

J. Belmonte Soler

Unitat de Botànica. Universitat
Autònoma de Barcelona.

Seminario

Técnica para la captación e identificación de los pólenes

El estudio periódico y sistemático de los granos de polen presentes en la atmósfera ha tomado en los últimos decenios (1980 en adelante) una gran importancia. Además, el cruce de los datos obtenidos en estudios aerobiológicos y en estudios clínicos ha supuesto una enorme mejora en el tratamiento que puede ofrecerse a las personas afectadas de alergias debidas a pólenes.

Para llevar a cabo un estudio aerobiológico se tiene que aplicar una técnica de muestreo que permita "capturar" las partículas aerovagantes. A lo largo de la historia se han utilizado muy diversas técnicas (1,2, <http://www.uab.es/l-analisis-palinologiques/aerobio.htm> Métodos de muestreo), desde los simples portaobjetos untados con una substancia adhesiva expuestos sin ningún soporte específico hasta sofisticadas técnicas moleculares, pasando por aparatos que separan las partículas del aire reteniéndolas en filtros de gasa o succionándolas y depositándolas en superficies adhesivas. Hablamos de muestreadores o de captadores de polen, para referirnos a los artilugios que nos permiten hacer el muestreo, y de metodologías de estudio, para indicar el protocolo que se sigue en cada caso.

A pesar de los muy diversos métodos de estudio existentes, la constitución en los últimos años de redes nacionales e internacionales en las que se asocian los grupos de trabajo e investigación en aerobiología han llevado a una estandarización de los métodos de trabajo. Así, en el continente europeo, la mayor parte de las redes regionales, nacionales e internacionales destinadas a estudios aerobiológicos con aplicación clínica han adoptado la metodología Hirst³. No hay que olvidar que en algunas zonas se utiliza también la metodología Cour⁴.

Un captador Hirst³ es un muestreador de impacto por succión que requiere conexión a la red eléctrica. Funciona aspirando volúmenes constantes y conocidos de aire que hace impactar contra la superficie receptora. Ésta es una cinta plástica de 19 mm de ancho que se dispone tensada alrededor de una pieza cilíndrica llamada tambor. Para darle la capacidad de adherir y retener las partículas, se deposita sobre la cinta una fina película de aceite de silicona, usando un pincel. La disposición del tambor así preparado en el interior del captador es tal que, impulsado por un mecanismo de relojería, gira continuamente a razón de 2 mm/hora. Ello hace que las partículas impulsadas contra la superficie receptora queden retenidas de forma secuencial. Una vez a la semana se sustituye la superficie receptora. La ya expuesta, es cortada en los fragmentos correspondientes a cada día de la semana y cada fragmento es depositado en un portaobjetos, teñido y fijado (preparación microscópica) y es analizado al microscopio óptico.

El análisis microscópico de las muestras procedentes de un captador Hirst se hace sobre el material tal como se obtiene, es decir, con las partículas bióticas (células) manteniendo su contenido celular y depositadas junto a otras partí-

culas atmosféricas, minerales y orgánicas. Ello puede dificultar la identificación de los pólenes y esporas de hongos, pero tiene como muy positivo que no estropea las esporas de hongos. También es interesante en este método que, debido al hecho que las partículas se van depositando de forma secuencial sobre una cinta que avanza regularmente, es posible obtener resultados con precisión horaria, aunque el volumen de trabajo añadido que esto comporta hace que no se prodiguen demasiado estos resultados.

Los resultados que se obtienen de un captador Hirst (datos brutos) son convertidos a concentraciones medias diarias de pólenes y esporas (pólenes/m³ y esporas/m³) mediante un simple cálculo matemático en el que intervienen como factores:

- El número de partículas contadas (N).

- La superficie de muestra analizada. Para calcularla se necesita conocer el número (l) de líneas contadas y su longitud (K₁) y anchura (K₂) (ambas dependen del microscopio y del objetivo-ocular que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K₃).

- El volumen de aire que aspira el captador, normalmente 10 l/minuto, que, al cabo de un día equivalen a 14,4 m³ de aire (K₄).

Muchos de los parámetros se mantienen constantes (mientras no se cambie de microscopio o de objetivo-ocular y se siga una rutina de recuento), de manera que es habitual tenerlos establecidos para que la operación de conversión de los datos brutos diarios a concentraciones medias diarias quede reducida a una simple multiplicación entre una constante y el número de partículas detectadas.

La fórmula a aplicar en el caso de la metodología Hirst es:

$$\text{Concentración media semanal} = K \times N$$

- Donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (l, K₁ a K₄).

Además de estandarizar el captador que se utiliza hay que estandarizar también la metodología de recuento. En España, tanto el Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica⁵ como la Red Española de Aerobiología⁶ siguen el mismo protocolo, que consiste en contar los granos de polen presentes en cuatro líneas longitudinales, repartidas homogéneamente a lo ancho de la preparación microscópica correspon-

diente a un día.

En el mercado hay actualmente dos marcas comerciales que fabrican y distribuyen captadores basados en el método Hirst: la británica Burkard y la italiana Lanzoni.

Un captador Cour⁴ es un muestreador por filtración independiente del fluido eléctrico que consiste en un eje perpendicular al suelo, que sostiene, encajado en su extremo superior, un eje paralelo al suelo capaz de girar 360°. En el extremo delantero de este eje hay dos marcos protegidos, cada uno, por una visera mientras que en la parte posterior hay una veleta (que mantiene orientados los marcos siempre al viento dominante). Levantando las viseras de los marcos se puede encajar la superficie que interceptará las partículas aerotransportadas, un filtro preparado con cinco pliegues de gasa hidrófila untados con una mezcla de aceite de silicona y rodeado por un marco de plástico. Este filtro es cuadrado y mide 20 cm de lado. En el captador se exponen dos filtros: uno se cambia una vez por semana, normalmente los lunes, y el otro se usa como contrapeso y como resumen mensual. El filtro retirado del captador se somete a un tratamiento^{7,8} que combina procesos químicos (ácidos sulfúrico, fluorhídrico...) con físicos (centrifugaciones, decantaciones...) para obtener un sedimento formado, mayoritariamente, por los pólenes y las esporas retenidos. Para poder medir este sedimento con precisión y prepararlo para el análisis al microscopio óptico, se incluye en una matriz semilíquida de glicerogelatina. Una porción representativa de esta muestra se analizará microscópicamente. La consistencia semilíquida del medio en que se encuentran las partículas y el hecho de que el tratamiento incluye la acetólisis⁹, es decir, la eliminación de las partes blandas de la célula mediante una digestión química, facilita muy notablemente la identificación de los granos de polen. Hay que señalar, en contrapartida, que algunas esporas de hongos se rompen y no pueden ser estudiadas con precisión con esta metodología, ya que se obtienen valores por debajo de los reales. Si se quiere obtener una lectura representativa de una muestra Cour deben seguirse las indicaciones propuestas al describir la metodología^{10,11}.

Cuando se trabaja con un captador Cour, es necesario disponer de un anemómetro totalizador, aparato dotado de unas cazoletas, que giran impulsadas por el viento reinante y están conectadas a un cuentakilómetros. Este aparato registra los metros equivalentes al espacio recorrido por el aire que pasa a través de sus cazoletas. La medida del recorrido de viento correspondiente al período de exposición de un filtro hace posible interpretar la cantidad

de pólenes y esporas por unidad de volumen (se considera que los pólenes y esporas estaban en el interior de un prisma que tiene por base el filtro de 20x20 cm² y por altura la columna de aire que ha pasado durante la exposición).

Los resultados que se obtienen de un captador Cour (datos brutos) son convertidos a concentraciones medias semanales de pólenes y esporas (pólenes/m³ y esporas/m³) mediante un cálculo matemático en el que intervienen:

- El número de partículas contadas (N).
- La proporción de sedimento analizado (siempre 50 micrólitros (K₁)) respecto del volumen total de sedimento semilíquido (V) obtenido al final del tratamiento.
- La proporción de filtro tratado (S) respecto a la superficie total del filtro (400 cm²), ya que una parte de él se guarda como testigo por si fuera necesario repetir el tratamiento.
- La superficie de muestra analizada al microscopio óptico. Para calcularla se necesita conocer el número (n) de líneas contadas y su longitud (K₂) y anchura (K₃) (ambas dependen del microscopio y del objetivo que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K₄).
- El recorrido de viento registrado durante el período de exposición (Rv).

La combinación de estos factores, multiplicativos o cocientes según los casos, da lugar a una fórmula matemática que, aplicada a los datos brutos correspondientes a cada semana, nos permite obtener el valor de la concentración media semanal.

La fórmula a aplicar en el caso de la metodología Cour es:

$$\text{Concentración media semanal} = K \times (N \times V / n \times S \times Rv)$$

- Donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (K₁ a K₄).
- Debe tenerse la precaución de utilizar las unidades de medida oportunas (V debe expresarse en micrólitros; S en metros cuadrados y Rv en metros)

Por tanto, los resultados que se obtienen a partir de un captador Cour son concentraciones medias semanales de pólenes y esporas (éstas, como ya se ha indicado, infraestimadas por la inevitable destrucción de parte de ellas durante la preparación de las muestras).

Diversos autores han realizado estudios comparativos de datos obtenidos con captadores de metodologías diversas, entre ellos de las metodologías Hirst y Cour¹²⁻¹⁵. En el seminario se presentarán los principales resultados y conclusiones obtenidos en un estudio¹⁵ que se está llevando a cabo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Belmonte J, Roure JM. Introducción (Métodos de muestreo). En Valero AL, Cadahía A, eds. Polinosis. Polen y Alergia. MRA ediciones SL- Laboratorios Menarini SA, Barcelona. 2002: 7-16.
2. Mandrioli P, Comtois P, Dominguez E, Galan C, Syzdek LD, Isard SA. Sampling: Principals and Techniques. En Mandrioli P, Comtois P, Levizzani L, eds. Methods in Aerobiology. Pitagora Editrice, Bologna. 1998: 47-68.
3. Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. Ann Appl Biol 1952; 39: 257-265.
4. Cour P. Nouvelles techniques de détection des flux et des retombées polliniques: étude de la sédimentation des pollens et des spores à la surface du sol. Pollen et spores 1974; 16: 103-141.
5. Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Introducción en la captación e identificación de los pólenes. SEAIC-Almirall Prodesfarma: 6-9.
6. Domínguez E, Galán C, Villamandos F & Infante F. Handling and evaluation of the data from the aerobiological sampling. Monografías REA/EAN, 1992; 1: 1-18.
7. Cour P. Nouvelles techniques de détection des flux et des retombées polliniques: étude de la sédimentation des pollens et des spores à la surface du sol. Pollen et spores 1974; 16: 103-141.
8. Belmonte J. Identificació, estudi i evolució anual del contingut pol·línic a l'atmosfera de Catalunya i Balears. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 1988; 1: 11-14.
9. Erdtman G. The acetolysis method. A revised description. Sv Bot Tidskr 1960; 54: 561-564.
10. Cambon G. Relations entre le contenu pollinique de l'atmosphère et le couvert vegetal en Méditerranée occidentale à Montpellier (France), Valencia (Espagne) et Oran (Algerie). Tesis doctoral. Université Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, 1981.
11. Gros R. Contrôle de validité des analysis sporo-polliniques. Rev Paléobiol 1984; vol. special: 85-95.
12. Durand L, Comtois P. A comparative study between the Cour and the Burkard samplers. En Comtois P ed. Aerobiology-Health Environment. Montréal, Canada. 1989: 93-101.
13. Belmonte J, Canela M, Guàrdia RA. Comparison between categorical pollen data obtained by Hirst and Cour sampling methods. Aerobiologia 2000; 183-191.
14. Tomás C, Candau P, González Minero FJ. A comparative study of atmospheric pollen concentrations collected with Burkard and Cour samplers, Seville (Spain), 1992-1994. Grana 1997; 36: 122-128.
15. Farrera I, Calleja M, Belmonte J, Almeras T, Plaisant I. Atmospheric pollen survey: a metrological study between Hirst and Cour sampling methods. En preparació.