedan för att fastställa huruvida antigenerna, *Asp fl* och *Alt a1*, förekom i provet. Kontrollprover behandlades parallellt med testproverna för att säkerställa att organismernas antigena egenskaper inte hade påverkats av andra förfaranden under testningen.
- Om testprodukten fungerar enligt tillverkarens förväntningar ska det inte förekomma några detekterbara allergener för någon av svamparna i testlösningarna.
- Proverna måste neutraliseras i tillräcklig utsträckning efter exponering för produkten för att avbryta all aktivitet från produkten, samt före allergenanalysen för att motverka interferens mellan produkten och allergenanalysen. Allergendata rapporteras som antalet mikrogram av allergenen per milliliter spörlösning. Spörlösningen kvantifierades och data rapporteras i kolonibildande enheter (CFU) per milliliter spörlösning.
- E. **Reagenser och material**-
- Tillväxtmedium för sporer**-Maltextraktagar (MEA) med 0,1 % kloramfenikol, Health Link-katalognr 1085
 - Fosfatbuffrad saltlösning (PBS) pH 7,4-10X** lösning, Fisher Chemicals-katalognr BP399-1
 - Alternaria alternata (TX 8025)**-Remel-katalognr 4601016
 - Aspergillus fumigatus (KM 8001)**-Remel-katalognr 4601018
 - Lazy-L-spridare**-Hardy-katalognr SPR-L-S10
 - 50 ml sterilt, icke-pyrogen polypropylencentrifugrör med förseglingsplugg**-Biologix-katalognr BCT-P15RS-370
 - 15 ml sterilt, icke-pyrogen polypropylencentrifugrör med förseglingsplugg**-Biologix-katalognr BCT-P50RS-370



ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY LABORATORY, INC.

866.888.6653 • www.emlab.com • info@emlab.com

- h. **Alt a1 ELISA-kit (121/121)-Indoor Biotechnologies**
- i. **Asp f1 ELISA-kit-Indoor Biotechnologies**

NORTHERN CALIFORNIA LABORATORY
1150 Bayhill Drive, Suite 100 San Bruno, CA 94066, USA
650.829.5800 • Fax 650.829.5852 •
EMLAP# 102856



SOUTHERN CALIFORNIA LABORATORY
5473 Kearny Villa Road, Suite 130 San
Diego, CA 92123, USA
858.569.5800 • Fax. 858.569.5806 •
EMLAP# 60266

F. Förfaranden-**a. Sporuppsamling:**

- i. *Alternaria alternata* (TX 8025)-Remel-katalognr 4601016 och *Aspergillus fumigatus* (KM 8001)-Remel-katalognr 4601018 inokulerades på MEA.
- ii. Efter 7-10 dagars inkubering vid 23 °C ±3° valdes odlingsplattor med god tillväxt av *Alternaria alternata* och *Aspergillus fumigatus* ut för att skörda sporer.
- iii. 5 ml steril PBS (partinr 032904-PBS-D1) tillsattes till varje odlingsplatta.
- iv. De odlade sporererna skördades med hjälp av sterila Lazy-L-spridare (partinr 3301 från Hardy) som varsamt gneds mot kolonins ovansida för att lossa sporererna.
- v. Sporblandningen samlades upp i sterila 50 ml Falcon-provrör.
- vi. Varje lösning späddes efter behov (q.s.) med steril PBS till 35 ml.
- vii. Spörlösningen virvlades för att lösa upp sporansamlingar.
- viii. 1 ml spörlösning överfördes till 0,9 ml spädningsrör med 0,1 % Tween (partinr 032404-10T-A) inför utplacering. Proverna späddes seriellt från 10⁻⁷ till 10⁻¹⁵ per ml.
- ix. Spädningarna placerades ut på MEA-plattor (partinr 0405852) för att fastställa mängden sporer i lösningen.

G. Spörlösningen virvlades och 5 ml av lösningen överfördes till 15 ml centrifugrör.

- a. För såväl *Alternaria alternata* som *Aspergillus fumigatus* delades lösningen upp i sex lika stora delar. Tre delar med varje organism användes för kontroll, och tre delar med varje organism användes för testningen.

H. Proverna centrifugerades i 5 minuter och supernatant vätska kasserades.**I. Beredning av EasyDECON™-testlösningen. Lösningen bereddes enligt tillverkarens instruktioner.****a. Till 100 ml EasyDECON™ för användning i testet:**

- i. 49 gram Penetrator tillsattes i en tarerad steril 200 ml bägare.
- ii. 49 gram Fortifier tillsattes i en tarerad steril 200 ml bägare.
- iii. 2 gram Booster tillsattes i en tarerad steril 200 ml bägare.
- iv. 49 gram Penetrator tillsattes till 49 gram Fortifier, och detta blandades noggrant i en minut innan 2 gram Booster tillsattes för att uppnå den slutliga vikten på 100 gram.

J. Testningsförfarande

- a. 1 ml EasyDECON™ tillsattes till tre rör med *Alternaria alternata* samt tre rör med *Aspergillus fumigatus*.
- b. 1 ml sterilt vatten tillsattes till de tre rör med *Alternaria alternata* samt de tre rör med *Aspergillus fumigatus* som fungerade som kontrollprover.



- c. Proverna inkuberades i 1 timme vid rumstemperatur.
- d. Efter inkuberingsperioden centrifugerades proverna och supernatant vätska kasserades.
- e. Proverna tvättades med 2 ml sterilt vatten och centrifugerades. Efter centrifugeringsprocessen kasserades supernatant vätska.
- f. Tvättning och centrifugering upprepades två gånger för att avlägsna eventuella produktrester.

K. Testning för allergener:

- a. 300 µl buffertlösning för extraktion tillsattes i varje rör med *Aspergillus*, och 1 ml buffertlösning för extraktion tillsattes i varje rör med *Alternaria*. Proverna inkuberades i 2 timmar på en roterande blandare (LabQuake från Barnstead/ThermoLyne)
- b. Proverna centrifugerades i fem minuter, supernatant vätska samlades upp och pellets kasserades.

L. EMLab-standardprotokollet användes för att utföra ELISA-analysen.

M. **Kvalitetssäkring/kvalitetskontroll-** Tre kontrollprover behandlades för varje prov. Kontrollproverna genomgick exakt samma förfaranden med undantag för exponeringen för produkten. Alla temperaturvärden och inkuberingstider noterades i en laboratorieloggbok tillsammans med all övrig specifik information om testningsförfarandet.

N. Resultat

Följande sporkoncentrationer användes för testerna:

Alternaria alternata – 5 ml x (3,2 x 10⁸ CFU/ml)=1,6 x 10⁹ sporer per test

Aspergillus fumigatus – 5 ml x (2,2 x 10⁹ CFU/ml)=1,1 x 10¹⁰ sporer per test

Följande genomsnittliga koncentrationer av allergener konstaterades:

Test Alt a 1 = < 0,8 µg/ml

Test Asp f 1 = < 0,8 µg/ml

Kontroll Alt a 1 = 32,15 µg/ml

KontrollAsp f 1 = 19,23 µg/ml

0,8 µg/ml är detektionsgränsen för dessa allergenanalyser. Därmed detekterades inga Alt a 1- och Asp f 1-allergener i testproverna med EMLab ELISA-metoden.

