

RIVM rapport 257852 003

**Indicator-antigenen voor de bepaling van
blootstelling aan (allergenen van) schimmels in
het binnenhuismilieu II *Alternaria alternata*.**

W.D.C. Deisz, L.M. Wijnands, F.M. van Leusden

december 1998

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de Inspectie
Gezondheidsbescherming, Waren en Veterinaire zaken in het kader van project nr 257852,
Blootstelling aan schimmel(s) (producten) en het daarmee verbonden risico voor de
volksgezondheid.

Abstract

Exposure to moulds and their products in the indoor environment may lead to the occurrence of allergies, asthma or respiratory complaints in general. Whereas estimation of exposure by means of enumerating viable parts is insufficient, other methods have to be developed. When grown under various circumstances in the laboratory, *Alternaria alternata* produced a number of antigens that can be found under all studied growth conditions. These common antigens could serve as indicators for exposure to *A. alternata* and its products. In view of the simultaneous presence of these common antigens and allergens, these common antigens could also serve as indicators for exposure to allergens of *A. alternata*. The value of the indicators still has to be proven by investigating house-dust and air samples.

Inhoud

SAMENVATTING	7
INLEIDING	9
MATERIAAL	13
METHODEN	15
Kweek	15
MORFOLOGISCH ONDERZOEK	15
PRODUCTIE EXTRACTEN	15
<i>Cultuurfiltraat (CF) extracten</i>	15
<i>Wateroplosbare (WS) extracten</i>	16
BIOCHEMISCHE KARAKTERISERING EN HER-OPLOSSEN EXTRACTEN	16
GELELECTROFORESE EN IMMUNOBLOT	17
EVALUATIE GELPATRONEN	17
RESULTATEN	19
ANTIGENEN IN CF EXTRACTEN.....	19
ANTIGENEN IN WS EXTRACTEN.....	19
ALLERGENEN IN CF EXTRACTEN	19
ALLERGENEN IN WS EXTRACTEN	20
KANDIDAAT INDICATOR-ANTIGENEN IN CF EXTRACTEN	20
OVERIGE ANTIGENEN IN CF EXTRACTEN BIJ 22 °C.....	21
OVERIGE ANTIGENEN IN CF EXTRACTEN BIJ 30 °C.....	21
KANDIDAAT INDICATOR-ANTIGENEN IN WS EXTRACTEN ONDER ALLE OMSTANDIGHEDEN	21
OVERIGE ANTIGENEN IN WS EXTRACTEN BIJ 22 °C.....	22
OVERIGE ANTIGENEN IN WS EXTRACTEN BIJ 30 °C.....	22
DISCUSSIE/EVALUATIE	23
INDICATOR-ANTIGENEN ONDER ALLE OMSTANDIGHEDEN.....	23
<i>CF extracten</i>	23
<i>WS extracten</i>	24
INDEX-ANTIGEEEN.....	24
OVEREENKOMSTIGE ALLERGENEN IN DE 22 °C HOGE EN LAGE AW EN 30 °C HOGE EN LAGE AW	25
CONCLUSIE	29
TABELLEN	31
LITERATUUR.....	39
BIJLAGE 1 VERZENDLIJST	41

Samenvatting

Blootstelling aan schimmels en schimmelproducten in het binnenhuismilieu zou kunnen leiden tot het optreden van allergieën, astma en respiratoire aandoeningen in het algemeen. Aangezien meting volgens klassieke methoden ontoereikend is om blootstelling aan schimmels, schimmelproducten en door schimmels geproduceerde allergenen te bepalen werd gezocht naar een betere methode hiervoor. Onderzoek op laboratoriumschaal toonde aan dat *Alternaria alternata* antigenen produceert die onder alle gebruikte kweekomstandigheden detecteerbaar zijn. Deze gemeenschappelijke antigenen kunnen dienen als “indicator”-antigenen voor blootstelling aan *A. alternata* en zijn producten. Gezien het gelijktijdig voorkomen van zowel deze gemeenschappelijke antigenen als allergenen kunnen deze “indicator”-antigenen gebruikt worden om blootstelling aan allergenen geproduceerd door *A. alternata* te bepalen. Aangezien het hier laboratoriumstudies betreft moet de waarde van de hier vermelde “indicator”-antigenen in praktijkmonsters (huisstof- en luchtmonsters) nog aangetoond worden.

1 Inleiding

Ruim 10% van de Nederlandse bevolking heeft in meer of mindere mate last van CARA (Chronische Aspecifieke Respiratoire Aandoeningen). Blootstelling in de eerste levensjaren aan allergenen in het binnenhuismilieu zou vooral bij atopische¹ kinderen tot allergie en hierdoor mogelijk tot astma en op latere leeftijd tot chronische luchtwegaandoeningen kunnen leiden (1). Door isolatie van woningen en de daarmee samenhangende minder goede ventilatie van woningen is de kans op blootstelling aan biologische agentia in het binnenhuismilieu, zoals huisstofmijten en schimmels, toegenomen. Allergie-problemen veroorzaakt door huisstofmijten zijn in de afgelopen jaren grondig onderzocht en in kaart gebracht (2). Hierbij werd een duidelijk verband geconstateerd tussen (de mate van) blootstelling aan en het optreden van allergieën tegen (de uitwerpselen van) huisstofmijten. Met de tot nog toe gebruikte klassieke methoden (aantallen kweekbare schimmeldelen in lucht of stof, huidtesten met niet-gedefinieerde allergenen e.d.) voor het vaststellen van schimmelbelasting en schimmel-allergieën, is het tot nu toe niet mogelijk geweest antwoord te geven op de vraag of schimmelbelasting bijdraagt tot het ontstaan van allergieën en astma of wat het aantal schimmel-allergieën in de Nederlandse situatie is in een atopische en niet-atopische populatie. Tot op heden is wel een relatie vastgesteld tussen huiskarakteristieken en aantal schimmelsporen, maar niet tussen schimmelsporen in huisstof en respiratoire symptomen bij kinderen (3). Schimmelbelasting wordt tot nu toe voornamelijk vastgesteld via het bepalen van kweekbare schimmeldelen in de lucht en het vóórkomen van schimmelspots in de woning. Echter, een deel van de schimmelbelasting zal tevens bestaan uit niet-levensvatbare schimmeldelen ten gevolge van celdood en producten welke actief tijdens de groei worden uitgescheiden. Eerder (4) werd reeds gevonden dat het mogelijk is via het bepalen van uitgescheiden hitte-stabiele polysacchariden schimmelbelasting in verhitte levens- en voedermiddelen te bepalen. Deze wijze van meten van schimmelbelasting met behulp van stoffen welke een maat kunnen zijn voor beschimmeling ligt ten grondslag aan het in dit rapport beschreven onderzoek naar indicator stoffen voor allergene schimmelblootstelling in het binnenhuismilieu. Het onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met de Leerstoelgroep Gezondheidsleer van het departement Omgevingswetenschappen van de Landbouwniversiteit Wageningen, waar gewerkt wordt aan glucanen en extracellulaire polysacchariden als mogelijkheid om blootstelling aan schimmels te kunnen vaststellen. Voor het beantwoorden van de vraag of schimmelbelasting een (belangrijke) rol speelt bij het

¹ Atopisch = de erfelijke aanleg bezittend voor het krijgen van allergie

ontstaan van allergieën en mogelijk daaruit voortvloeiende ernstige gezondheidsproblemen op latere leeftijd is het nodig te weten of, en in welke mate, er blootstelling aan schimmelallergenen plaatsvindt op jonge leeftijd en of dit leidt tot voornoemde aandoeningen. Diverse onderzoekers (7,8,9) hebben het vóórkomen van verschillende allergenen van schimmels aangetoond. Een aantal van deze allergenen wordt gekarakteriseerd als “major allergens”. Deze term zegt echter niets over de rol die deze allergenen zouden kunnen spelen bij de inductie van schimmel-allergieën. De term is gebaseerd op het onder optimale omstandigheden tot expressie komen in schimmelkweek en het vóórkomen van IgE gericht tegen deze allergenen bij groepen van patiënten met allergische aandoeningen. In het binnenhuismilieu zullen de omstandigheden (temperatuur, beschikbaar vocht) waarbij schimmelgroei kan optreden nogal wisselen. Zelfs het meest belangrijke element voor groei, i.e. vocht, kan in als droog gekarakteriseerde woningen onder bepaalde omstandigheden, zoals lokale sterke temperatuurdaling ten gevolge van bij voorbeeld koude-bruggen, toch voldoende aanwezig zijn (10). Om een goede inschatting te kunnen maken van schimmelblootstelling in het binnenhuismilieu is het van belang te weten welke schimmelproducten met een potentieel biologische respons bij de mens onder verschillende omstandigheden kunnen voorkomen.

Opzet van het hier beschreven onderzoek is om onder verschillende laboratorium-omstandigheden *Alternaria alternata*, één van de meest voorkomende schimmels in het binnenhuismilieu (11) gerelateerd aan allergieën, te kweken in een bioreactor. De gekozen kweekomstandigheden [22°C en 30°C, hoge en lage Aw (active water = niet gebonden water)] komen min of meer overeen met in het binnenhuismilieu voorkomende gemiddelde en extreme omstandigheden. In het binnenhuismilieu spreekt men echter niet over de Aw van de lucht maar over relatieve vochtigheid (RV) (v.b. Aw van 0,8 komt overeen met een RV van 80%). Gekozen is voor groei in een vloeibare cultuur, om destructie van schimmelproducten door extractie- en opwerkingsproblemen bij “solid phase” kweken te voorkomen. Voor de laagst te gebruiken Aw is als voorwaarde gesteld op grond van bevindingen van Adan (10) dat de schimmel bij die Aw nog moest kunnen ontkiemen en uitgroeien. De duur van de kweek is vastgesteld op 21 dagen om twee redenen: ten eerste omdat deze duur ook aangehouden is bij onderzoek naar allergenen van *A. fumigatus* (Rapport 257852 001); ten tweede is de grootte van de bioreactor en de grootte van de te nemen monsters van dien aard dat langer kweken dan 21 dagen zou kunnen leiden tot andere groei-omstandigheden in de bioreactor door een te klein resterend volume (beluchting, werveling cultuur, meten parameters). Gekozen is voor een volledig uit zouten bestaand

medium om invloeden van in het medium voorkomende macromoleculen bij de karakterisering van schimmel en schimmelproducten te vermijden. Door op gezette tijden monsters uit de kweken te halen kon in de loop van de tijd de productie van eiwitten, suikers, antigenen en allergenen in het kweekmedium en het mycelium worden nagegaan.

Doel van het hier beschreven onderzoek is om tussen alle door *A. alternata* onder verschillende groeiomstandigheden geproduceerde stoffen te zoeken naar gemeenschappelijke antigenen bij de verschillende omstandigheden en het vóórkomen van deze antigenen te correleren aan het vóórkomen van allergenen onder de genoemde omstandigheden. Dergelijke gemeenschappelijke antigenen zouden als indicatoren² gebruikt kunnen worden bij het vaststellen van de mate aan schimmelblootstelling in de directe woonomgeving (via huisstof- en/of luchtmonsters). Indien het voorkomen van deze indicatoren gecorreleerd is aan het gelijktijdig aanwezig zijn van schimmelallergenen zouden zij ook geschikt zijn voor het vaststellen van blootstelling aan allergenen van *A. alternata* en de daaraan gecorreleerde gezondheidseffecten.

² indicatoren zijn die antigenen die onder alle vier de kweekomstandigheden vóór en / of op het tijdstip van allergeen productie aanwezig zijn.

2 Materiaal

- Voor de kweek werd gebruik gemaakt van een Applikon bioreactor met ADI 1030 biocontroller, met Czapek Dox broth (Difco);
- Destructie van het mycelium werd verkregen via een Branson sonifier 450;
- Concentratie van cultuurvloeistof werd uitgevoerd met een Amicon Stirred Cell voorzien van een polycarbonaatfilter met een cut-off waarde van 3000 Dalton;
- Om afbraak van eiwitten door proteasen in de extracten tegen te gaan werden de volgende protease-remmers toegevoegd: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 2 mM eindconcentratie, pepstatine $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ eindconcentratie en phenylmethaansulfonylfluoride (PMSF) 1 mM eindconcentratie.
- Gel-elektroforese werd uitgevoerd met een Mini-PROTEAN II Electrophoresis System met 1000/500 Powersupply (Bio-Rad Laboratories). De elektroforese buffer bestond uit 0,4 M glycine, 0,05 M Tris(hydroxymethyl-)aminomethaan (TRIS) en 3 mM natriumdodecylsulfaat (SDS) pH 8,3. Lysisbuffer bestond uit: 0,27 M SDS, 40 mM TRIS, 4 mM EDTA, 0,3 M broomfenolblauw, 0,66 M pyronine Y en 40% glycerol. De gebruikte molecuulgewicht standaarden (Amersham) bevatten myosine (220 kiloDalton [kD]), phosphorylase b (97,4 kD), bovine serum albumine (66 kD), ovalbumine (46 kD), carbonic anhydrase (30 kD) en trypsine inhibitor (21,5 kD). Voor gebruik werd 50 μl van dit mengsel gemengd met 200 μl gedestilleerd water en 80 μl lysisbuffer.
- Blots werden uitgevoerd met een TransBlot Cell met 250/2.5 Powersupply (Bio-Rad laboratories). De gebruikte buffer was bereid volgens Towbin et al. (12). Na blotten werden spoelbuffer “hoog” (0,45 M natriumchloride [NaCl], 10 mM TRIS en 0,5% Tween 20, pH 7,4) en spoelbuffer “laag” (0,15 M NaCl, 10 mM TRIS en 0,5% Tween 20, pH 7,4) gebruikt voor incubaties met de blots. De gebruikte conjugaten voor de ontwikkeling van de blots, geit anti konijn Ig~PO en muis monoklonaal anti humaan IgE~PO, waren respectievelijk van Biosource International en het Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusiedienst (CLB). Voor het aantonen van allergenen werd gebruik gemaakt van humaan serum met specifiek IgE gericht tegen *Alternaria alternata* (International Enzymes Inc., USA). Voor kleuring van de blots werd gebruik gemaakt van een oplossing bestaande uit 10 ml buffer (5 mM citroenzuur, 10 mM

dinatriumwaterstoffosfaat en 25% ethanol), 100 µl substraat-stock oplossing (60 mg/ml tetrametylbenzidine, 200 mg/ml dioctylsulfosuccinaat) en 5 µl 30% waterstofperoxide.

Voor zover niet specifiek vernoemd waren alle gebruikte chemicaliën van Merck, Darmstadt.

3 Methoden

3.1 Kweek

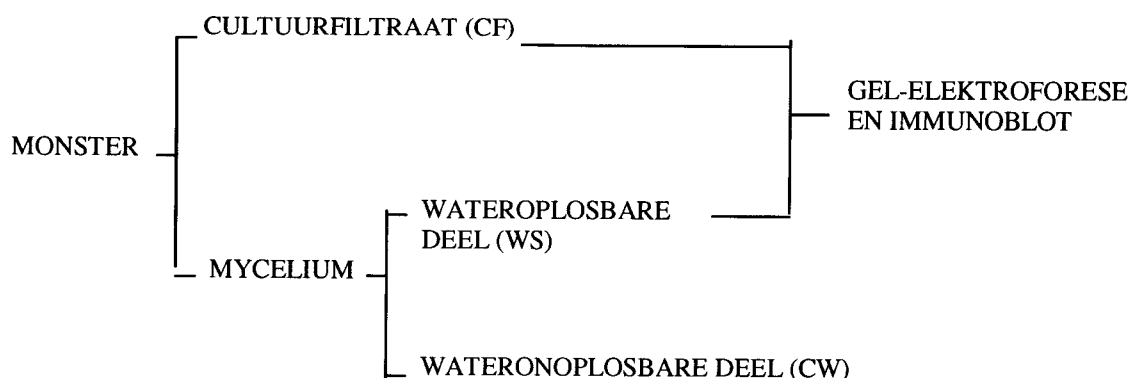
A. *alternata* (CBS 326.65) werd gekweekt in 5 liter Czapek-Dox bouillon in een 7 liter bio-reaktor (Applikon). Er werd gekweekt bij hoge Aw (= 0,99) en bij een dermate lage Aw (= 0,96) waarbij nog juist ontkieming en uitgroei van de schimmel kon plaatsvinden. Lage Aw waarden werden verkregen door aan het basismedium $0,10 \text{ g ml}^{-1}$ CalciumChloride (CaCl_2) toe te voegen. De kweken bij hoge en lage Aw werden uitgevoerd zowel bij 22 °C als bij 30 °C. De zuurstofspanning in het medium werd gedurende de gehele kweek op > 75% gehouden door lucht en/of zuivere zuurstof met behulp van de bij de reactor behorende biocontroller toe te voegen. De totale kweektijd bedroeg 21 dagen, gedurende welke tijd regelmatig (d.w.z. op de dagen 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18 en 21) 225 ml monsters werden genomen uit het kweekvat.

3.2 Morfologisch onderzoek

Een deel van de monsters (5 ml) werd gebruikt voor direct morfologisch onderzoek om de vorm van het mycelium en de vitaliteit te onderzoeken. Voor vitaliteitsonderzoek werd gebruik gemaakt van een kleuring met lacto-fenol katoen blauw (11).

3.3 Productie extracten

Schematische weergave verwerking monsters:



3.3.1 Cultuurfiltraat (CF) extracten

Van 110 ml monster werden cultuur-vloeistof en mycelium gescheiden middels filtratie door een Whatman GF/B glass microfibre filter. De cultuurvloeistof werd vervolgens gefiltreerd over een $0,22 \mu\text{m}$ filter, waarna 5 ml filtraat apart werd gehouden voor meting van de Aw-

waarde. Na toevoeging van protease-remmers werd het 0,22 µm filtraat 10x geconcentreerd met een Amicon Stirred Cell. Het gefiltreerde en geconcentreerde cultuurfiltraat werd gedialyseerd tegen gedestilleerd water; 1/10-deel werd achtergehouden en ingevroren tot moment van eiwit- en suikerbepalingen en het overige materiaal (CF) werd gevriesdroogd.

3.3.2 Wateroplosbare (WS) extracten

Het mycelium, verkregen uit 110 ml monster (zie 3.3.1.), werd met een sonifier kapotgemaakt. Aan alle monsters werd zoveel ammoniumbicarbonaat (0,05 Molair) toegevoegd dat een myceliumsuspensie werd verkregen van 30% (v/v). Het minimale eindvolume was 10 ml. Voor sonificatie werd gewerkt met een energieniveau van 20% en elke monsterportie van 10 ml werd minimaal 4 maal 6 minuten gesonificeerd in smeltend ijs. Na de laatste sonificatie-cyclus werd microscopisch de mate van destructie van de hyfen bepaald. Indien na de laatste sonificatie-cyclus de hyfen in een monster voor minder dan 95% kapotgemaakt waren, werden zoveel cycli toegevoegd tot deze 95% destructie bereikt was. Alvorens oplosbare en onoplosbare delen van elkaar te scheiden middels centrifugeren (10.000xg, 30 minuten, 5°C) werden protease-remmers aan de monsters toegevoegd. Het wateroplosbare deel (supernatant van deze centrifugeerstap) werd vervolgens nogmaals gecentrifugeerd (100.000xg, 30 minuten, 5°C) om hele fijne niet oplosbare deeltjes, die niet middels filtratie te scheiden waren van de vloeistoffase, te verwijderen. De zo verkregen oplossing werd gedialyseerd tegen gedestilleerd water; 1/10-deel werd achtergehouden en ingevroren tot moment van eiwit- en suikerbepalingen en het overige materiaal (WS) werd vervolgens gevriesdroogd.

3.4 Biochemische karakterisering en her-oplossen extracten

Eiwitbepalingen op de 1/10-delen van de extracten werden uitgevoerd volgens Lowry et al. (13), suikerbepalingen werden uitgevoerd volgens Dubois et al. (14).

Na vriesdrogen en bepaling van de droge stof gewichten werden alle extracten opgelost in een hoeveelheid gedestilleerd water die gelijk was aan het volume nodig om de eiwitconcentratie van het extract met de hoogste hoeveelheid eiwit 2,5 mg ml⁻¹ te laten bedragen.

3.5 Gelelectroforese en immunoblot

De heropgeloste extracten van tijdstippen 0 t/m 21 uit één kweek en blanco's (= gedestilleerd water) werden met lysisbuffer gemengd (3 delen monster of blanco + 1 deel lysisbuffer) en samen met bereide molecuulgewicht standaarden opgebracht op één 10% SDS-

Polyacrylamide gel volgens Laemmli (15). Voor iedere reeks extracten werden in totaal 4 gels gebruikt, nl. één voor zilverkleuring ten behoeve van het aantonen van eiwitten volgens Morrissey (16), één voor PAS-kleuring volgens een gemodificeerd protocol voor PAS-kleuring van Phast-System gels van Pharmacia ten behoeve van het aantonen van suikers en twee voor blots voor het aantonen van respectievelijk antigenen en allergenen. Elektroforese werd uitgevoerd gedurende 10 minuten bij 75 Volt constant en aansluitend gedurende 45 minuten bij 150 Volt constant.

De inhoud van de gels voor het aantonen van respectievelijk antigenen en allergenen is geblot op PolyVinylDiFluoride (PVDF)-membraan met behulp van een BioRad Trans Blot Cell gevuld met blotbuffer volgens Towbin et al. (12). De blottijd bedroeg 1 uur bij 50 Volt (amperage ca. 0,5A). Na blotten werden de gels geblokt met spoelbuffer "hoog" gedurende 1 uur. Voor het aantonen van antigenen werd één blotmembraan gedurende 45 minuten geïncubeerd met 1000x in spoelbuffer "hoog" verdund konijnen-serum gericht tegen CellWall (CW) antigenen van *Alternaria alternata* CBS 326.65 (17). Na serum-incubatie werd de blot gewassen met spoelbuffer "hoog" en spoelbuffer "laag", elk gedurende 15 minuten. Na incubatie met 2500x in spoelbuffer "laag" verdund conjugaat (geit anti konijn Ig~PO) gedurende 45 minuten, wassen met spoelbuffer "laag" en twee maal met gedestilleerd water (elke stap gedurende 15 minuten) werden de banden zichtbaar gemaakt met substraat-oplossing.

Voor het aantonen van allergenen werd grotendeels gebruik gemaakt van hetzelfde protocol als voor het aantonen van antigenen. De veranderingen betroffen ten eerste een incubatie met onverdund humaan serum met IgE-anti-*A. alternata* overnacht en ten tweede incubatie met muis monoclonaal anti humaan IgE gelabeld met peroxidase gedurende 6 uur.

3.6 Evaluatie gelpatronen

Na kleuring van gels en blots werden deze met een BioRad GS700 Densitometer en het BioRad Molecular Analyst programma gescand en in een computer opgeslagen.

Voor de evaluatie van de bandenpatronen op de vier verschillende gels werd eveneens gebruik gemaakt van het BioRad Molecular Analyst programma.

Het visuele beeld van de ingescande gels/blots werd eerst geoptimaliseerd, waarna de bandenpatronen aan de hand van de op de gels meegelopen markers werden omgezet in molecuulgewichten. De zo verkregen getallen werden overgezet naar MicroSoft Excel voor verdere bewerking. Per serie extracten en per kleuring werden de molecuulgewichten met elkaar vergeleken en overeenkomende banden werden op één lijn gezet. Van de molecuulgewichten op elke lijn werd een gemiddelde berekend waarna aan de hand van dat gemiddelde de procentuele afwijking per apart molecuulgewicht werd bepaald. Per serie extracten en per kleuring werd nagegaan welke maximale afwijking voorkwam. Deze maximale afwijking werd gebruikt om voor ieder gemiddeld molecuulgewicht een range aan te geven. Vervolgens werden de gemiddelde molecuulgewichten verkregen op antigeenblots voor alle vier de series met elkaar vergeleken om na te gaan welke molecuulgewichten in alle vier de series voorkwamen om op die manier mogelijke indicator-antigenen op te sporen.

Dit werd gedaan voor beide temperaturen en beide Aw's.

Vergelijkingen tussen WS-extracten en CF-extracten zijn niet uitgevoerd omdat niet te overzien is wat voor gevolgen de overgang van binnenkant cel naar cultuurvloeistof heeft op de samenstelling van de moleculen waardoor niet duidelijk is of, en zo ja hoe, die overgang invloed zou hebben op de molecuulgewichten.

4 Resultaten

Bij de bespreking van de resultaten zal gesproken worden over indicator-antigenen. Voor de definitie van indicator-antigenen, die in dit rapport gebruikt wordt, wordt verwezen naar de voetnoot op pagina 11.

4.1. Antigenen in CF extracten

De molecuulgewichten van alle antigenen die in de CF-extracten van de vier verschillende kweken werden gevonden, staan vermeld in de kolommen 2 t/m 5 van tabel 1.

Overeenkomstige antigenen (op basis van molecuulgewicht) staan op dezelfde regel. In deze tabel is niet weergegeven in welk stadium van de kweek de genoemde antigenen voorkomen. In kolom 6 van tabel 1 staan de gemiddelde molecuulgewichten vermeld van de verschillende antigenen. Eénentwintig antigenen konden aangetoond worden die zowel bij hoge als lage A_w bij 22°C geproduceerd werden (kolom 8). Zeven overeenkomstige antigenen werden bij zowel de hoge als lage A_w kweek van 30°C aangetoond (kolom 9). Drie antigenen kwamen bij alle vier de combinaties voor (kolom 7).

4.2. Antigenen in WS extracten

De molecuulgewichten van alle antigenen die in de WS-extracten van de vier verschillende kweken werden gevonden staan vermeld in de kolommen 2 t/m 5 van tabel 2.

Overeenkomstige antigenen (op basis van molecuulgewicht) staan op één lijn. Er is in deze tabel niet weergegeven in welk stadium van de kweek de antigenen geproduceerd werden. De gemiddelde molecuulgewichten van de verschillende antigenen staan vermeld in kolom 6. Vijf antigenen werden aangetoond bij 22 °C hoge en lage A_w (kolom 8). Tien antigenen werden aangetoond bij 30 °C hoge en lage A_w (kolom 9). Drie antigenen kwamen bij alle vier combinaties voor (kolom 7).

4.3. Allergenen in CF extracten

De molecuulgewichten van allergenen die in de CF extracten van de vier verschillende kweken werden aangetoond, staan vermeld in de kolommen 2 t/m 5 van tabel 3. Op basis van molecuulgewicht staan overeenkomstige allergenen op één lijn. Er is niet vermeld in welk stadium van de kweek de verschillende allergenen geproduceerd werden. In kolom 6 staan de

gemiddelde molecuulgewichten van overeenkomstige allergenen. Eén allergeen werd aangetoond onder alle vier de omstandigheden (kolom 7). Bij 22 °C hoge en lage Aw werd één allergeen geproduceerd (kolom 8). Vier allergenen werden bij 30 °C bij zowel hoge als lage Aw geproduceerd (kolom 9).

4.4. Allergenen in WS extracten

De molecuulgewichten van allergenen die in de WS extracten van de vier verschillende kweken aangetoond werden, staan vermeld in de kolommen 2 t/m 5 van tabel 4. Op basis van molecuulgewicht staan overeenkomstige allergenen op één lijn. Er is niet vermeld in welk stadium van de kweek de allergenen aangetoond werden. Er kon geen enkel allergeen aangetoond worden dat onder al de vier verschillende omstandigheden geproduceerd werd (kolom 7). Negen allergenen werden zowel bij hoge als lage Aw bij 22 °C aangetoond (kolom 8). Eén allergeen werd aangetoond bij 30 °C hoge en lage Aw (kolom 9).

4.5. Kandidaat indicator-antigenen in CF extracten

Van de drie antigenen, welke onder alle kweekomstandigheden werden aangetoond (68 kD, 57 – 57.5 kD en 54 - 55 kD), staat in tabel 5 aangegeven op welk tijdstip van de 4 verschillende kweekomstandigheden het antigeen werd aangetoond. Verder is met een X aangegeven of er ook allergenen aangetoond werden in de verschillende extracten. De drie kandidaat indicator-antigenen werden in de kweek van 22 °C, lage Aw alleen aangetoond op dag 16. In de kweek van 30 °C, lage Aw werd het 68 kD kandidaat indicator-antigeen aangetoond op dag 18, het 57 – 57.5 kD kandidaat indicator-antigeen op dag 4 en 21 en het 54-55 kD kandidaat indicator-antigeen alleen op dag 4. In de kweek bij 22 °C, hoge Aw werd het 68 kD kandidaat indicator-antigeen aangeetoond van dag 0 tot en met 9. Het 57 – 57.5 kD kandidaat indicator-antigeen werd op dag 14 aangetoond en het 54 - 55 kD kandidaat indicator-antigeen wisselend van dag 0 tot en met dag 7. Allergenen werden bij de kweek van lage Aw, 22 °C aangetoond vanaf dag 14 en bij de kweek van hoge Aw, 22 °C vanaf dag 9. In de kweken bij 30 °C werden allergenen bij lage Aw aangetoond vanaf dag 9 en bij hoge Aw vanaf dag 2.

4.6. Overige antigenen in CF extracten bij 22 °C

In tabel 6 zijn antigenen weergegeven die bij 22 °C hoge en lage Aw voorkomen. In totaal zijn er achttien antigenen aangetoond. In de tabel is aangegeven op welke dag van de kweek de antigenen aangetoond werden. De meeste indicator-antigenen bij de lage Aw kweek zijn aanwezig vanaf dag 14. Bij de hoge Aw kweek zijn de meeste antigenen tot en met dag 9 aanwezig. Allergenen (X) werden bij lage Aw aangetoond op dag 14 en 16. Bij hoge Aw werden allergenen (X) vanaf dag 9 aangetoond.

4.7. Overige antigenen in CF extracten bij 30 °C

Tabel 7 geeft de overeenkomstige antigenen van de kweken bij hoge en lage Aw bij 30 °C weer. Er werden vier antigenen aangetoond. Het antigeen van 85 kD werd in de lage Aw kweek op de dagen 4 en 9 aangetoond. In de hoge Aw kweek werd dit antigeen van dag 2 tot en met dag 21 teruggevonden. Het 63 kD antigeen werd bij 22 °C alleen op dag 21 aangetoond. Bij hoge Aw werd dit antigeen van dag 4 tot en met dag 21 geproduceerd. Het 48 kD antigeen werd bij lage Aw op dag 21 aangetoond en bij hoge Aw op de dagen 9, 14 en 16. Van dag 11 tot en met dag 21 werd bij lage Aw een 43 kD antigeen aangetoond. Bij hoge Aw werd dit antigeen alleen op dag 7 teruggevonden. Allergenen (X) werden bij lage Aw aangetoond vanaf dag 9. Bij de hoge Aw kweek werden allergenen (X) aangetoond vanaf dag 2.

4.8. Kandidaat indicator-antigenen in WS extracten onder alle omstandigheden

De drie kandidaat indicator-antigenen (64 kD, 56 - 57 kD en 51 - 52 kD) staan vermeld in tabel 8. Aangegeven is op welk tijdstip in alle vier de kweekomstandigheden (22 °C, 30 °C, hoge en lage Aw) het antigeen werd aangetoond. Verder is aangegeven of er een allergenen (X) aangetoond werden in de verschillende extracten.

Het 64 kD kandidaat indicator-antigeen werd in de kweek van 22 °C, lage Aw, aangetoond van dag 11 tot en met dag 21, het 56 - 57 kD kandidaat indicator-antigeen van dag 2 tot en met dag 21 met uitzondering van dag 4, 7 en 16 en het 51 - 52 kD kandidaat indicator-antigeen werd alleen op dag 21 aangetoond. Allergenen (X) werden aangetoond van dag 2 tot en met dag 21.

Bij de kweek van 30 °C, lage Aw, werd het 64 kD kandidaat indicator-antigeen aangetoond op dag 9, het 56 - 57 kD kandidaat indicator-antigeen van dag 2 tot en met dag 21. Het 51 - 52 kD kandidaat indicator-antigeen werd aangetoond op de dagen 2, 4, 9, 14 en 18.

Allergenen (X) werden aangetoond vanaf dag 2.

De 64 kD en 56 - 57 kD kandidaat indicator-antigenen in de kweek van 22 °C, hoge Aw, werden aangetoond van dag 7 tot en met dag 21. Het 51 - 52 kD kandidaat indicator-antigeen werd alleen op dag 7 aangetoond.

Bij de kweek van 30 °C, hoge Aw, werd het 64 kD kandidaat indicator-antigeen aangetoond op dag 7. De 56 - 57 kD en 51 - 52 kD kandidaat indicator-antigenen werden aangetoond van dag 7 tot dag 18. In deze kweken bij hoge Aw werden allergenen (X) aangetoond vanaf dag 9.

4.9. Overige antigenen in WS extracten bij 22 °C

Twee antigenen (79 - 80 kD en 71 kD) werden aangetoond bij hoge en lage Aw bij 22 °C (tabel 9). Het 79 - 80 kD antigeen werd bij lage Aw alleen op dag 11 aangetoond. Bij hoge Aw werd dit antigeen aangetoond van dag 7 tot en met dag 21. Het 71 kD antigeen werd bij lage Aw aangetoond van dag 14 tot en met dag 21. Bij hoge Aw werd dit antigeen aangetoond op de dagen 7, 9, 16, 18 en 21. Allergenen (X) werden bij beide AW's aangetoond vanaf dag 9 en bij de lage Aw ook nog op dag 2.

4.10. Overige antigenen in WS extracten bij 30 °C

In totaal werden zes antigenen aangetoond bij zowel hoge als lage Aw (tabel 10). Bij lage Aw werd een antigeen van 91 kD, met uitzondering van dag 14 en dag 16, van dag 2 tot en met dag 21 aangetoond. De overige antigenen van 217 - 240 kD, 106 - 107 kD, 100 - 104 kD, 95 kD en 88 - 89 kD werden slechts op enkele dagen van de kweek aangetoond. Bij hoge Aw werden de overige antigenen bijna geheel van dag 4 tot en met dag 21 aangetoond (met uitzondering van het 106 - 107 kD en 88 - 89 kD antigeen). Allergenen werden aangetoond bij lage Aw vanaf dag 2 en bij hoge Aw vanaf dag 9 en zijn in de tabel aangegeven met een X.

5 Discussie/Evaluatie

Bij de interpretatie van de resultaten is apart gekeken naar CF extracten en WS extracten. Dit werd gedaan omdat het met de gehanteerde methoden niet mogelijk is na te gaan of gelijke molecuulgewichten in CF en WS ook daadwerkelijk duiden op identieke moleculen.

Bij de overgang van moleculen van de binnenkant van de cel (inhoud van het mycelium, WS) naar de buitenkant van de cel (cultuurvloeistof, CF) kunnen stukken aan de moleculen vastgemaakt of worden verwijderd, waardoor het molecuulgewicht verandert.

Daarnaast is bij de interpretatie van de resultaten enerzijds gekeken naar alle onderzochte omstandigheden (22 °C en 30 °C, hoge en lage Aw) anderzijds is zowel apart naar de experimenten bij 22 °C hoge en lage Aw als apart naar de experimenten bij 30 °C hoge en lage Aw gekeken. De resultaten van de experimenten werden elk apart bekeken omdat 22 °C hoge en lage Aw omstandigheden zijn die de gemiddelde en meest vóórkomende binnenhuis-omstandigheden het dichtst benaderen. Terwijl 30 °C hoge en lage Aw omstandigheden zijn die met enige regelmaat voorkomen (denk bijvoorbeeld aan badkamers met zeer wisselende omstandigheden qua temperatuur en luchtvochtigheid).

5.1. Indicator-antigenen onder alle omstandigheden.

In principe is het voorkomen van antigenen in het CF cumulatief. Dit betekent dat als bijvoorbeeld een antigeen vanaf dag 2 geproduceerd is deze in de rest van de kweek afhankelijk van de stabiliteit ook aanwezig kan zijn. Maar in de verschillende kweken is te zien dat op sommige dagen wel en op andere dagen niet een bepaald antigeen aangetoond wordt. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat antigenen wel aanwezig maar niet zichtbaar gemaakt kunnen worden (concentraties liggen net onder het detectie niveau) of afgebroken worden of vervallen tijdens het voortschrijden van de kweekduur.

Bij de kweken van 22 °C komen antigenen in het CF al vanaf dag 0 voor. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat deze antigenen tijdens het ontkiemen naar de buitenkant van de spore of hyfe gebracht worden en zo dus al op de dag van enten in de kweek aangetroffen kunnen worden.

5.1.1 CF extracten

Nadat alle vier de verschillende kweek omstandigheden met elkaar vergeleken waren, konden drie indicator-antigenen (68 , 57 – 57.5 en 55 - 54 kD) aangegeven worden die onder alle omstandigheden werden aangetoond (tabel 1 en 5). Bij de 22 °C, lage Aw kweek, werd een

aantal antigenen later in de tijd aangetoond dan allergenen. Het 68 kD antigeen werd bij de lage Aw kweken bij zowel 30 °C als 22 °C slechts op enkele dagen aangetoond en later dan dat er allergenen aangetoond werden. Bij hoge Aw werd dit antigeen bij 22 °C gelijktijdig met de aanwezigheid van allergenen aangetoond. De antigenen van 57 – 57.5 en 54 – 55 kD werden in 3 van de 4 kweekomstandigheden slechts op enkele dagen aangetoond, terwijl over een veel langere periode allergenen werden aangetoond.

Op grond van het feit dat onder 3 van de 4 kweekomstandigheden de 3 kandidaat indicator-antigenen niet te gelijker tijd of slechts sporadisch te gelijker tijd voorkwamen met allergenen moet geconcludeerd worden dat op grond van de definitie van indicator-antigeen (voernoot pagina 8) geen van deze antigenen geschikt is als indicator.

5.1.2. WS extracten

In de WS extracten werden drie antigenen (64, 56 - 57 en 51 - 52 kD) onder alle vier de omstandigheden aangetoond (tabel 8). Het 64 kD indicator-antigeen lijkt niet geschikt als indicator-antigeen. Ten eerste werd dit antigeen bij de lage Aw kweken later aangetoond dan dat er allergenen aangetoond werden. Ten tweede werd dit antigeen bij de 30 °C kweken slechts op één enkele dag aangetoond. Ook het 51 - 52 kD antigeen lijkt niet geschikt als indicator-antigeen. Dit antigeen wordt slechts op enkele dagen en pas na verloop van tijd in kweek aangetoond. Alleen het 56 - 57 kD antigeen lijkt bruikbaar als indicator aangezien dit antigeen regelmatig voorkomt en vroeg in de kweek geproduceerd is vóór of op hetzelfde tijdstip, dat er allergenen in de extracten werden aangetoond.

5.2 Index-antigeen

Onder 5.1 is aangegeven dat geen indicator-antigenen onder alle omstandigheden gevonden konden worden in het CF extract. Bij vasthouden aan de strikte definitie van indicator antigeen (een antigeen dat onder alle kweekomstandigheden voorkomt voor of op het tijdstip van allergeenproductie) moet geconcludeerd worden dat er geen indicator-antigenen gevonden kunnen worden waarmee blootstelling aan (allergenen van) *A. alternata* vastgesteld zou kunnen worden. Echter, kijkend naar het voorkomen van het 54 - 55 kD antigeen bij de 30 °C kweken in tabel 5 en het voorkomen van het 35 kD en 32 - 33 kD antigenen bij de 22 °C kweken in tabel 6 zou gezegd kunnen worden dat deze drie antigenen

als index-antigenen³ aangemerkt zouden kunnen worden. Het 54 - 55 kD antigeen komt zowel bij de hoge als lage Aw kweek bij 30 °C vroeg in de kweek voor en wordt voor of op hetzelfde tijdstip teruggevonden als dat er allergenen gevonden werden. De 35 kD en 32 - 33 kD antigenen worden bij zowel hoge als lage Aw bij 22 °C laat in de kweek geproduceerd (vanaf dag 9) en zijn aanwezig voor of op hetzelfde tijdstip als dat er allergenen aanwezig zijn. Deze drie CF index-antigenen te samen komen dus voor onder alle vier de kweekomstandigheden.

5.3. Overeenkomstige allergenen in de 22 °C hoge en lage Aw en 30 °C hoge en lage Aw

In de kweek van 22 °C bij hoge Aw werden veertien allergenen aangetoond en in de kweek bij lage Aw zeven (tabel 3). Bij de kweek van 30 °C werden bij hoge Aw dertien en bij lage Aw vijftien allergenen aangetoond. De in dit onderzoek gehanteerde lage Aw (0,96) is voor binnenhuisbegrippen nog hoog te noemen. Echter, de uitgangspunten voor de uitgevoerde experimenten waren duidelijk: de lage Aw was die waarde waarbij nog ontkieming van de sporen en uitgroei van het mycelium konden plaatsvinden. In het binnenhuismilieu kan de Aw (of anders genoemd, de relatieve vochtigheid) aanmerkelijk lager liggen. Echter, door Adan (10) is aangetoond dat korte perioden van veel beschikbaar vocht, welke ook kunnen optreden bij verder lage luchtvochtigheid, voldoende zijn om schimmels metabolisch actief te houden. Het risico op het voorkomen van allergenen blijft hierdoor bestaan.

Voor wat betreft het voorkomen van allergenen kunnen een aantal zaken naar voren worden gehaald:

- In de kweek bij 22 °C en hoge Aw trad in de loop van de tijd nauwelijks verval van de cultuur op. De antigenen en allergenen in de CF extracten, waren dus stoffen die actief werden uitgescheiden. Bij de kweken van 30 °C trad in de loop van de tijd verval van de cultuur op. Bij 30 °C en hoge Aw begon de cultuur na circa 11 dagen te vervallen. Vanaf het begin van het afsterven van een cultuur is het niet meer zeker dat alle aangetoonde antigenen en allergenen in het CF daadwerkelijk actief zijn uitgescheiden of dat ze voorkomen in de cultuurvloeistof door verval van het mycelium.

³ index-antigenen zijn antigenen die bij één temperatuur bij zowel hoge als lage Aw voor of op het tijdstip van allergene productie geproduceerd worden.

- Voor wat betreft het aantal allergenen dat voorkomt bij de verschillende kweken bij hoge en lage Aw kan opgemerkt worden dat het aantal allergenen voorkomend in de CF extracten van de kweken bij 30 °C, hoge en lage Aw ongeveer gelijk is. Het aantal allergenen in de hoge Aw kweek van 22 °C is twee keer zo groot als het aantal allergenen in de lage Aw kweek bij 22 °C (tabel 3). In de WS extracten van de 30 °C kweken komen bij lage Aw drie keer zoveel allergenen voor als bij hoge Aw. Voor de 22 °C kweken zijn deze aantallen ongeveer gelijk (tabel 4).
- Met uitzondering van de lage Aw kweek bij 22 °C, is de hoeveelheid van aanwezige allergenen in de WS extracten groter dan het aantal allergenen in de CF extracten van dezelfde kweek. Het aantal actief uitgescheiden allergenen is over het algemeen dus kleiner dan het aantal allergenen dat in het mycelium voorkomt
- Het feit dat de meeste allergenen voorkomen bij 22 °C en in de WS extracten (tabellen 3 en 4) kan inhouden dat het risico op blootstelling aan allergenen van *A. alternata* het grootst is bij kamertemperatuur en veroudering en het daarmee samenhangend verval van de schimmel.

In de inleiding is melding gemaakt van zogenaamde “major allergens”, allergenen die onder optimale omstandigheden in een schimmelkweek tot expressie komen en die veelvuldig leiden tot het voorkomen van IgE gericht tegen deze allergenen bij groepen van patiënten met allergische aandoeningen. In deze discussie is niet ingegaan op het voorkomen van deze “major allergens” in de hier beschreven experimenten. Uitgangspunt voor deze onderzoeken was namelijk of er met behulp van indicator antigenen een correlatie gelegd kon worden met het voorkomen van allergenen en dus met het risico aan allergenen te worden blootgesteld. Het was geenszins de bedoeling na te gaan of de zogeheten “major allergens” eveneens aantoonbaar waren in de door ons geproduceerde extracten. Daarvoor lenen deze resultaten zich ook niet, aangezien voor de detectie van allergenen slechts één serum is gebruikt en niet een aantal verschillende of een “pool”-serum. Uit de resultaten blijkt dat er voor *Alternaria* sprake kan zijn van indicator / index-antigenen en dat deze gerelateerd kunnen worden aan het voorkomen van allergenen.

Gesteld moet worden dat de hier gepresenteerde resultaten alleen betrekking hebben op onderzoek uitgevoerd in het laboratorium onder kunstmatig gecreëerde omstandigheden met alle beperkingen van dien.

Voor de waarde van de door ons gevonden indicator / index-antigenen voor allergene blootstelling dient nog nagegaan te worden of de gevonden indicator / index-antigenen en het daaraan gekoppelde voorkomen van allergenen, ook gevonden kunnen worden in

stofmonsters van beschimmelde woningen en of bij kwantificeren van de indicator / index-antigenen er een relatie gelegd kan worden met het voorkomen van schimmel-allergieën bij de bewoners van beschimmelde woningen. De gebruikte benadering in dit onderzoek, i.e. inventariseren van antigenen welke als indicator voor allergene blootstelling kunnen dienen, zou, om schimmelblootstelling in de Nederlandse situatie in relatie tot gezondheidsproblemen te kunnen bestuderen zou in principe, nog toegepast moeten worden voor *Cladosporium*. Onderzoek naar indicatoren voor *Penicillium*, een van de vier belangrijkste schimmels in het binnenhuismilieu, hoeft op grond van de grote verwantschap met *Aspergillus* niet te worden uitgevoerd. Hoewel nog praktijkmonsters moeten worden getest laten de resultaten in dit rapport zien dat het met behulp van indicatoren / indices mogelijk is te bepalen of er in het binnenhuismilieu risico bestaat op de aanwezigheid van en blootstelling aan *A. alternata* en door *A. alternata* geproduceerde producten waaronder allergenen.

6 Conclusie

Uit het verrichte onderzoek, zoals beschreven in dit rapport, bleek dat er indicator / index-antigenen gevonden konden worden wanneer *Alternaria alternata* werd gekweekt onder verschillende laboratorium omstandigheden qua temperatuur en wateractiviteit. Zulke indicator / index-antigenen kunnen mogelijk gebruikt worden om blootstelling aan allergenen, aan *A. alternaria* gerelateerd, in het binnenhuismilieu te kunnen vaststellen. Deze indicator antigenen kunnen tevens gebruikt worden om de mogelijke totale blootstelling aan de schimmel(producten) (van) *A. alternaria* vast te stellen. Onderzoek naar de bruikbaarheid van deze indicator antigenen in praktijkmonsters moet nog worden uitgevoerd. Om de relatie tussen schimmelblootstelling in het binnenhuismilieu en het optreden van schimmel allergenen in bijvoorbeeld het PIAMA project te kunnen bestuderen is het nodig ook nog voor minimaal *Cladosporium* indicator antigenen te karakteriseren. Karakterisatie van indicator-antigenen voor *Aspergillus fumigatus* staat reeds beschreven in RIVM rapport nr. 257852 001.

7 Tabellen

Tabel 1. *Molecuulgewichten (MW) van antigenen in CF-extracten plus overeenkomsten.*

1)*	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)
Aw	hoog	hoog	laag	laag		overeenkomstige allergenen		
Temp	30 °C	22 °C	30 °C	22 °C		22°C en 30°C	22°C	30°C
	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	gem. MW (kiloDalton)	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw
	260021			261664	260-261			
		239328			239			
	186258	195968		186812	187-196		X	
				175102	175			
	168749	163836			164-169			
		147257			147			
				129933	128-130			
	126801	126240			126-127			
		121556			122			
		103599	103906		104			
		102483		101943	102		X	
	100193			100125	100			
		97623		96926	97-98		X	
		95788	96116		96			
	94154	93059		94064	93-94		X	
		90455	92298	91385	90-92		X	
		89569			89.5			
		87285	87838	88368	87-88		X	
	85387		85282		85			X
	83443	84469			83-84			
	82315	82620			82-82.5			
	81189	80961			81			
	78031	78425			78			
		76898			77			
	73979	74962			74-75			
	73525	72849			73-73.5			
		71709	72393		72			
	68316	68142	68934	68331	68	X	X	X
		65396	65616		65-66			
		64445		64485	64		X	
	62809		63162		63			X
		61398		61452	61		X	
		60856			60.5			
	59441	58316			58-59			
	57767	57141	57852	57521	57-57.5	X	X	X
	54550	54194	53913	54263	54-55	X	X	X
		53665			53.5-54			
	51477	51342			51			
	50448	50786			50-50.5			
		49826		49834	49.8		X	
	48165	48339	48458		48			X
	46285	46631			46-47			
	43088	44413		44698	43-45		X	
	43230	43249	43145		43			X
	43049	42087		42176	42-43		X	
		41401	40937	41527	41-42		X	
			40225		40			
		39757	39781	39502	39.5-40		X	
	39398	39276			39			
	38622			38492	38-39			
		37998		37440	37-38		X	
	35795	35900		36233	36		X	
	34987	35447		35422	35		X	
		33283			33			
	32706	32836		32297	32-33		X	
	31554	31354		31780	31-32		X	
		30499			30			
	28434				28.4			
	28257				28.2			
	26419				26			
	24591				25			
n =	35	49	16	26		3	21	7

*= kolomnummer

Tabel 2. Molecuulgewichten (MW) van antigenen in WS-extracten plus overeenkomsten.

1)*	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)
Aw	hoog	hoog	laag	laag		overeenkomstige allergenen		
Temp	30 °C	22 °C	30 °C	22 °C		22°C en 30°C	22°C	30°C
	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	gem. MW (kiloDalton)	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw
	216746		240023		217-240			X
			193448		193			
			173685		174			
		166748			167			
		164905			165			
	149926	153323			150-153			
		147143	146071		146-147			
		137346			137			
		134173			134			
		132523	133228		133			
		130026	128663		129-130			
	125737	122085			122-126			
		115854			116			
		113466			113			
		109042			109			
	105742		106742		106-107			X
	99773		103627		100-104			X
			97811		98			
		96587	96937		97			
	95111	95128	95229		95			X
		93370			93			
		92806	92876		92.8			
	91197		91101		91			X
	89915	90236			90			
	88810	88069	88335		88-89			X
		85371			85			
		84782	84732		84.7			
	84489	84358			84			
		82686			83			
		81392	80886		81			
		79080		80495	79-80		X	
		78838			78.8			
		76592	76824		77			
		74036			74			
		72537	72711		73			
		71146		71458	71		X	
		69154	69450		69			
		67273			67			
			65661		66			
	64153	63945	64295	64466	64	X	X	X
			62721		63			
		60846	60624		61			
	59743	59806			60			
	56378	56552	57106	57151	56-57	X	X	X
	53524	54196	53809		54			X
		52950			53			
	51336	52656	51127	51635	51-52	X	X	X
	50120			50325	50			
		48471			48.4			
		48248			48.2			
		47505	47067		47-48			
		44574	44112		44-45			
			43101	42758	43			
		40718	41131		41			
		40500	40074		40			
		36671	38235		37-38			
		36182	36588		36-37			
			35637		36			
		33134			33			
		32583	32606		32.5-33			
		30732	31959		31-32			
		28376			28			
		26142			26.1			
		25708			25.7			
		24265			24.2			
		24114			24.1			
n =	16	54	36	7		3	5	10

* = kolomnummer

Tabel 3. *Molecuulgewichten (MW) van allergenen in CF-extracten plus overeenkomsten.*

1)*	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)
Aw	hoog	hoog	laag	Laag		overeenkomstige allergenen		
Temp	30 °C	22 °C	30 °C	22 °C		22°C en 30°C	22°C	30°C
	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	gem. MW (kiloDalton)	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw
				226539	227			
			203269	205159	203-204			
			171328		171			
			114968		115			
	108114		108529		108-109			X
	97815				98			
	93513			94353	94			
	90199			91716	90-92			
	88971				89			
		86872			87			
	83414		82701	83394	83			X
		80453	81829		80-82			
		79070			79			
		77059			77			
			73961	73107	73-74			
			71848		72			
			69651		70			
	62915				63			
	54554				55			
	50828	51184			51			
	50150				50			
	49272	49173			49			
		47489			47			
		46296			46			
	42836	44779	43610	44072	43-45	X	X	X
			41432		41			
	40115		40138		40.1			X
			40013		40			
		32615			33			
		31031			31			
		30538	30695		30.5-30.6			
		29081	29848		29-30			
		27735			28			
n =	13	14	15	7		1	1	4

* = kolomnummer

Tabel 4. *Molecuulgewichten (MW) van allergenen in WS-extracten plus overeenkomsten*

1)*	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)
Aw	hoog	hoog	laag	laag		overeenkomstige allergenen		
Temp	30 °C	22 °C	30 °C	22 °C		22°C en 30°C	22°C	30°C
	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	MW (Dalton)	gem. MW (kiloDalton)	hoge en lage Aw	hoge en lage Aw	Hoge en lage Aw
		170614			171			
		165550			166			
		153904			154			
		144419		146392	144-146		X	
		133916			134			
		132529		130368	130-133		X	
		125008			125			
		115453		115551	115		X	
		113403			113			
			108126		108			
		102735			103			
		96741	97984	97971	97-98		X	
		96268			96			
		93306			93			
		92422			92			
			89810	90322	90			
		87438			87			
	86256				86			
		84323			84			
		83293			83			
		82054	80319		80-82			
	74809			76065	75-76			
				72153	72			
	68564				69			
		66420			66			
		64821			64			
	62326		62344	61641	62			X
				61056	61			
			59215		59			
			56474		56			
		54124		54104	54		X	
		53095			53			
		52682	51624	52463	52-52.5		X	
		50183		51455	50-51		X	
		49114	49573	49692	49.1-49.5		X	
			48687		49			
			47012		47			
			46616	46003	46-46.5			
			44292		44			
			43121		43			
			41573	42003	42			
			40243		40			
			39602		39.6			
			38867	38916	39			
	34624			36333	35-36			
	32871			33162	33			
			29688		30			
		28054	28441	28335	28.1-28.3		X	
			27949	27527	28			
			26489		26.5			
			26213		26			
n =	6	26	24	20		0	9	1

*= kolomnummer

5

[illegible]

Tabel 6. *Correlatie tussen voorkomen overige antigenen en allergenen in CF-extracten van de kweken bij 22 °C lage en hoge Aw.*

dag →	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
187-196 kD antigeen in 22 °C lage Aw		+			+		+	+		
102 kD antigeen in 22 °C lage Aw		+					+			
97-98 kD antigeen in 22 °C lage Aw		+			+					
93-94 kD antigeen in 22 °C lage Aw		+					+			
90-92 kD antigeen in 22 °C lage Aw		+			+		+	+		
87-88 kD antigeen in 22 °C lage Aw					+					
64 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
61 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
49.8 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
43-45 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
42-43 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
41-42 kD antigeen in 22 °C lage Aw									+	+
39.5-40 kD antigeen in 22 °C lage Aw							+	+	+	+
37-38 kD antigeen in 22 °C lage Aw							+			
36 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
35 kD antigeen in 22 °C lage Aw							+			
32-33 kD antigeen in 22 °C lage Aw								+		
31-32 kD antigeen in 22 °C lage Aw							+			
voorkomen allergenen bij 22 °C lage Aw							X	X		
187-196 kD antigeen in 22 °C hoge Aw		+	+	+	+					+
102 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+									
97-98 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+	+	+		+				+	+
93-94 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+	+	+	+	+					
90-92 kD antigeen in 22 °C hoge Aw		+			+					
87-88 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+	+	+	+	+		+			
64 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+	+	+		+					
61 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+			+	+	+	+			
49.8 kD antigeen in 22 °C hoge Aw					+	+				
43-45 kD antigeen in 22 °C hoge Aw					+			+		
42-43 kD antigeen in 22 °C hoge Aw					+		+		+	
41-42 kD antigeen in 22 °C hoge Aw					+					
39.5-40 kD antigeen in 22 °C hoge Aw	+	+	+	+						
37-38 kD antigeen in 22 °C hoge Aw								+		
36 kD antigeen in 22 °C hoge Aw		+	+	+			+			
35 kD antigeen in 22 °C hoge Aw					+	+	+		+	
32-33 kD antigeen in 22 °C hoge Aw						+				+
31-32 kD antigeen in 22 °C hoge Aw								+		
voorkomen allergenen bij 22 °C hoge Aw					X	X	X	X	X	X

Tabel 7. *Correlatie tussen voorkomen van overige antigenen en allergenen in CF-extracten van de kweken bij 30 °C, lage en hoge Aw.*

dag →	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
85 kD antigeen in 30 °C lage Aw			+		+					
63 kD antigeen in 30 °C lage Aw										+
48 kD antigeen in 30 °C lage Aw										+
43 kD antigeen in 30 °C lage Aw						+	+	+	+	+
voorkomen allergenen bij 30 °C lage Aw					X	X	X	X	X	X
85 kD antigeen in 30 °C hoge Aw		+	+	+	+	+	+	+	+	+
63 kD antigeen in 30 °C hoge Aw			+	+	+	+	+	+	+	+
48 kD antigeen in 30 °C hoge Aw					+		+	+		
43 kD antigeen in 30 °C hoge Aw				+						
voorkomen allergenen bij 30 °C hoge Aw		X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabel 8. *Correlatie tussen voorkomenkandidaat indicator-antigenen en allergenen in WS-extracten van de kweken onder alle omstandigheden.*

dag →	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
64 kD antigeen in 22 °C lage Aw						+	+	+	+	+
56 – 57 kD antigeen in 22 °C lage Aw		+			+	+	+		+	+
51 – 52 kD antigeen in 22 °C lage Aw										+
voorkomen allergenen bij 22 °C lage Aw		X			X	X	X	X	X	X
64 kD antigeen in 30 °C lage Aw					+					
56 – 57 kD antigeen in 30 °C lage Aw		+	+	+	+	+	+	+	+	+
51 – 52 kD antigeen in 30 °C lage Aw		+	+		+		+		+	
voorkomen allergenen bij 30 °C lage Aw		X	X	X	X	X	X	X	X	X
64 kD antigeen in 22 °C hoge Aw				+	+	+	+	+	+	+
56 – 57 kD antigeen in 22 °C hoge Aw				+	+	+	+	+	+	+
51 – 52 kD antigeen in 22 °C hoge Aw				+						
voorkomen allergenen bij 22 °C hoge Aw					X	X	X	X	X	X
64 kD antigeen in 30 °C hoge Aw				+						
56 – 57 kD antigeen in 30 °C hoge Aw				+	+	+	+	+		
51 – 52 kD antigeen in 30 °C hoge Aw				+	+	+	+	+		
voorkomen allergenen bij 30 °C hoge Aw					X	X	X	X	X	X

Tabel 9. *Correlatie tussen voorkomen van overige antigenen en allergenen in WS-extracten van de kweken bij 22 °C, lage en hoge Aw.*

dag →	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
79-80 kD antigeen in 22 °C lage Aw						+				
71 kD antigeen in 22 °C lage Aw							+	+	+	+
voorkomen allergenen bij 22 °C lage Aw		X			X	X	X	X	X	X
79-80 kD antigeen in 22 °C hoge Aw				+	+	+	+	+	+	+
71 kD antigeen in 22 °C hoge Aw				+	+			+	+	+
voorkomen allergenen bij 22 °C hoge Aw					X	X	X	X	X	X

Tabel 10. *Correlatie tussen voorkomen van overige antigenen en allergenen in WS-extracten van de kweken bij 30 °C, hoge en lage Aw.*

dag →	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
217-240 kD antigeen in 30 °C lage Aw		+		+						
106-107 kD antigeen in 30 °C lage Aw			+							
100-104 kD antigeen in 30 °C lage Aw			+							+
95 kD antigeen in 30 °C lage Aw							+			
91 kD antigeen in 30 °C lage Aw		+	+	+	+	+			+	+
88-89 kD antigeen in 30 °C lage Aw			+		+				+	
voorkomen allergenen bij 30 °C lage Aw		X	X	X	X	X	X	X	X	X
217-240 kD antigeen in 30 °C hoge Aw				+	+	+	+	+	+	+
106-107 kD antigeen in 30 °C hoge Aw			+			+				
100-104 kD antigeen in 30 °C hoge Aw			+	+	+	+	+	+	+	+
95 kD antigeen in 30 °C hoge Aw			+	+	+	+	+	+	+	+
91 kD antigeen in 30 °C lage Aw			+	+	+	+	+			+
88-89 kD antigeen in 30 °C lage Aw				+						
voorkomen allergenen bij 30 °C hoge Aw					X	X	X	X	X	X

Literatuur

1. Gezondheidsraad, Advies no. 1992/01
2. Platts Mills T.A.E. en Weck A.L. de Dust mite allergens and asthma - A world wide problem J Allergy Clin Immunol 1989; 83: 416-427
3. Verhoeff A.P. Home dampness, fungi and house dust mites, and respiratory symptoms in children. Proefschrift, Rotterdam 1994; juni
4. Notermans S. en Kamphuis H. Detection of moulds in food by latex agglutination: a collaborative study. Food Agric Immunol 1990; 2: 37-46
5. Longbottom J.L. Allergens of *Aspergillus fumigatus*: Identification and characterization of components combining with specific IgE antibody. Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale A 1986; 261: 503-508
6. Achatz G. et al. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. Molecular Immunology. Vol 32, No. 3, pp.213-217, 1995
7. Zhang L. et al N-Terminus of a Major Allergen, *Alt a 1*, of *Alternaria alternata* defined to be an epitope. Int. Arch Allergy Immunology 1995; 108: 254-259
8. Curran I. H. A. et al. Purification and Characterization of Alt a-29 from *Alternaria alternata*. Int. Arch Allergy Immunology 1993; 102: 167-275
9. Hansen M.Y. et al. Allergens in *Aspergillus fumigatus* 1. Characterization of two different allergen extracts and evaluation of their stability and the importance of carbohydrate for IgE binding. Allergy 1994; 49(4): 235-241
10. Adan O.C.G. On the fungal defacement of interior finishes. Proefschrift, Eindhoven 1994; december
11. Reenen-Hoekstra E.S. et al. Detection and identification of moulds in Dutch houses and non-industrial working environments. Grana 1991; 30(2): 418-423

12. Kauffman H.F. et al. Standardization of allergenic extracts of *Aspergillus fumigatus*. Liberation of IgE-binding components during cultivation. Int Arch Allergy Appl Immunol 1985; 76: 168-173
13. Towbin H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc Natl Acad Sci 1979; 76(9): 4350-4354
14. Hoog G.S.de en Guarro J. Atlas of clinical fungi. 1e druk, Baarn: Centraal Bureau voor Schimmelcultures, 1995: p.35
15. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275
16. Dubois M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956; 28(3): 350-356
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227 : 680-685
18. Morrissey J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal Biochem 1981; 117: 307-310.
19. Wilson E.V. en Hearn V.M. Use of *Aspergillus fumigatus* mycelial antigens in enzyme-linked immunosorbent assay and counter-immuno electrophoresis. J Med Microbiol 1983; 16: 97-105
20. Notermans S. en Soentoro P.S.S. Immunological relationship of extra-cellular polysaccharide antigens produced by different mould species. Antonie van Leeuwenhoek 1986; 52: 393-401

Bijlage 1 Verzendlijst

- A. Hoofdinspecteur voor de Gezondheidszorg, J.Verhoeff.
Algemeen Hoofdinspecteur van de Inspectie Gezondheidsbescherming, Waren en
Veterinaire zaken (IWV), F.Schuring
- B. Voorzitter van de Gezondheidsraad, Prof. J.J. Sixma Postbus 1236, 2280 CE Rijswijk.
- C. Hoofd Accountsectie Veterinair, IWV, H.Verburg
Hoofd Accountsectie Food, IWV, M.W.J. Wolfs
Directie Gezondheidsbeleid, Mr.S.van Hoogstraten
Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, H.J.Schneider
Drs. G.Hoeben, DGB
Drs. J.K.van Wijngaarden, IGZ
Drs. J.T. Jansen, IWV
Dr. J.H.M.Nieuwenhuijs, IWV
Dr. G.Doekes, LUW
Dr. S.van der Heide, AZG
Prof. Dr. J.E.M.H. van Bronswijk, TUE
Dr.R.Samson, Voorzitter Werkgroep Schimmels, Sectie Levensmiddelenmicrobiologie
NVVM.
- D. Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie, [Antwoordnummer 13018,
2501 VC Den Haag
- E. Directie RIVM
- F. Prof. Dr. Ir. D.Kromhout, SB2
Dr. Ir. A.M. Henken, MGB
Dr. Ir. H.A.Smit, CCM
- G. Auteur(s)
- H. SBD/Voorlichting & Public Relations Bureau Rapportenregistratie
- I. Bibliotheek RIVM
- J. Bureau Rapportenbeheer
- K. Reserve exemplaren