

Intérêt du dosage de la guanine dans la poussière de maison pour la quantification des allergènes des acariens

G. PAULI, A. TENABENE, J.C. BESSOT, C. HOYET *

RÉSUMÉ

L'identification des acariens de la poussière domestique par des méthodes de comptage optique est particulièrement laborieuse. En 1984, Bischoff et Schirmacher ont mis au point une technique colorimétrique permettant un dosage semi-quantitatif de la guanine présente dans les échantillons de poussière. Le principe du test repose sur l'excrétion préférentielle des produits azotés sous forme de guanine chez les arthropodes chélicifères. Cette technique permet de pratiquer dans un même temps l'extraction et la quantification de la guanine par une réaction colorée azoïque, les résultats étant exprimés en 4 classes correspondant à des quantités croissantes de guanine.

Le but de cette étude préliminaire a été de confirmer la corrélation existant entre l'allergénicité d'un extrait de poussière et sa richesse en guanine par trois approches différentes : — étude d'échantillons de poussières réputées être pauvres en acariens (altitude et milieu hospitalier), — étude d'échantillons de poussières prélevées dans les domiciles où des patients allergiques aux acariens avaient une recrudescence de leurs symptômes, — évaluation de l'activité allergénique d'extraits de poussières sélectionnées selon leur richesse en guanine par des tests cutanés effectués chez des sujets monosensibilisés à *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Les résultats des analyses d'échantillons de poussières réputées pauvres en acariens ont montré une absence complète de guanine dans 15 échantillons sur 21, une très faible teneur en guanine dans 5 échantillons sur 21. Dans 5 cas, les poussières, prélevées dans les domiciles où des sujets allergiques présentaient des symptômes, contenaient plus de guanine que celles prélevées dans les domiciles où ces mêmes patients étaient asymptomatiques. Enfin, chez 10 sujets monosensibilisés à *Dermatophagoides pteronyssinus*, nous avons pu démontrer que les échantillons de poussière de maison sans guanine n'entraînaient aucune réaction cutanée significative. Au contraire, en utilisant 3 échantillons de poussières contenant des quantités croissantes de guanine, nous avons observé que l'intensité de la réaction cutanée, appréciée par le poids de la surface de la papule, était plus importante lorsque l'extrait testé était plus riche en guanine.

SUMMARY

Advantage of the dosage of guanine in house dust for the quantification of acarins allergens. — The identification of acarins in house dust by methods using an optic counter is particularly hard. In 1984, Bischoff and Schirmacher developed a colorimetric technique permitting a semi-quantitative dosage of the guanine present in dust samples. The principle of the test rests on the preferential excretion of nitrogen products in the form of guanine in cheliciferous arthropods. This technique enables to perform at the same time extraction and quantification of guanine, using an anilin dye reaction, with expression of the results in 4 classes corresponding to increasing quantities of guanine. The objective of this preliminary study was to confirm the correlation existing between the allergenicity of a dust extract and its high guanine content, using three different approaches : — study of dust samples known to be poor in acarins (altitude and hospital environment), — study of dust samples taken from houses where patients allergic to acarins had a recrudescence of their symptoms, — evaluation of the allergenic activity of dust extracts selected for their high guanine content using skin tests done in patients monosensitized to *Dermatophagoides pteronyssinus*.

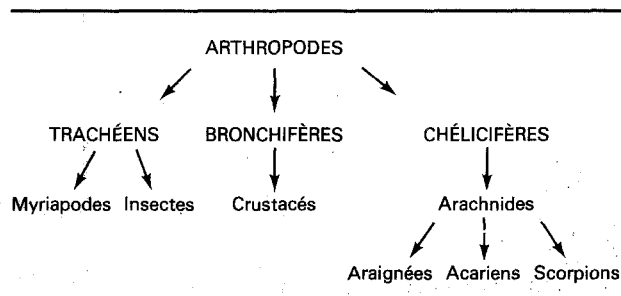
The results of the analyses of dust samples known to be poor in acarins, showed a complete absence of guanine in 15 samples out of 21, a very low content in guanine in 5 samples out of 21. In 5 cases, dust taken from houses where allergic patients presented symptoms, contained more guanine than the dust sampled in houses where the same patients were asymptomatic. Finally, in 10 patients monosensitized to *Dermatophagoides pteronyssinus*, we were able to demonstrate that dust samples from a house without guanine did not cause any significant skin reaction. On the contrary, in using 3 dust samples containing increasing quantities of guanine, we observed that the intensity of the skin reaction, evaluated by the weight of the papular area, was more important when the extract tested had a higher guanine content.

* Service de Pneumologie II, Pavillon Laënnec, CHRU, Strasbourg.
Tirés à part : Dr G. Pauli, Service de Pneumologie II, Pavillon Laënnec, CHRU, B.P. 426, 67091 STRASBOURG CEDEX.
Reçu le 3 juillet 1986 - Accepté le 25 août 1986.

Depuis les travaux de Voorhorst et Spieksma [37, 38, 40] de nombreuses études cliniques et biologiques ont confirmé le rôle prépondérant joué par les acariens pyroglyphides dans les asthmes et les rhinites à composante allergique [8, 12, 14, 27, 28]. Plusieurs auteurs [26, 31] ont souligné l'amélioration clinique des asthmatiques allergiques aux acariens auxquels avaient été prodigués des conseils d'éviction de la poussière domestique. De même, une diminution de l'hyper-réactivité bronchique a été observée en milieu hypoallergénique [29]. L'appréciation objective des résultats des mesures d'éviction devrait cependant être basée sur l'identification et le dénombrement précis des acariens présents dans l'environnement des malades. L'identification des acariens a été réalisée initialement par des méthodes optiques [3, 32], les résultats étant exprimés en nombre d'acariens par gramme de poussière ou par unité de surface [2]. Il a été ainsi possible d'identifier deux acariens pyroglyphides, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) et *Dermatophagoides farinae* (Df) ayant une importance majeure dans l'allergénicité des poussières domestiques. Le nombre d'acariens par gramme de poussière peut varier de 2 à 4 000. Cependant, la numération des acariens par les méthodes optiques reste difficile. La mise en évidence des allergènes des acariens n'est pas moins complexe. La provenance des allergènes des acariens a été longtemps controversée. Il est actuellement admis qu'une source majeure d'allergènes est représentée par les particules fécales [15]. Tovey et coll. [34] y ont identifié 99 p. cent d'antigène P1, un des deux allergènes majeurs de Dpt. Une particule fécale en contient 0,1 ng ; un gramme de poussière de maison peut contenir jusqu'à 250 000 particules fécales, soit 25 µg d'antigène P1. L'identification de l'antigène P1 dans l'environnement des asthmatiques est réalisable par des méthodes radio-immunologiques nécessitant des immunosérums anti-Dpt. Chapman et Platts-Mills [15, 30] ont utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes antigéniques communs aux antigènes majeurs de Dpt et de Df, les antigènes P1 et F1. Une technique immuno-enzymatique, utilisant un sérum mono spécifique anti Dp 42 (l'antigène Dp 42 correspond à l'antigène P1 décrit par Platts-Mills) a été proposée par Lind [23, 24]. Toutes ces méthodes, méthodes optiques de comptage des acariens et méthodes radio-immunologiques ou immuno-enzymatiques de mise en évidence de certains de leurs allergènes, ne permettent pas une évaluation facile de l'allergénicité d'un échantillon de poussière.

En 1984, Bischoff et Schirmacher [9, 10] ont mis au point une technique colorimétrique simple permettant l'extraction et la quantification

TABLEAU I



de la guanine présente dans les excréments des acariens. Le principe de cette technique (Acarex Test) repose sur l'excrétion préférentielle des produits azotés sous forme de guanine [6] chez les arthropodes chélicifères dont font partie les acariens (tableau I). Chez d'autres arthropodes et notamment chez des insectes dont les déjections peuvent être présentes dans les poussières domestiques, l'excrétion des produits azotés s'effectue sous forme d'acide urique et non de guanine [17, 20, 42].

Le but de notre travail a été de confirmer la corrélation existant entre l'allergénicité d'un extrait de poussière et sa richesse en guanine, d'une part par l'analyse d'échantillons de poussières provenant de différents environnements, d'autre part par l'évaluation de l'activité allergénique des extraits de poussière selon leur richesse en guanine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Technique du test de détection de la guanine dans les extraits de poussière (Acarex Test)

La réaction est réalisée sur les produits de tamisage d'un échantillon de poussière prélevée par aspiration, les malades s'étant abstenus de faire le ménage pendant quelques jours. 0,4 ml de cette poussière, soit environ 150 mg sont mélangés à 2 ml d'une solution alcaline dans un récipient de verre ou de matière plastique. La révélation de la richesse en guanine est effectuée par une réaction colorimétrique diazoïque [21]). La lecture est effectuée grâce à un papier test après 5 secondes. L'intensité de la réaction est fonction de la concentration en guanine. Les résultats sont exprimés en quatre classes correspondant à des quantités croissantes de guanine : nulle, faible, moyenne, forte. Ces quatre classes expriment des proportions respectives de 0 p. cent, 0,06 p. cent, 0,25 p. cent, 1 p. cent de guanine dans les excréments. Il est à noter que la guanine peut représenter jusqu'à 2 p. cent du poids d'un prélèvement de poussière [9].

Analyse des différents échantillons de poussière

66 échantillons de poussière ont été analysés par cette technique :

— 35 échantillons provenaient des domiciles de malades suivis à notre consultation d'allergie (4 rhinites allergiques, une rhinite vasomotrice non allergique, 25 asthmes extrinsèques, 5 asthmes intrinsèques ou mixtes) ;

— 10 échantillons de poussière provenaient des domiciles de 5 malades ayant une symptomatologie variable dans 2 habitats différents (5 échantillons provenant d'habitats avec symptômes, 5 autres d'habitats sans symptômes) ;

— 21 échantillons de poussière réputée classiquement pauvre en acariens [25, 33, 36], 6 échantillons de poussière d'hôpital et 15 échantillons de poussière d'altitude provenant d'habitats différents et prélevée chez des sujets autochtones de la vallée de Chamonix (entre 1 100 et 1 500 mètres).

Certaines particularités de 27 habitats d'où provenaient certains échantillons de poussière ont été précisées par un questionnaire mentionnant le type d'habitat, son ancienneté, les modalités de chauffage, les caractéristiques du matelas, la présence ou l'absence de moquette, d'animaux domestiques...

En plus des échantillons de poussière, nous avons également analysé par l'Acarex Test, 4 préparations qui nous ont été fournies par l'Unité d'Immuno-Allergie de l'Institut Pasteur, d'une part 3 cultures lyophilisées d'acariens, d'autre part le produit de tamisage d'une culture d'acariens ne contenant que leurs excréments (l'absence d'acariens ayant été préalablement vérifiée par une méthode optique).

Evaluation de l'activité allergénique d'extraits de poussière de maison sélectionnés selon leur richesse en guanine par les tests cutanés

Des extraits provenant de 4 échantillons de poussière ayant une richesse croissante en guanine ont permis la réalisation de tests cutanés chez 10 malades volontaires monosensibilisés à Dpt.

5 malades ont été testés par scratch-tests avec des extraits dilués dans du sérum physiologique phénolé.

5 autres malades ont été testés par intra-dermo-réactions ou prick-tests, avec des solutions stérilisées glycerinées, obtenues à partir des extraits bruts. En outre, des tests cutanés effectués avec des extraits d'acariens et avec le diluant ont servi à chaque fois de témoin positif et négatif. L'intensité des réactions cutanées a été évaluée par les pesées des surfaces des papules relevées par décalque, rapportées sur un papier de même grammage, puis découpées soigneusement.

RESULTATS**Analyse des échantillons de poussière**

L'ensemble des résultats est rapporté dans le tableau II. Nous relevons dans les 21 échantillons de poussière réputée pauvre en acariens l'absence de guanine dans 15 échantillons et sa présence à des taux très faibles dans 5 échantillons. Par contre, dans les cultures d'acariens et leurs produits de tamisage on note la présence de fortes concentrations de guanine. Enfin, chez les 5 malades présentant des symptômes variant en fonction de leur lieu de résidence, les poussières prélevées dans les domi-

TABLEAU II. — Contenu en guanine de différents échantillons de poussière ainsi que de cultures et de produits de tamisage de cultures d'acariens

Concentration en Guanine	Cultures d'acariens n = 3	Produit de tamisage des cultures d'acariens n = 1	Poussières d'hôpital n = 6	Poussières d'altitude n = 15	Poussières prélevées aux domiciles de malades n = 45					
					Avec Sympt.	Sans Sympt.	RVA	RVNA	AE	AI ou mixte
Nulle			4	11	3					1
Faible			2	3	2				10	3
Moyenne				1	1		1	1	8	1
Forte	3	1			4		3		7	

RVA = Rhinite vasomotrice allergique

RVNA = Rhinite vasomotrice non allergique AE = Asthme extrinsèque

AI = Asthme intrinsèque

ciles où ils présentent des symptômes contiennent davantage de guanine que celles prélevées dans les domiciles où ils sont asymptomatiques.

La richesse en guanine des extraits de poussière prélevée chez les autres malades est variable. Chez 4 malades présentant un asthme intrinsèque ou mixte, 3 échantillons contiennent de faibles quantités de guanine, un échantillon n'en contient pas.

Le dépouillement de 27 questionnaires ayant trait aux caractéristiques des habitations d'où provenaient certains échantillons de poussière ne permet pas de tirer de conclusions du fait de la petite taille de l'échantillonnage. Dans les habitations dont les matelas ont plus de 5 ans nous relevons néanmoins une proportion plus importante de poussière riche en guanine.

Résultats des tests cutanés effectués avec des extraits de poussière ayant une richesse croissante en guanine

L'évaluation des corrélations entre l'activité allergénique des différents extraits et leur richesse en guanine par la méthode des tests cutanés a donné les résultats suivants : pour 3 lots différents de poussière sans guanine, il n'a été noté aucune réaction significative chez des sujets monosensibilisés aux acariens. Au contraire, en utilisant des extraits de poussières contenant des quantités croissantes de guanine, nous avons relevé un parallélisme entre la quantité de guanine présente dans les extraits testés et l'intensité des réactions cutanées (fig. 1 et tableau III).



Fig. 1. — Scratch-tests effectués chez un patient allergique à Dpt avec des extraits de poussière sélectionnés selon le contenu en guanine (0, + (faible), ++ (moyenne), +++ (forte)) avec un soluté physiologique (T) et avec un extrait de Dpt (1/1 000).

Quelque soit la méthode des tests cutanés utilisée, nous avons observé une véritable échelle dans l'intensité des réactions cutanées selon la teneur en guanine des extraits de poussière utilisée (fig. 2). De plus, en évaluant les poids des surfaces des papules pour chacun des tests, en fonction de la teneur en guanine des extraits de poussière utilisée, nous avons déterminé un facteur de multiplication entre la papule induite par un extrait contenant 0,06 p. cent de guanine et la papule induite par l'extrait contenant 1 p. cent de guanine. Ce facteur de multiplication varie de 1,6 à 3,6 (tableau III) chez les 10 malades testés.

TABLEAU III. — Poids en mg des surfaces des papules des tests cutanés réalisés par différentes méthodes avec des extraits de poussière contenant une concentration croissante de guanine

Concentration en Guanine	SCRATCH TEST					INTRADERMO-REACTION			PRICK-TEST	
	NOMS DES MALADES					MA...	WI...	SCH...	RE...	HE...
	BO...	O.G...	BO...	MA...	DE...					
Nulle (1)	15,7	5,1	3,3	0	4,1	0	0	0	0	0
Faible (2)	22	6,8	6,2	4,3	6,4	2,3	2,9	3,6	1	1,2
Moyenne (3)	42,4	7,6	9,1	8,6	8,5	3,8	5,1	4,3	2	1,9
Forte (4)	47,1	10,9	13,1	15,7	13,6	8	9,7	9,4	3	3,7
Facteur de multiplication entre concentration en Guanine 2 et 4	2,1	1,6	2,1	3,6	2,1	3,4	3,3	2,7	3	3,1
Témoin positif Dpt 1/1 000		14,2	11,4	14,6						

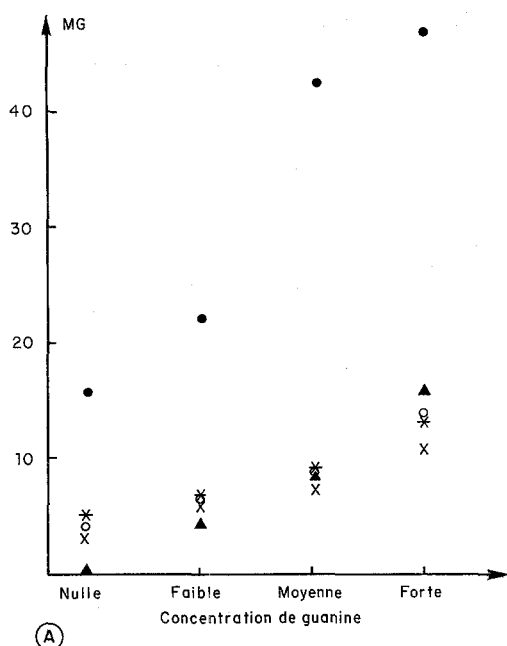


Fig. 2 A. — Le poids en mg des surfaces décalquées des tests cutanés (scratch-test) est rapporté à la concentration de guanine présente dans les échantillons de poussière qui ont servi à préparer les extraits utilisés (5 patients).

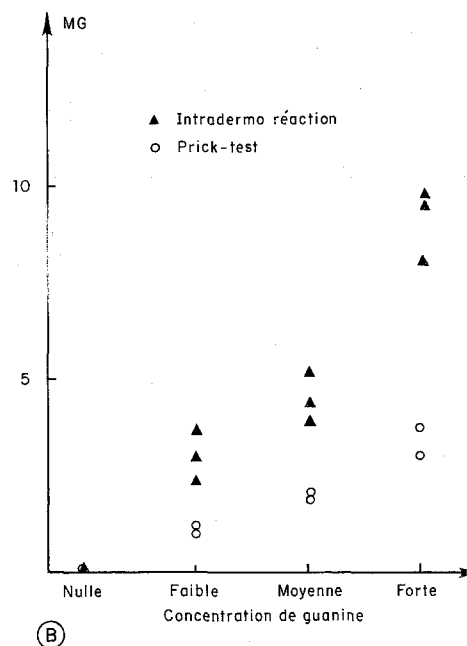


Fig. 2 B. — Le poids en mg des surfaces décalquées des tests cutanés (▲ intradermoréaction, ○ Prick-test) est rapporté à la concentration de guanine présente dans les échantillons de poussière qui ont servi à préparer les extraits utilisés (5 patients).

DISCUSSION

La reproductibilité de l'Acarex Test et l'existence d'une corrélation entre l'intensité de la réaction colorimétrique et la richesse en guanine ont été établies par Bischoff et Schirmacher [9] grâce à des préparations de poussières synthétiques mélangées à des quantités connues de guanine.

Théoriquement, la présence de guanine dans un échantillon de poussière n'est pas synonyme de la présence de Dpt puisque les oiseaux, les araignées et d'autres espèces d'acariens peuvent en constituer également des sources potentielles. Cependant, en pratique, la quantité de guanine produite par les oiseaux, prélevée dans les habitations est insignifiante et n'est pas détectée par l'Acarex Test [10]; il est relativement aisé d'éliminer la présence d'araignées dans les prélèvements de poussières; enfin il a été bien établi que les acariens pyroglyphides constituaient la source biologique principale des allergènes des poussières de maison [38]. L'étude du rapport entre la teneur en guanine et la population d'acariens a d'ailleurs été antérieurement effectuée sur 43 échantillons de poussières [11]. Elle retrouve une certaine concordance entre la quantité d'acariens contenue dans 100 mg de poussière et le

résultat des dosages semi-quantitatifs de guanine réalisés dans les mêmes échantillons. Néanmoins, il nous paraît illusoire de penser mettre en évidence une véritable corrélation, d'une part, du fait du caractère semi quantitatif des dosages de la guanine, d'autre part, du fait que les feces d'acariens riches en guanine ne sont pas forcément proportionnels au nombre d'acariens présents dans un échantillon de poussière à un moment donné.

Par différentes approches, nous avons pu vérifier la corrélation existant entre la richesse en guanine et l'allergénicité des extraits de poussière. En effet, nous avons pu confirmer que les poussières réputées pauvres en acariens (poussières d'altitude ou d'hôpitaux) étaient également pauvres en guanine : dans notre étude, 15 échantillons en sont complètement dépourvus, 5 n'en contiennent qu'une faible quantité. A l'inverse, les cultures d'acariens, les excréments obtenus après tamisage de ces cultures sont riches en guanine. Il faut noter également une richesse en guanine supérieure dans les échantillons de poussière prélevés dans les domiciles où les malades présentent une aggravation des symptômes ainsi que dans les habitations où les matelas avaient plus de 5 ans, ce qui a déjà été souligné antérieurement [13]. L'emploi des tests cutanés

pour évaluer l'activité allergénique des échantillons et des extraits de poussière sélectionnés par le dosage de la guanine nous a paru être une étape capitale dans la validation de l'Acarex Test. En effet, les tests cutanés ont été proposés comme une méthode de référence permettant de mesurer l'activité biologique des extraits d'allergènes chez les sujets allergiques [1, 41]. Ils sont toujours le préalable nécessaire à toute standardisation in vitro [22]. En utilisant cette méthode, certes sur un nombre limité de malades, nous avons pu mettre en évidence un parallélisme entre l'intensité des réactions cutanées et la quantité de guanine présente dans les extraits. La sélection de nos patients a été limitée aux sujets présentant une sensibilité restreinte aux seuls allergènes des acariens parmi les allergènes de la poussière domestique ; en effet, d'autres constituants allergéniques indépendants des allergènes des acariens, peuvent être responsables des tests cutanés positifs à un extrait de poussière de maison [7].

La technique de l'Acarex Test permet l'analyse des poussières d'une habitation mais également une analyse des poussières prélevées en différents endroits. Il est ainsi possible de préciser la localisation élective des acariens et de leurs allergènes. En effet, si habituellement la répartition des acariens est plus importante dans les pièces de repos que dans les pièces de séjour, plus importante au niveau de la literie (en particulier à la surface des matelas) qu'au niveau du sol, certains auteurs ont rapporté une infes-

tation plus importante des couvertures que des matelas en Nouvelle Guinée [19] et à Hong Kong [18], des acariens plus nombreux dans les salons que dans les chambres à coucher dans l'Ohio [4], plus nombreux également au niveau des sols que dans la literie à Stockholm [35]. Il est également possible d'effectuer des prélèvements répétés dans le temps et de suivre les variations saisonnières locales des acariens pyroglyphides. En outre, par une meilleure quantification de l'exposition aux allergènes, ce test pourrait également permettre de mieux contrôler l'efficacité des différentes mesures prophylactiques d'éviction des acariens, notamment le dépoussiérage par aspiration et l'effet des acaricides. Enfin, l'Acarex Test devrait permettre de poser avec plus d'acuité les indications de mise en route d'un traitement de désensibilisation.

Par sa simplicité, son faible coût de revient, sa rapidité d'exécution, l'Acarex Test apparaît comme une méthode particulièrement bien adaptée à l'étude personnalisée de l'environnement des asthmatiques allergiques aux acariens.

Remerciements

Nous remercions E. Bischoff (G.H.F. Mainz) qui a mis à notre disposition l'Acarex Test ainsi que J. Le Mao et J. Rabillon du laboratoire de l'Unité d'Immuno-Allergie de l'Institut Pasteur (B. David) qui nous ont fourni des cultures d'acariens. Nous remercions également F. Eckert, L. Mahr, F. Frey pour leur précieuse collaboration technique ainsi que J. Clodong pour les travaux de secrétariat. Les travaux du laboratoire dans ce domaine sont soutenus par la Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

1. Aas K., Backman A., Belin L., Week B. — Standardization of allergen extracts by appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent tests. *Allergy*, 1978, 33, 310.
2. Abott J., Cameron J., Taylor B. — House dust mite counts in different types of mattresses sheepskins and carpets, and a comparison of brushing and vacuuming collection methods. *Clin. Allergy*, 1981, 11, 589-595.
3. Araujo-Fontaine A. — Acariens et allergie à la poussière. Essai de détermination des IgE spécifiques vis-à-vis des acariens par la méthode des immunoadsorbants. Thèse Université Louis Pasteur, Fac. Med. Strasbourg, 1974, n° 5.
4. Arlian L.G., Bernstein I.L., Gallacher J.S. — The prevalence of house dust mites, *Dermatophagoides* spp. and associated environmental conditions in homes in Ohio. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1982, 69, 527-532.
5. Arlian L.G., Bernstein I.L., Johnson C.L., Gallagher J.S. — Ecology of house dust mites and house dust allergy. In *Recent Advances in Acarology*. Rodriguez J.G., New York Academic Press, 1983, vol. 2, 185-195.
6. Baker W.E., Warton G.W. — Digestive system. An introduction to Acarology. The Mac Millan Company, New York, 1952, 27-29.
7. Bessot J.C., Pauli G. — Les allergènes de la poussière de maison. *Bull. Eur. Physiopath. Resp.*, 1986, 22, 1-8.
8. Biliotti G., Passaleve A., Romagnani S., Ricci M. — Mites and house dust allergy. Comparison between house dust and mite skin reactivity. *Clin. Allergy*, 1972, 2, 109.
9. Bischoff E., Schirmacher W. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. *Allergol.*, 1984, 11, 446-449.
10. Bischoff E., Schirmacher W. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. *Allergol.*, 1985, 8, 36-38.
11. Bischoff E., Schirmacher W., Schober G. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. *Allergol.*, 1985, 8, 97-99.
12. Bronswijk J.E.M.H., Sinha R.M. — Pyroglyphid mites and house dust allergy. *J. Allergy*, 1971, 47, 31-52.
13. Bronswijk J.E.M.H. — Colonisation and its prevention on house floors and in mattresses with Dpt in a center for asthmatic children. *Entomol. Exp. App.*, 1974, 17, 199-203.
14. Bronswijk J.E.M.H., Jorde W. — Mites and allergenic activity in house dust on Helgoland. *Acta Allergol.*, 1975, 30, 209-215.
15. Chapman M.D., Tovey R.E., Platts Mills T.A.E. — Physical properties and origin of house dust mite allergen. *Folia Allergol. Immunol. Clin.*, 1982, 29, 25-35.
16. Chapman M.D., Heymann P., Wilkins S., Platts-Mills T.A.E. — Monoclonal immunoassays to measure major allergens from house dust mites. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1986, 77, 204 Abstr.
17. Chauvin R. — L'excrétion - Physiologie de l'insecte. INRA, 1956, 235-251.
18. Gabriel M., Cunningham A.M., Allan W.G.L., Pickering C.A.C., Wraith D.G. — Mite allergy in Hong Kong. *Clin. Allergy*, 1982, 12, 157-171.
19. Green W., Woollock A.T., Domse G. — House dust mites in blankets and house in the highlands of Papua New Guinea. *Med. J.*, 1982, 25, 219-222.

20. Gilmour D. — Metabolism of purines. The metabolism of insects. University reviews in biology. Oliver and Boyd, 1965, 148-151.
21. Kossel H. Zur Reaktion von mononucleotiden mit Diazoniumsalzen. *Z. Physiol. Chem.*, 1965, 340, 210-220.
22. Le Mao J., Weyer A., Pauli G., Lebel B., David B. — Studies on Dpt allergens measurement of the relative potencies of Dpt purified extracts by in vitro and in vivo methods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1980, 65, 381-388.
23. Lind P., Korsgaard J., Wenstein L.H. — Detection and quantitation of Dermatophagoides antigens in house dust by immunochemical techniques. *Allergy*, 1979, 34, 319-326.
24. Lind P., Mosbech H. — Collection of house dust for analysis of mite allergens. *Allergy*, 1986, 41, 373-378.
25. Lustgraaf B., Jorde W. — Pyroglyphid mites, xerophilic fungi and allergenic activity in dust from hospital mattresses. *Acta Allergol.*, 1977, 32, 406-416.
26. Murray A.B., Ferguson A.C. — Dust free bedrooms in the treatment of asthmatic children with house dust or house dust mite allergy : a controlled trial. *Pediatrics*, 1983, 7, 418-422.
27. Pauli G., Bessot J.C., Guisard G., Roegel E., Oudet P. — Importance clinique des acariens chez les asthmatiques allergiques à la poussière domestique. Résultats des tests de provocation ventilatoire. *Rev. Fr. Allergol.*, 1972, 12, 141-153.
28. Pauli G., Bessot J.C., Araujo-Fontaine A., Oudet P., L'asthme aux acariens. *Rev. Fr. Mal. Respir.*, 1973, 1, 711-724.
29. Platts-Mills T.A.E., Tovey E.R., Mitchell E.B., Moszord H., Nock P., Wilkins S.R. — Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet*, 1982, 25, 675-678.
30. Platts-Mills T.A.E., Heymann P.W., Chapman D.D., Hayden M.L., Wilkins S.R. — Cross-reacting and species-specific determinants on a major allergen from Dermatophagoides Pteronyssinus and D. farinae : development of a radioimmunoassay for antigen PI equivalent in house dust and dust mite extracts. *J. Allergy clin. immunol.*, 1986, 78, 398-407.
31. Sarsfield J.K., Gowland G., Toy R., Norman A.L.E. — Mite sensitive asthma of childhood : trial of avoidance measures. *Arch. Dis. Child.*, 1974, 49, 716-721.
32. Spieksma F.T.M., Spieksma-Boezeman M.I.A. — The mite fauna of house dust with particular reference to the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus. *Acarologia*, 1967, 9, 226-241.
33. Spieksma F.T.M., Zuidema P., Leupen M.J. — High altitude and house dust mites. *Br. Med. J.*, 1971, 1, 82.
34. Tovey E.R., Chapman M.D., Platts-Mills T.A.E. — Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*, 1981, 289, 592-593.
35. Tuross M. — Mites in house dust in the Stockholm area. *Allergy*, 1979, 34, 11-18.
36. Vervloet D., Penaud A., Razzouk H., Senft M., Arnaud A., Boutin C., Charpin J. — Altitude and house dust mites. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1982, 69, 290-296.
37. Voorhorst R., Spiekma F.T.M., Spiekma-Boezeman M.I.A. — Is a mite (Dermatophagoides sp) the producer of the house dust allergen? *Allergy Asthma*, 1964, 10, 329-334.
38. Voorhorst F. — The house mite (D. pteronyssinus) and the allergen it produces. Identity with the house dust allergen. *Acta Allergol.*, 1967, 22, 412-413.
39. Voorhorst R., Spieksma F.T.M. — Recent progress in the house dust mite problem. *Acta Allergol.*, 1969, 24, 115-123.
40. Voorhorst R. — Quantitative aspects of the problem of house dust atopy and house dust mites. *Acta Allergol.*, 1970, 25, 237-254.
41. Voorhorst R. — Standardization of allergens by means of an improved technique of skin testing. *Dev. Biol. Standard.*, 1975, 29, 352.
42. Wigglesworth V.B. — Excretion. The principles of insect physiology. Third Edition Methuen 1 Co, LTD, London, 1947, 299-305.

■ ■ ■