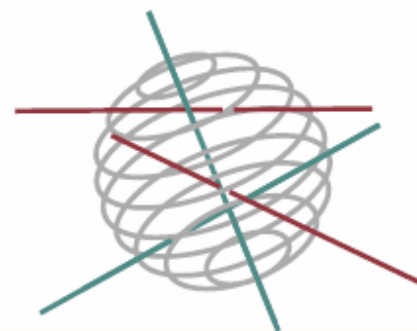


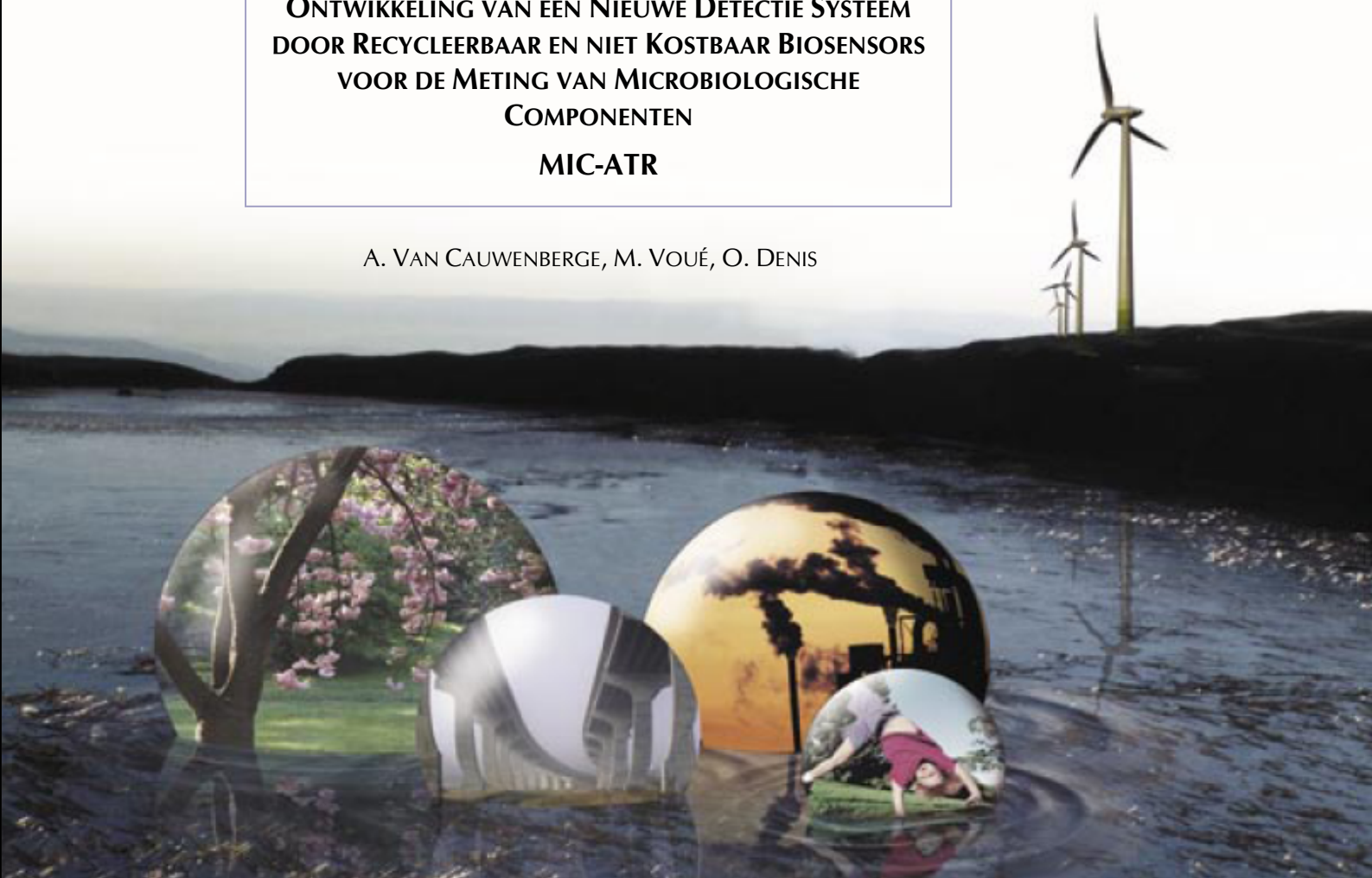
SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**ONTWIKKELING VAN EEN NIEUWE DETECTIE SYSTEEM
DOOR RECYCLEERBAAR EN NIET KOSTBAAR BIOSENSORS
VOOR DE METING VAN MICROBIOLOGISCHE
COMPONENTEN
MIC-ATR**

A. VAN CAUWENBERGE, M. VOUÉ, O. DENIS



ENERGY 

TRANSPORT AND MOBILITY 

AGRO-FOOD 

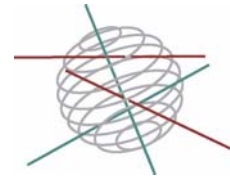
HEALTH AND ENVIRONMENT 

CLIMATE 

BIODIVERSITY   

ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS   

TRANSVERSAL ACTIONS 



Gezondheid & Milieu



EINDVERSLAG FASE 1
SAMENVATTING

**ONTWIKKELING VAN EEN NIEUWE DETECTIE SYSTEEM DOOR
RECYCLEERBAAR EN NIET KOSTBAAR BIOSENSORS VOOR DE
METING VAN MICROBIOLOGISCHE COMPONENTEN
MIC-ATR**

SD/HE/04A

Promotoren

Dr. E. Noel & Dr. A. Van Cauwenberge

Hainaut Vigilance Sanitaire (Hygiène Publique en Hainaut)
Boulevard Saintelette, 55
B-7000 MONS

Prof. J. De Coninck & Prof. M. Voué

Université de Mons
Centre de Recherche en Modélisation Moléculaire
Place du Parc, 20
B-7000 MONS

Dr. K. Huygen & Dr. O. Denis

ISP-WIV
Département Institut Pasteur de Bruxelles
Unité d'Allergologie
Engelandstraat, 642
1180 BRUXELLES

Auteurs

A. Van Cauwenberge

M. Voué

O. Denis



SAMENVATTING

De aanwezigheid van schimmels in woningen is een belangrijke zorg voor de volksgezondheid. Ze kunnen immers grote gezondheidsproblemen veroorzaken. Schimmels komen voor in 60% van de woningen en kunnen in die woningen uiterst gevaarlijke verbindingen vrijgeven. Blootstelling aan die stoffen wordt trouwens gekoppeld aan ernstige ziektebeelden zoals allergische reacties, astma en longbloedingen, die dodelijk kunnen zijn. Volgens het Wetenschappelijk Instituut van Volksgezondheid lijdt 4% van de Belgische bevolking aan astma en dat cijfer is niet meer veranderd tussen 2001 en 2004. Het is dus wel degelijk een belangrijk probleem voor de overheden die in dit land bevoegd zijn voor volksgezondheid en woninghygiëne.

Een van de bestanddelen van schimmels zijn de sporen. Die komen vrij in de atmosfeer en liggen aan de basis van talloze allergieën van de luchtwegen. Onder de juiste temperatuur- en vochtigheidsomstandigheden kunnen schimmels gedijen op voedingsbodems die in de meeste woningen aanwezig zijn. Net daarom zijn hun sporen meestal in het huisstof terug te vinden.

Meer dan 80 schimmelsoorten worden in verband gebracht met allergiesymptomen van de luchtwegen, waaronder *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* en *Aspergillus*.

Onder de stoffen die schimmels produceren, onderscheiden we vier grote groepen: VOS (vluchtige organische stoffen), sporen, myceliumfragmenten en mycotoxinen. Dit zijn secundaire, uiterst stabiele metabolieten die niet of amper vluchtig zijn. De gevaarlijkste soorten voor woningvervuiling behoren tot de familie van de aflatoxinen en de trichothecenen.

Het is trouwens bijzonder moeilijk om een direct verband aan te tonen tussen de aanwezigheid van deze verbindingen in het milieu en een ziektebeeld. Precaire woonomstandigheden waarbij vochtigheid de ontwikkeling van schimmels bevordert, is één van de belangrijkste oorzaken van astma. Bij een visuele inspectie wordt het probleem jammer genoeg vaak niet vastgesteld. Het risico verbonden met schimmels wordt het beste afgebakend door de aanwezigheid van mycotoxinen in de omgevingslucht te meten.

De kwalitatieve en kwantitatieve detectiemethoden zijn echter vooral voor voedingsmiddelen ('food and feed') ontwikkeld. Die sector beschikt over betrouwbare en voldoende gevoelige methoden. In die context is het verband tussen het verbruik van producten die besmet zijn door mycotoxinen, en de uitbraak van een pathologie directer en konden drempelwaarden voor het toegestane gehalte van deze bestanddelen in de voeding in normen en regels worden vastgelegd. Dergelijke limieten konden echter nog niet worden vastgelegd voor de mycotoxinen in de binnenlucht bij gebrek aan testresultaten en geschikte monsternemingen en detectiemethoden.

De tot nog toe uitgevoerde studies richten zich op ruwe materialen of stofafzettingen in woningen, maar de gegevens voor de volksgezondheid over de bovengenoemde pathologie tonen aan dat er ook nood is aan specifieke, gevoelige technieken waarmee de hoeveelheid macrocyclische trichothecenen in de binnenlucht kan worden gemeten.

Daarom stellen wij voor om deze problemen aan te pakken en een goedkope, regenererbare sensor op basis van FTIR/ATR-spectroscopie te ontwikkelen, die zeer gevoelig en selectief is. De biosensor gebruikt optische, transparante elementen in het infraroodspectrum, die via vochtige weg met chemische methoden worden gewijzigd om de koppeling van moleculaire receptoren mogelijk te maken, in het bijzonder monoklonale antilichamen (ratten of muizen) tegen macrocyclische trichothecenen.

Daarvoor werd bij HVS een Nicolet 380 FTIR-spectrometer opgesteld. De experimentele installatie bestaat uit een verticale ATR-cel van SPECAC die is verbonden met een peristaltische Watson-Marlow-pomp met een flux van 5 tot 50 μl per minuut. De kristallen van het FTIR-systeem zijn van germanium en hebben een trapeziumvorm ($50 \times 20 \times 2 \text{ mm}^3$, hoek van 45°). Ze werden in het laboratorium van de CRRM (universiteit van Bergen) functioneel gemaakt. Het volledige systeem werd door middel van twee soorten experimenten gevalideerd: het bepalen van het ethanolpercentage in waterige oplossingen en de gekoppelde verbinding van biotine met avidine op de FTIR-sensor. Met dit algemeen erkend systeem hebben we moleculen met een laag moleculair gewicht kunnen detecteren, zoals DNP, dat als uitgangsmiddel voor de detectie van haptenen heeft gediend. De resultaten van de 'klassieke' ELISA-test en van de FTIR waarbij 6 monoklonale antilichamen van een rat werden ingezet, werden met elkaar vergeleken. Alle antilichamen herkenden het gekoppelde DNP (DNP-HSA) op dezelfde manier, maar de gevoeligheid van de verschillende antilichamen verschilde voor de detectie van het vrije DNP. Voor het gekoppelde DNP lagen de detectielimieten voor de beide technieken tussen 5-15 ng/ml voor FTIR en 40 ng/ml voor ELISA. Voor het vrije DNP waren de limieten echter heel uiteenlopend: 1 $\mu\text{g/ml}$ voor ELISA en 4 ng/ml met de FTIR-techniek die gebruik maakte van het LO-DNP34-antilichaam en dus resultaten opleverde die vergelijkbaar waren met de detectie van het gekoppelde DNP.

Workpackage 2 bestond uit de detectie van aflatoxine van het type B1. Er werden eerst voorbereidende tests uitgevoerd om de verbinding van aflatoxine op het functioneel gemaakte germaniumkristal te controleren. Er werd gebruik gemaakt van dezelfde moleculaire constructie als bij het detecteren van DNP. De concentratie aflatoxine van het type B1 werd gemeten met de ELISA-test in concurrentie op 36 stalen die we tijdens woningbezoeken hadden genomen. 15 van de stalen testten via massaspectrometrie positief op aflatoxine van het type B1. Met de ELISA-test hebben we echter geen aanwezigheid van aflatoxine van het type B1 kunnen aantonen omdat deze techniek minder gevoelig is dan massaspectrometrie. Let wel: deze beperkte gevoeligheid zal worden gecompenseerd door spectrale methoden die de detectie van een specifieke verbinding mogelijk maken. Die tests gebeuren tijdens de tweede fase van het project.

Omdat in een vochtige woning vaak schimmels worden aangetroffen, leek het ons interessant om over een instrument te beschikken waarmee we de biomassa van schimmels in de omgevingslucht kunnen meten. Dit om een beter beeld te krijgen van de vervuilingsgraad van het onderzochte binnenmilieu. Daarom hebben we binnen dit project een nieuw workpackage uitgewerkt dat bestaat uit het aanmaken van monoklonale antilichamen tegen de sporen van de meest gangbare schimmels in vochtige woningen, namelijk *Alternaria*, *Aspergillus* en *Stachybotrys*.

Hiervoor werden monoklonale antilichamen aangemaakt bij LOU/c-ratten die met $5 \cdot 10^6$ sporen van *Alternaria alternata* (IHEM 18586), *Aspergillus fumigatus* (IHEM 6117), of *Stachybotrys chartarum* (IHEM 22013) werden geïmmuniseerd. Na de immunisering werden de verkregen lymfocyten met IR-983F-cellen gefuseerd. De groeiende hybridomen werden geselecteerd op HAT-medium. De positieve klonen werden geselecteerd via doorstroomcytometrie op verschillende schimmelsporen. Uit ratten die met *Alternaria alternata* werden geïmmuniseerd, werden vijf antilichamen geselecteerd en werden hun eigenschappen vastgesteld. LO-ALT-3 bleek eigen te zijn aan de soort, terwijl LO-ALT-5 heel interessant bleek om een ruim aantal schimmels in milieustalen op te sporen. We hebben de prestaties van dit antilichaam getest op onze stofstalen uit woonkamers van 10 verschillende woningen. Via ELISA-tests met LO-ALT-5 hebben we in vier van de tien stalen de gezochte antigenen kunnen detecteren.

Zes andere monoklonale antilichamen werden geselecteerd uit ratten die met *Aspergillus* werden geïmmuniseerd. Van deze zes antilichamen bleek LO-ASP-2 heel geschikt om sporen van *Aspergillus niger* op te sporen en minder geschikt voor de detectie van sporen van *Alternaria*, *Cladosporium* en *Stachybotrys*. Vijf andere antilichamen tegen *Stachybotrys* werden op dezelfde manier aangemaakt. De eigenschappen van al deze antilichamen moeten we nog beter kunnen bepalen voor ze op ons biosensorsysteem kunnen worden geënt.

Het antilichaam anti-*Alternaria* werd vervolgens met succes geïmmobiliseerd op het oppervlak van de optische sensor. Daarna werd de spectrale gevoeligheid ervan gemeten, wat een resultaat opleverde dat in verhouding stond tot de verdunning van het *Alternaria*-sporenextract in het spectraal domein van proteïnen en polysacchariden. De eerste resultaten tonen aan dat de beste gevoeligheid ter hoogte van die polysacchariden ligt.

Workpackage 3 bestond uit het aanmaken van monoklonale antilichamen tegen mycotoxinen. Omdat mycotoxinen uiterst kleine niet-eiwit moleculen zijn, kunnen ze geen immunreactie opwekken als ze zonder meer bij dieren worden ingespoten. Voor de aanmaak van antilichamen is immers de hulp van T-helper-cellen nodig die lineaire peptiden herkennen. Voor de activering van lymfocyten van het type B, hun aanmaak van antilichamen en de aanmaak van monoklonale antilichamen moet de toxine aan een 'carrier'-eiwit worden gekoppeld.

Daarom werden roridine A en verrucarine A gekoppeld aan KLH en aan OVA via een behandeling met barnsteenzuur-anhydride om de noodzakelijke functionele groepen voor de koppeling tot stand te brengen. LOU/c-ratten werden geïmmuniseerd met 50 µg roridine A of verrucarine A gekoppeld aan KLH. Na het immuniseringsprotocol werden de aangemaakte lymfocyten gefuseerd met IR-983F-cellen en hybridomen geselecteerd op HAT-medium.

De doeltreffendheid van de immunisering/fusie werd bevestigd door de aanwezigheid van talrijke specifieke KLH-klonen. Op deze manier werden meer dan 300 klonen aangemaakt en geanalyseerd. Meer dan 60% waren specifieke KLH-klonen, maar er geen enkele kloon tegen mycotoxinen bij.

Daarom werd een nieuwe koppelingsreactie met BSA, KLH en OVA tot stand gebracht, die uitvoerig in het volledige rapport wordt beschreven. LOU/c-ratten werden geïmmuniseerd met 50 µg verrucarine gekoppeld aan BSA, waarna het eerder beschreven protocol voor de aanmaak van hybridomen werd toegepast.

De bovenstaande vloeistof onderging een ELISA-test op plaatjes gecoat met BSA of met BSA-verrucarine A om de antilichamen te selecteren die specifiek waren voor mycotoxinen.

Dit leverde acht monoklonale antilichamen op die mycotoxinen herkenden. De bovenstaande vloeistoffen van bepaalde klonen bevatten antilichamen die verrucarine A in combinatie met verschillende carriers (BSA, KLH, OVA) herkenden. Bij sommige antilichamen deed zich een kruisreactie met roridine A voor. We hebben hun eigenschappen verder onderzocht, maar alle resultaten tonen aan dat onze antilichamen alle gekoppelde toxinen herkennen en geen vrije toxinen, wat onze latere detectietests op het spel zette.

Daarom werden nieuwe tests gedaan met LOU/c-ratten die waren geïmmuniseerd met verrucarine A gekoppeld aan BSA volgens het eerder beschreven protocol. 70 (= 13%) van de 553 geteste klonen hebben antilichamen aangemaakt die verrucarine gekoppeld aan OVA herkennen. Slechts één kloon maakte antilichamen aan die door vrij verrucarine A werden geïnhibeerd. Na optimalisering van de ELISA-testomstandigheden in concurrentie met dit antilichaam (F241G2) hebben we vrij verrucarine A kunnen detecteren met een gevoeligheid tussen 3,9 en 1,9 ng/ml. In een volgende fase proberen we met datzelfde antilichaam verrucarine A in onze milieustalen te detecteren.

In totaal hebben we 40 milieustalen genomen in woningen die door schimmels waren aangetast. De aanwezige toxinen werden verzameld op kwartfilters (porie van 2,2 µm) door aanzuiging via een pomp met hoog debiet (400 l/min) van een volume lucht gelijk aan de helft van het kamervolume. Parallel met de ontwikkeling van onze techniek werden dezelfde stalen in het laboratorium van Prof. S. De Saeger aan de Universiteit Gent ook aan een LC-MS-MS-analyse onderworpen. Uit deze analyse bleek dat 15 van de stalen een statistisch significant mycotoxinegehalte vertonen. Tot onze verbazing werd ook aflatoxine van het type B1 in de omgevingslucht van deze huizen aangetroffen, een stof die gewoonlijk met voedselinfecties in verband wordt gebracht. Hierdoor werd Workpackage 2 dat tot dan louter als een technische valideringsfase werd beschouwd, plots uiterst belangwekkend voor het detecteren van vervuiling in huizen.

De resultaten van de LC-MS-MS-analyse werden ook vergeleken met de resultaten van de commerciële ELISA-test uitgevoerd door de firma Envirologix. Die vergelijking bracht aan het licht dat de ELISA-test geneigd is om de vervuiling te onderschatten.

De specifieke antilichamen tegen trichothecenen worden met de hybrido-metechnologie aangemaakt, waarna de verkregen klonen worden geïdentificeerd, vermeerderd en hun eigenschappen worden vastgesteld. De gezuiverde antilichamen worden als receptoren op de nieuwe optische sensor gebruikt. De biosensortechniek zal gebruik maken van bestaande technieken en zal de voordelen van FTIR-detectie combineren met die van moleculaire herkenning op basis van immuno-affiniteit.

Daarnaast werden ook stalen genomen in een dertigtal woningen die niet waren aangetast. Die vormen de basis voor een databank die de eerste stap zou kunnen zijn van een toekomstige epidemiologische studie over de woonkwaliteit.

De **overdracht van de FTIR/ATR-technologie** tussen UMons en HVS is heel succesvol verlopen. Het **model op basis van de DNP-detectie** werd ontwikkeld door de detectie van gekoppeld en vrij DNP te vergelijken. De toegepaste concepten op het vlak van immunodetectie werden met succes op de FTIR-technologie overgedragen, waardoor de weg voor nieuwe receptoren werd geëffend: FTIR-immunoreceptoren. **Monoklonale antilichamen tegen Alternaria, Aspergillus en Stachybotrys werden aangemaakt** en hun eigenschappen werden deels vastgelegd. In het bijzonder twee antilichamen (LO-ALT-1 en LO-LT-5) bleken een antigeen te erkennen dat aanwezig is aan de oppervlakte van heel wat schimmels en een derde antilichaam (LO-ALT-3) bleek specifiek te zijn voor *Alternaria alternata*. We zijn gestart met de aanmaak en zuivering van deze antilichamen om ze op de biosensor te kunnen gebruiken bij het bepalen van de biomassa aan schimmels in de binnenlucht.

De aanmaak van monoklonale antilichamen tegen mycotoxinen loopt en vijf ervan herkennen gekoppeld verrucarine A en roridine A, maar slechts één antilichaam - F24-1G2 - kan vrij verrucarine A detecteren met een gevoeligheid van 3,9 tot 1,9 ng/ml. Tot slot is men **begonnen met het nemen van milieustalen**. Dit werk wordt voortgezet. Op de stalen worden kruisvalideringen uitgevoerd met de LC-MS-MS-techniek en met de ELISA-test van Envirologix. Die laatste lijkt de vervuilingsgraad systematisch te onderschatten. Fase 2 van het project is dan ook uiterst belangrijk: met behulp van antilichamen die in het kader van dit project werden aangemaakt en waarvan de eigenschappen werden vastgesteld, moet in deze fase een FTIR-ATR-receptor worden ontwikkeld die gevoeliger is dan de bestaande commerciële technologieën.