БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

1 ЗАГЛАВНА СТРАНИЦА

Изпълнител	**Възложител**
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска Академия на Науките ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26 1113 София, България	Перилис Трейдинг ЕООД Офис Варна Община Аксаково, с. Кичево Селскостопанска кооперация ЗОРА

Оценка на ефикасността на препарат BED Pro-biotic върху наличието на алергени DERP1 в домашен прах

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

2 Съдържание

1 Заглавна страница 1
2 Съдържание 2
3 Обобщение 3
4 Списък на съкращенията и определения на термини 3
5 Изследователи и административна структура на изследването 3
5.1 Изследователи 3
5.2 Административна структура на изследването 4
6 Въведение 4
7 Цели на изследването и оценявани параметри 5
7.1 Цели 5
7.2 Оценявани параметри 5
8 План на изследването 6
8.1 Описание на тест пробите 6
8.2 Дизайн на изследването и методи 7
8.3 Провеждане на изследването 8
8.3.1 Приложение на тест пробата и събуране на домашен прах 8
8.3.2 Екстракция на DERP1 8
8.3.3 DERP1 специфичен ELISA тест 8
8.3.4 Отчитане на резултатите 8
8.4 Оценка на резултатите 8
9 Резултати 9
9.1 Графично представяне на количеството DERP1 в домашен преах педи и след прилагане на BED Pro-biotic 9
9.2 Стандартна права за изчисление на количеството на DERP1 [U/mL] 10
9.3 Статистически анализ 11
10 Заключение 14
11 Библиография 15
12 Приложения 16
12.1 Приложение 1: лабораторно оборудване, консумативи, среди и реагенти. 16
12.2 Приложение 2: Абсорбция – сурови данни 17

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

3 Обобщение

Пробиотичният продукт на Перилис Трейдинг ЕООД BED Pro-biotic, van der Schoot technology – пробиотичен неутрализатор на акари и алергени в домашен прахбеше изследван за инхибторен ефект върху наличието на акари от вида *Dermatophagoides pteronyssinus* в домашен прах. Тестът беше проведен в десет помещения, две лаборатории и ошем домакинства, като в настоящия отчет е описана представителна извадка от 5 домакинства – останалите резултати са подобни, без сигнификантни разлики спрямо представените. DERP1 е основният алерген на домашните акари от вида *Dermatophagoides pteronyssinus*, които рутинно се откриват в домашен прах. Тестът за наличие на алергена DERP1 в мониторираните помещения беше проведен след прилагане на продукта в продължение на един месец. Продуктът беше прилаган съгласно указанията на производителя. Проби бяха събирани преди прилагане на продукта и двукратно след в края на втората и на четвъртата седмица от началото на прилагането. Екстракцията на антигена беше проведена съгласно публикувани протоколи в научната литература, а антигенът беше детектиран със специфичен имунен тест тип ELISA за DERP1 антигена.

Полученият резултат показа, че продуктът ефективно намалява и елиминира наличието на акари от вида *Dermatophagoides pteronyssinus*, по-често срещани в Европа. Количествените данни от анализа са налични в приложения подробен научен отчет. този отчет се отнася само до тествания продукт и данните не може да се екстраполират към други продукти на Перилис Трейдинг ЕООД.

4 Списък на съкращенията и определения на термини

Тест проба: продукт за тестване

DERP1: алерген, идентифициран в *Dermatophagoides pteronyssinus*

ELISA: ензимен имунен тест

PBS: фосфатен буфер

5 Изследователи и административна структура на изследването

5.1 Изследователи

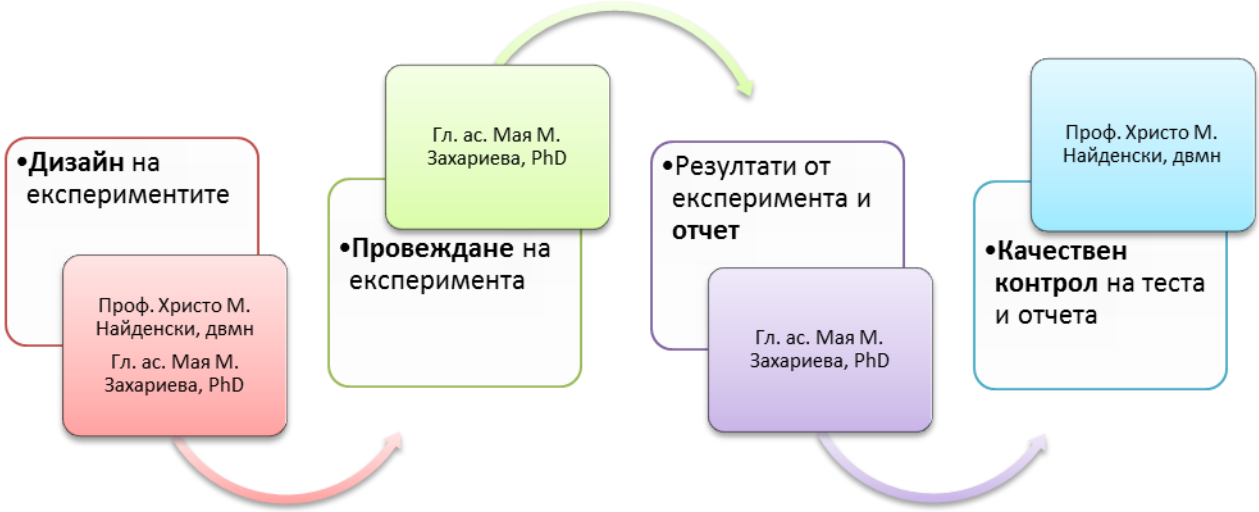
Проф. Христо М. Найденски, двмн, чл. кор. на БАН – качествен контрол

Гл. ас. Мая М. Захариева, PhD

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

5.2 Административна структура на изследването



Фигура 1. Административна структура на изследването

6 Въведение

Алергичните заболявания представляват сериозен здравословен проблем. Алергичната реакция се характеризира с нарушен баланс на T-helper 1/T-helper 2 Т-лимфоцитите към, специфичен TH2 цитокинов профил, предизивикан от преференциален алерген и водещ до алергично възпаление [1]. Домашните акари са източник на 21 алергена. Основните алергени, характерни за обикновения домашен акар *Dermatophagoides pteronyssinus* са DERP1 и DERP2. Контактът с тези алергени е свързан с развитието на алергични симптоми и астма в сензитизираните пациенти [2]. Пробиотичните бактерии оказват редица благоприятни ефекти върху много патологични състояния. Научните изследвания са показали, че пробиотичните бактерии, налични в интестиналната флора играят важна роля за TH1/TH2 баланса и участват в контрола на инфекциозните и имунните процеси [1]. Публикувани са изследвания и върху потенциала на пробиотичните бактерии да инхибират стимулираната от *Dermatophagoides pteronyssinus* секреция на Th-2 цитокини и да повишават секрецията на IFN-γ [3]. Пробиотиците се използват от векове във ферментирали млечни продукти. Въпреки това, потенциалните приложения на пробиотици в немлечни хранителни продукти, домакинството и селското стопанство не са получили официално признание. В последно време се наблюдава повишен интерес към приложение на пробиотици в хранително-вкусовата и селскостопанската промишленост, поради което изборът на нови пробиотични щамове и разработването на нови приложения придобива голямо значение[4]. Напоследък бактериите от род *Bacillus* привличат все

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

повече научния интерес поради тяхната положителна роля в околната среда и гостоприемника. Те непрекъснато попадат в храносмилателния тракт и респираторната система на човека и животните с водата, въздуха и храната, защото са навсякъде около нас и представляват част от нормалната микрофлора в червата на бозайниците и в храните, които консумираме. От род *Bacillus* могат да бъдат изолирани щамове с уникални свойства [4]. Бацилите са стабилни по време на обработка и съхранение на хранителни, фармацевтични и други продукти, което ги прави подходящи кандидати за препарати с благоприятен ефект върху човешкото здраве. Щамове от род *Bacillus* притежават биотерапевтичен потенциал, което е свързано с тяхната способност да взаимодействат с вътрешната среда на гостоприемника. Няколко изследвания са посочили вероятни механизми на кандидат-пробиотични щамове от рода *Bacillus* да оказват стимулиращ ефект върху здравето на гостоприемника. Тези механизми включват стимулиране на имунната система, синтез на антимикробни агенти, като бактериоцини и ензими, стимулиране растежа на други полезни бактерии и потискане растежа на патогенни бактериални видове и патогени, индуциращи възпалителен отговор в интестиналната мукоза [5].

Предмет на настоящето изследване е оенката на антиалергичната активност на пробиотичен продукт, съдържащ бактериални щамове от вида *Bacillus* и предназначен за употреба в човешкия бит с цел директно потискане на размножаването на акари от вида *Dermatophagoides pteronyssinus*. Нашата хипотеза за антиалергичния потенциал на този продукт се базира на описаните по-горе публикувани научни изследвания за механизма на действие на редица щамове от вида *Bacillus*.

7 Цели на изследването и оценявани параметри

7.1 Цели

Цел на настоящето изследване е оценката на антиалергичния потенциал на пробиотичния продукт Pro-biotic BED – пробиотичен неутрализатор на акари в домашен прах (Перилис Трейдинг ЕООД, технология ван дер Шот), чрез определяне на наличието в домашен прах на алергена DERP1 след регулярна употреба на продуктас.

7.2 Оценявани параметри

- Количествено колориметрично определяне на наличието на алергена DERP1 в проби от домашен прах със специфичен DERP1 ELISA тест.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

8 План на изследването

8.1 Описание на тест пробите

Тест пробите бяха предоставени от възложителя и идентифицирани, както следва:

Име: BED Pro-biotic, van der Schoot technology – пробиотичен неутрализатор за акари и алергени

Идентификационен номер: LOT...

Срок на годност: 12.2020

Съдържание: ферментиращи бактерии <5%, хипоалергенна парфюмна смес

Приложение: премахва успешно акари и техните екскременти като източник на дискомфорт и алергии. Ограничава храненето на акарите чрез компетитивни механизми и освобождава ензими, които неутрализират екскрементите на акарите.

Опаковка: Бяла, непрозрачна пластмасова бутилка от 500 ml тип спрей.

Условия за съхранение: при температура между 5 и 35 °C.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

8.2 Дизайн на изследването и методи

Антиалергичната активност на предоставения продукт беше определена с ELISA тест след оптимизиране на екстракцията на алергена DERP1 от проби от домашен:

1) Оптимизиране на метода за екстракция
2) DERP1 специфичен ELISA тест

Дизайнът на проучването е представен на следната диаграма:



Фигура 2. Дизайн на изследването и методи

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

8.3 Провеждане на изследването

8.3.1 Приложение на тест пробата и събуране на домашен прах

Тестваният пробиотичен продукт беше приложен в пет различни помещения на всеки пети ден след почистване в продължение на един месец. Проби от прах бяха събрани преди почистване на 1-ви, 5-и, 10-и, 15-и и 20-и ден в стерилна епруветка, използвайки стерилен прибор.

8.3.2 Екстракция на DERP1

Процедурата за извличане на DERP1 от домашен прах изисква оптимизиране на екстракционните буфери. Въз основа на литературни данни [2] тествахме ефикасността на екстракцията с различни буфери: фосфатен (pH 7.4), боратен (pH 8.0) и с амониев бикарбонат (pH 8.0), всички с 0,05% Tween 20. В съответствие с използваните литературни източници, установихме, че и трите буфера са подходящи за извличане на DERP1 и продължихме работата си с боратния буфер. Това решение за боратния буфер се основава на информацията, публикувана в статията на Престер и съавт. [2] до редактора на списанието, според която боратният буфер е два пъти по-ефикасен от другите два [6]. Съставът на боратния буфер беше: 0.11 mol L^{-1} H_3B0_3, 0.044 mol L-1 HCl, 0.056 mol L^{-1} NaOH и 0.05 % Tween 20. Екстракцията на елргена беше проведена съгласно протокола на Престер и съавт. [2]. Накратко всяка проба беше пресята през сито 300 μm, хомогенизирана и претеглена. Пробите от фин прах бяха разделени на две аликвоти от 100 μg и към всяка една беше добавен екстракционен разтвор (2 ml) Екстракциите бяха извършени при стайна температура и постоянно разбъркване (V-1 плюс, Biosan) в продължение на 2 часа. След 10 минути центрофугиране при 1,000*x*g, супернатантите бяха прехвърлени в пластмасови епруветки и замразени на -20 ° C до анализ на съдържанието за DERP1. Бяха анализирани общо 25 екстракта.

8.3.3 DERP1 специфичен ELISA тест

Тестът се извърши в съответствие с инструкциите на производителя. Накратко, 10 μL от всяка проба се добавят към съответната ямка от плаката. Към всяка ямка се добавя разтворителс изключение на празната проба. Към всяка ямка се добавят 100 μL HRP-конюгиран реагент, плаката се покрива с мембрана, леко се разклаща и се разбърква в продължение на 60 минути при 37 ° C. Всяка ямка се промива 5 пъти с 350 μL миещ буфер и се суши. След това към всяка ямка се прибавят последователно 50 μL разтвор на хромоген А и 50 uL хромогенен разтвор В. След 15 минути инкубация (37 ° C, на тъмно), към всяка ямка се добавят 50 μL разтвор за блокиране на реакцията.

8.3.4 Отчитане на резултатите

Абсорбцията на цветния прдукт беше измерена а ELISA четец EL x 800 (BioTek, USA) при дължина на вълната 450 nm. ПОлучените стойности бяха запазени в програмата Excel.

8.4 Оценка на резултатите

Резултатите бяха изчислени и статистически анализирани с двупосочна ANOVA, използвайки софтуера GraphPad Prism (версия 6.00 за Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

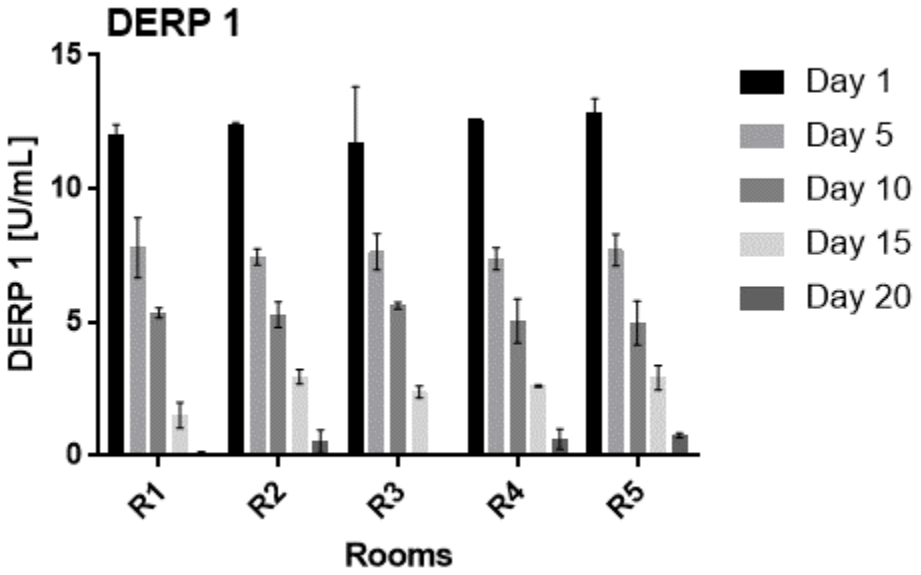
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

9 Резултати

9.1 Графично представяне на количеството DERP1 в домашен преах педи и след прилагане на BED Pro-biotic

Количеството на DERP1 алергена, намерено в анализираните проби, беше изчислено и представено на графика 1. Суровите данни от измерването на абсорбцията са представени в Таблица 2 и Приложение 2. В Таблица 1 са представени данните, използвани за генериране на Графика 1 - количество DERP1 в U/ml, изчислено от стандартната крива, получена със стандартите в DERP1 ELISA Kit. Всички данни бяха обработени и изчислени според препоръките на производителя на DERP1 ELISA Kit.



Графика 1. Количество на алергена DERP1 в проби от домашен прах, събрани от пет различни помещениц на всеки 5 дни в рамките на един месец преди прилагане на тествания прдукт.

Таблица 1. Количество на алергена DERP1 [U/mL] , изчислено от стандартната права:

Помещение	Ден 1		Ден 5		Ден 10		Ден 15		Ден 20	
R1	12.28264	11.69584	7.001467	8.585819	5.475795	5.221516	1.172616	1.857213	0.057702	0.135941
R2	12.3022	12.43912	7.236186	7.666504	4.947677	5.612714	3.148166	2.756968	0.233741	0.840098
R3	10.20929	13.20196	7.157946	8.116381	5.710513	5.534474	2.228851	2.541809	0.038142	0.018582
R4	12.53692	12.5956	7.079707	7.666504	5.632274	4.45868	2.639609	2.580929	0.898778	0.37066
R5	12.43912	13.22152	7.275306	8.116381	5.554034	4.4	2.600489	3.245966	0.703178	0.820538

Легенда: R = помещение.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

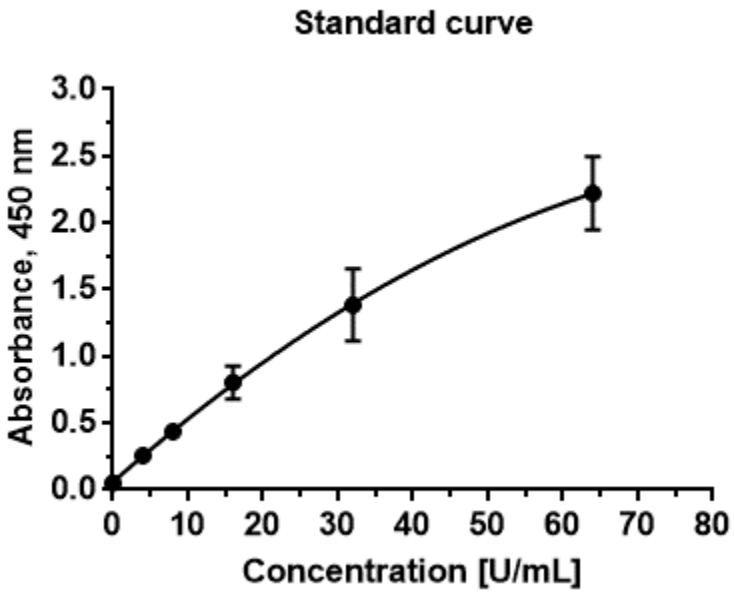
Таблица 2. Сурови данни от абсорбцията на пробите

Помещение	Ден 1		Ден 5		Ден 10		Ден 15		Ден 20	
R1	0.68	0.65	0.41	0.491	0.332	0.319	0.112	0.147	0.055	0.059
R2	0.681	0.688	0.422	0.444	0.305	0.339	0.213	0.193	0.064	0.095
R3	0.574	0.727	0.418	0.467	0.344	0.335	0.166	0.182	0.054	0.053
R4	0.693	0.696	0.414	0.444	0.34	0.28	0.187	0.184	0.098	0.071
R5	0.688	0.728	0.424	0.467	0.336	0.277	0.185	0.218	0.088	0.094

Легенда: R = помещение.

9.2 Стандартна права за изчисление на количеството на DERP1 [U/mL]

Стандартната права беше построена в програмата GrapPad Prism с помощта на XY таблица, която беше използвана за определяне на количеството на алергена DERP1 във всяка от пробите.



Графика 2. Стандартна права за изчисление на количеството на алергена DERP1 в просбите от домашен прах.

Таблица 3. Сурови данни за стандартната права.

Концентрация [U/mL]	**Абсорбция**	
0	0.05	0.053
4	0.274	0.238
8	0.465	0.406
16	0.892	0.715
32	1.575	1.193
64	2.029	2.414

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

9.3 Статистически анализ

Статистическият анализ беше проведен с двупосочна ANOVA.

Таблица 4. Сравнение на данните по време на въздействие за всяко помещение.

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	5				
Number of comparisons per family	10				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test	**Mean Diff.**	**95.00% CI of diff.**	**Significant?**	**Summary**	**Adjusted P Value**
R1					
Day 5 vs. Day 1	-4.196	-6.023 to -2.368	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 1	-6.641	-8.468 to -4.813	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 1	-10.47	-12.3 to -8.647	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 1	-11.89	-13.72 to -10.06	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 5	-2.4454.	-4.272 to -0.6175	Yes	**	0.0056
Day 15 vs. Day 5	-6.279	-8.106 to -4.451	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 5	-7.697	-9.524 to -5.869	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 10	-3.834	-5.661 to -2.006	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 10	-5.252	-7.079 to -3.424	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 15	-1.418	-3.246 to 0.4094	No	ns	0.1790
R2					
Day 5 vs. Day 1	-4.919	-6.747 to -3.092	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 1	-7.09	-8.918 to -5.263	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 1	-9.418	-11.25 to -7.591	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 1	-11.83	-13.66 to -10.01	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 5	-2.171	-3.999 to -0.3437	Yes	*	0.0151
Day 15 vs. Day 5	-4.499	-6.326 to -2.671	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 5	-6.914	-8.742 to -5.087	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 10	-2.328	-4.155 to -0.5002	Yes	**	0.0086
Day 20 vs. Day 10	-4.743	-6.571 to -2.916	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 15	-2.416	-4.243 to -0.5882	Yes	**	0.0062
R3					
Day 5 vs. Day 1	-4.068	-5.896 to -2.241	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 1	-6.083	-7.911 to -4.256	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 1	-9.32	-11.15 to -7.493	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 1	-11.68	-13.5 to -9.85	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 5	-2.015	-3.842 to -0.1872	Yes	*	0.0263
Day 15 vs. Day 5	-5.252	-7.079 to -3.424	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 5	-7.609	-9.436 to -5.781	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 10	-3.237	-5.065 to -1.41	Yes	***	0.0003
Day 20 vs. Day 10	-5.594	-7.422 to -3.767	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 15	-2.357	-4.184 to -0.5295	Yes	**	0.0077
R4					
Day 5 vs. Day 1	-5.193	-7.021 to -3.366	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 1	-7.521	-9.348 to -5.693	Yes	****	<0.0001

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

Day 15 vs. Day 1	-9.956	-11.78 to -8.129	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 1	-11.93	-13.76 to -10.1	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 5	-2.328	-4.155 to -0.5002	Yes	**	0.0086
Day 15 vs. Day 5	-4.763	-6.59 to -2.935	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 5	-6.738	-8.566 to -4.911	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 10	-2.435	-4.263 to -0.6077	Yes	**	0.0058
Day 20 vs. Day 10	-4.411	-6.238 to -2.583	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 15	-1.976	-3.803 to -0.1481	Yes	*	0.0302
R5					
Day 5 vs. Day 1	-5.134	-6.962 to -3.307	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 1	-7.853	-9.681 to -6.026	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 1	-9.907	-11.73 to -8.08	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 1	-12.07	-13.9 to -10.24	Yes	****	<0.0001
Day 10 vs. Day 5	-2.719	-4.546 to -0.8914	Yes	**	0.0020
Day 15 vs. Day 5	-4.773	-6.6 to -2.945	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 5	-6.934	-8.761 to -5.107	Yes	****	<0.0001
Day 15 vs. Day 10	-2.054	-3.881 to -0.2263	Yes	*	0.0229
Day 20 vs. Day 10	-4.215	-6.043 to -2.388	Yes	****	<0.0001
Day 20 vs. Day 15	-2.161	-3.989 to -0.3339	Yes	*	0.0157

Таблица 5. Сравнение на данните по помещения за всяка времева точка на събиране на домашен прах.

Within each column, compare rows (simple effects within columns)					
Number of families	5				
Number of comparisons per family	10				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test	**Mean Diff.**	**95.00% CI of diff.**	**Significant?**	**Summary**	**Adjusted P Value**
Day 1					
R1 vs. R2	-0.3814	-2.223 to 1.46	No	ns	0.9724
R1 vs. R3	0.2836	-1.558 to 2.125	No	ns	0.9908
R1 vs. R4	-0.577	-2.418 to 1.264	No	ns	0.8863
R1 vs. R5	-0.8411	-2.682 to 1	No	ns	0.6688
R2 vs. R3	0.665	-1.176 to 2.506	No	ns	0.8244
R2 vs. R4	-0.1956	-2.037 to 1.646	No	ns	0.9978
R2 vs. R5	-0.4597	-2.301 to 1.382	No	ns	0.9466
R3 vs. R4	-0.8606	-2.702 to 0.9807	No	ns	0.6499
R3 vs. R5	-1.125	-2.966 to 0.7166	No	ns	0.3991
R4 vs. R5	-0.2641	-2.105 to 1.577	No	ns	0.9930
Day 5					
R1 vs. R2	0.3423	-1.499 to 2.184	No	ns	0.9814
R1 vs. R3	0.1565	-1.685 to 1.998	No	ns	0.9991
R1 vs. R4	0.4205	-1.421 to 2.262	No	ns	0.9609
R1 vs. R5	0.0978	-1.744 to 1.939	No	ns	0.9999
R2 vs. R3	-0.1858	-2.027 to 1.655	No	ns	0.9982

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

R2 vs. R4	0.07824	-1.763 to 1.92	No	ns	>0.9999
R2 vs. R5	-0.2445	-2.086 to 1.597	No	ns	0.9948
R3 vs. R4	0.2641	-1.577 to 2.105	No	ns	0.9930
R3 vs. R5	-0.05868	-1.9 to 1.783	No	ns	>0.9999
R4 vs. R5	-0.3227	-2.164 to 1.519	No	ns	0.9851
Day 10					
R1 vs. R2	0.06846	-1.773 to 1.91	No	ns	>0.9999
R1 vs. R3	-0.2738	-2.115 to 1.567	No	ns	0.9920
R1 vs. R4	0.3032	-1.538 to 2.144	No	ns	0.9882
R1 vs. R5	0.3716	-1.47 to 2.213	No	ns	0.9749
R2 vs. R3	-0.3423	-2.184 to 1.499	No	ns	0.9814
R2 vs. R4	0.2347	-1.607 to 2.076	No	ns	0.9955
R2 vs. R5	0.3032	-1.538 to 2.144	No	ns	0.9882
R3 vs. R4	0.577	-1.264 to 2.418	No	ns	0.8864
R3 vs. R5	0.6455	-1.196 to 2.487	No	ns	0.8393
R4 vs. R5	0.06846	-1.773 to 1.91	No	ns	>0.9999
Day 15					
R1 vs. R2	-1.438	-3.279 to 0.4037	No	ns	0.1804
R1 vs. R3	-0.8704	-2.712 to 0.9709	No	ns	0.6404
R1 vs. R4	-1.095	-2.937 to 0.746	No	ns	0.4251
R1 vs. R5	-1.408	-3.25 to 0.433	No	ns	0.1960
R2 vs. R3	0.5672	-1.274 to 2.409	No	ns	0.8924
R2 vs. R4	0.3423	-1.499 to 2.184	No	ns	0.9814
R2 vs. R5	0.02934	-1.812 to 1.871	No	ns	>0.9999
R3 vs. R4	-0.2249	-2.066 to 1.616	No	ns	0.9962
R3 vs. R5	-0.5379	-2.379 to 1.303	No	ns	0.9094
R4 vs. R5	-0.313	-2.154 to 1.528	No	ns	0.9867
Day 20					
R1 vs. R2	-0.4401	-2.281 to 1.401	No	ns	0.9541
R1 vs. R3	0.06846	-1.773 to 1.91	No	ns	>0.9999
R1 vs. R4	-0.5379	-2.379 to 1.303	No	ns	0.9094
R1 vs. R5	-0.665	-2.506 to 1.176	No	ns	0.8244
R2 vs. R3	0.5086	-1.333 to 2.35	No	ns	0.9247
R2 vs. R4	-0.0978	-1.939 to 1.744	No	ns	0.9999
R2 vs. R5	-0.2249	-2.066 to 1.616	No	ns	0.9962
R3 vs. R4	-0.6064	-2.448 to 1.235	No	ns	0.8672
R3 vs. R5	-0.7335	-2.575 to 1.108	No	ns	0.7679
R4 vs. R5	-0.1271	-1.968 to 1.714	No	ns	0.9996

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

10 Заключение

В заключение, продуктът BED Pro-biotic намалява количеството на алергена DERP1 сигнификантно още след първото приложение. Пет дни след четвъртото приложение се наблюдава почти 100% премахване на алергена от тествание проби. Разликите между врмевите точки на събиране на пробите са значителни. Не бяха наблюдавани сигнификантни разлики и между помещенията, в които беше извършен теста.

Този резултат се отнася само до тествания продукт и прилагането му за други продукти е отговорност на Перилис Трейдинг ЕООД.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоциран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

11 Библиография

1. Sheikh, S., et al., *The immunomodulatory effects of probiotic bacteria on peripheral blood mononuclear cells (PBMCS) of allergic patients.* American Journal of Immunology, 2014. **10**: p. 116-130.
2. Prester, L., J. Kovacic, and J. Macan, *Comparison of buffers for extraction of mite allergen der p 1 from dust.* Arh Hig Rada Toksikol, 2012. **63**(3): p. 293-300.
3. Ghadimi, D., et al., *Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects.* Immunobiology, 2008. **213**: p. 677-92.
4. Song, D., S.A. Ibrahim, and S.A. Hayek, *Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science*, in *Probiotics*, E. Rigobelo, Editor. 2012, IntechOpen.
5. Elshaghabee, F.M.F., et al., *Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives.* Frontiers in microbiology, 2017. **8**: p. 1490-1490.
6. Siebers, R., *Extraction Of House Dust Mite Allergen, Der P1, From Dust.* Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 2012. **63**: p. 553.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ Н НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
Асоцииран с Институт Пастьор

ул. „Акад. Г. Бончев“, Бл. 26,
1113 София
Тел. (+359 2) 979 31 57; Факс: (+359 2) 870 01 09
e-mail: micb@microbio.bas.bg

12 Приложения

12.1 Приложение 1: лабораторно оборудване, консумативи, среди и реагенти.

Лабораторно оборудване

Уред	Производител	Модел	Сериен номер	Дата на профилактика/калибриране
Инкубатор	Panasonic, Japan	MCO-18AC-PE	14080350	04.02.2020/Operating parameters protocol/ELTA’90
Центрофуга	Hermle, Germany	Z 206 A	601	04.02.2020/Protocol of findings RD10.4/ELTA’90
ELISA-четец	BioTek	Elx800	141208C	04.02.2020/Protocol of findings RD10.4/ELTA’90
Data-logger	ETI, UK	ThermaData TD2F	296-111	Certificate Nr. 50-LK/30.01.2020

Медицински консумативи за еднократна употреба

Материал	Описание/Производител	Кат. №	Парт. №	Срокна годност
Pipette tips	Gamma-sterilized,200 µl, 96 per box	T-200-Y-R-S	17719402	26.06.2022
Pipette tips	Gamma-sterilized,1000 µl, 96 per box	T-1000-B-R-S	22319425	11.08.2022
Serological pipettes	Gamma-sterilized, plastic, 5 ml, individually wrapped, Corning	4487	16518051	13.06.2021
Combi advanced 0.5 ml	Eppendorf	0030089634	H179532O	09.2023
Combi advanced 5 ml	Eppendorf	2433	H179360O	09.2023
Duafilter 5 ml L	Eppendorf	0030077725	F168409N - 1430	-

Пипети

Материал	Описание	Модел/ Производител	Дата на калибриране
Pipette	Variable, songle-channel, 500-5000 µl	Eppendorf Research Plus P32486D	03.04.2019
Pipette	Variable, songle-channel, 100-1000 µl	Biohit Proline 14647911	03.04.2019
Pipette	Variable, songle-channel, 20-200 µl	Axygen AP-200 358150004	03.04.2019
Pipette	Variable, songle-channel, 0,5-10 µl	Axygen AP-10 458120157	03.04.2019
Dispenser	for compbitips from 0.1 to 24 ml	Eppendorf Multipette M4 P42999D	03.04.2019
Stripettor	For serological pipettes, filter 0.45 µm	Corning, Stripettor 4099	-

Среди буфери, разтвори и реагенти

Материал	Описание/Производител	Кат. №	Парт. №	Срокна годност
DPBS	Gibco	14190-086	2007043	30.06.2021

12.2 Приложение 2: Абсорбция – сурови данни

Отделен файл в Excel формат.

Изготвен от:.....

/Гл. ас. Мая Захариева, дф/

Дата на изготвяне на отчета: 20.05.2020

Одобрен от: .....

/Чл. кор. проф. Христо найденски, двмн /

Дата на одобрение: 22.05.2020

Директор:.....

/Доц. дфн Пенка Петрова/

Дата: 09.07.2020 г.