

## Normalización del método volumétrico tipo Hirst para redes aerobiológicas CEN/C264/WG39

Thibaudon M<sup>1</sup>, Monnier S<sup>1</sup>, Galán C<sup>2</sup>, Bonini M<sup>3</sup>, Röseler S<sup>4</sup>, Fernández González D<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>RNSA. Francia, <sup>2</sup>Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Universidad de Córdoba, <sup>3</sup>Dipartimento di Prevenzione medica. ATS Milano, <sup>4</sup>Universitätsklinikum Aachen, <sup>5</sup>Dpto. Biodiversidad y Gestión ambiental. Universidad de León, <sup>6</sup>Istituto di Sciences dell'Atmosfera e del clima (CNR). Bologna  
*delia.fernandez@unileon.es*

### INTRODUCCIÓN

La Aerobiología estudia microorganismos y partículas de origen biológico transportadas pasivamente por el viento<sup>1</sup>, entre las cuales se encuentran el polen y las esporas de hongos que causan impacto en la salud. La Aerobiología tiene numerosas aplicaciones. Además de la prevención de alergias respiratorias, esta disciplina se usa para conocer el pronóstico de cosechas y control de plagas en agricultura<sup>2</sup>, en estudios de biodiversidad e impacto del cambio climático<sup>3</sup>, conservación preventiva del patrimonio cultural<sup>4</sup>, paleoecología, ciencias forenses, entre otras.

El desarrollo de nuevas tecnologías para el muestreo aerobiológico ha sido uno de los principales retos en la investigación de la atmósfera. A lo largo de los años, numerosísimos equipos de muestreo, metodologías y procedimientos operativos se han utilizado para el análisis de partículas biológicas, pero en el caso del polen transportado por el aire, el captador volumétrico tipo Hirst<sup>5</sup> es el más usado en el mundo<sup>6</sup>.

La European Aerobiology Society (EAS), en coordinación con la International Association of Aerobiology (IAA), estudian los problemas de muestreo, análisis, control de calidad, desarrollo e información sobre polen y esporas fúngicas<sup>7</sup>. En Europa, alrededor del 20 % de la población sufre polinosis causada por las mismas y, actualmente estas partículas son consideradas contaminantes del aire<sup>8</sup>, igual que otras partículas suspendidas en el aire (PM10, 2,5).

Dada la incidencia que tienen actualmente las enfermedades alérgicas y con el fin de poder comparar la información sobre las concentraciones de polen y esporas generadas por las distintas redes aerobiológicas existentes en Europa, AFNOR propuso una Norma Europea (EN), que especifica el procedimiento a seguir para el muestreo y el análisis continuo de la concentración de dichas partículas en la atmósfera. Para ello se ha propuesto el uso de un captador volumétrico tipo Hirst o algún método equivalente, que asegure datos comparables.

El documento técnico, basado en la norma UNI italiana<sup>9</sup> y en el Manual de la Red Española de Aerobiología<sup>10</sup>, fue redactado por un Comité de Expertos creado al respecto: CEN/TC 264 "Calidad del aire" y aprobado como prEN 16868 (CEN/TS 16868, 2015) para su aplicación provisional. El período de validez del mismo, se limita inicialmente a tres años. Después de dos años, se solicitarán alegaciones a los miembros del CEN, sobre dicho documento técnico para analizar si puede convertirse en una norma europea.

Por lo tanto, el objetivo de dicha prEN, es especificar el procedimiento de muestreo continuo y el análisis de la concentración de polen y esporas fúngicas en el aire, para su aplicación concreta en las redes relacionadas con las alergias respiratorias. Para otros tipos de investigación, mencionadas en la introducción, pueden ser necesarias especificaciones diferentes.

### BASE METODOLÓGICA

El aire es muestreado por un sistema volumétrico de succión y dirigido hacia una superficie de muestreo (recubierta adecuadamente de una sustancia adhesiva) a través de un orificio específico orientado hacia el viento. Las partículas contenidas en el aire se depositan por impacto sobre la superficie receptora que está en movimiento continuo. Posteriormente se examina la superficie muestreada con un microscopio óptico para identificar y contar el polen y las esporas de hongos por área (tasas de deposición). El uso de este método permite calcular las concentraciones como una media diaria o una media de 2 horas. El muestreo se realiza normalmente con un flujo de 10 L/min y el sistema permite un muestreo continuo de hasta siete días.

Figura 1: Imagen del captador volumétrico esporopolínico tipo hirst



**MUESTREO**

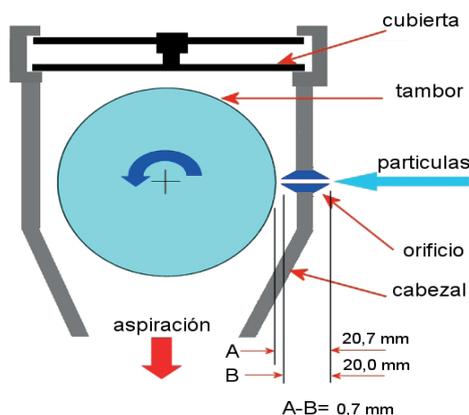
Equipo: Captador tipo Hirst. El sistema de muestreo completo (Figura 1) consiste en una bomba de aspiración y un cabezal con orificio de entrada de aire, tambor de impacto (giratorio), veleta, sistema de relojería. El aparato debe permanecer siempre horizontal (especialmente el cabezal) y deberá ser resistente a la corrosión.

Bomba de aspiración. Funcionará 24 horas al día de forma continua y siempre con el mismo caudal. La fuente de alimentación puede ser la red eléctrica o una batería (paneles solares) y el caudal de aspiración se ajustará mediante una válvula de control de flujo y la recomendación es de 10 L/min con un error aceptable de precisión y exactitud inferior al 10 % ( $\pm 1$  L/min).

La validez del método de calibración, con un error inferior al 10 %, deberá ser certificada por el fabricante.

El nivel del flujo será comprobado en cada cambio del tambor con un caudalímetro validado.

Figura 2. Esquema del cabezal del captador tipo Hirst



Cabezal (Figura 2). El orificio de entrada de aire tendrá las siguientes dimensiones (con tolerancias asociadas): a) abertura rectangular: 14 mm ( $\pm 0,1$  mm)  $\times$  2 mm ( $\pm 0,1$  mm); b) profundidad del orificio: 20 mm; c) distancia de la parte interior del orificio al tambor sin la cinta adhesiva: 0,70 mm ( $\pm 0,1$  mm).

La profundidad del orificio permite un flujo laminar y dirige la mezcla de aire y partículas hacia el tambor. El orificio siempre debe estar dirigido en la dirección del viento, usando una veleta.

Tambor (de 110 a 112 mm de diámetro) sobre el que se fija una cinta flexible transparente revestida de sustancia adhesiva. La longitud de esta cinta oscila entre 345 y 350 mm (+/- 0,5 mm) dependiendo de la circunferencia del tambor.

El tambor se desplazará regularmente delante de la salida posterior del orificio durante siete días de muestreo. El muestreo será continuo y estable y no se detendrá durante el período que se determine.

Cinta transparente. La cinta transparente no debe ser higroscópica y el espesor de la misma no podrá variar con el tiempo y no se modificará por las condiciones ambientales (temperatura entre - 20 °C a + 60 °C o humedad entre 20 % y 100 %).

Sustancias adhesivas. Se podrán utilizar dos productos de recubrimiento transparente (solubilizados en disolventes específicos o no): vaselina (petrolatum) o fluido de silicona. Las propiedades físicas del medio adhesivo deberán permanecer inalterables a temperaturas comprendidas entre - 20 °C y + 50 °C, para que sean adecuadas en la mayoría de las zonas climáticas europeas.

La superficie de captura se cubrirá con una fina capa homogénea del medio elegido, asegurando la retención eficaz de las partículas.

El soporte estará protegido del aire durante el transporte y permanecerá en una caja metálica para evitar los choques. La conservación a temperatura ambiente no excederá de 12 meses para la silicona y de un mes para la vaselina (petrolatum).

Posición del Captador. La ubicación de los captadores se deberá realizar bajo ciertas condiciones:

- Se colocará sobre una superficie horizontal, plana y de fácil acceso, en un tejado o terraza de un edificio y alejado de los bordes más de 2 m, con el fin de reducir el efecto de las turbulencias.

- No deben existir pantallas arquitectónicas que impidan la llegada de masas de aire procedentes de cualquier dirección. La altura sobre el nivel del suelo depende de la ciudad y de la altura de los edificios próximos.
- Deberá estar elevado entre 100 cm y 150 cm de la superficie para evitar la turbulencia del aire y la posible resuspensión de las partículas depositadas en dicha superficie.
- Alejarlo de fuentes fijas o móviles de emisión masiva de partículas bióticas y abióticas.

## ANÁLISIS

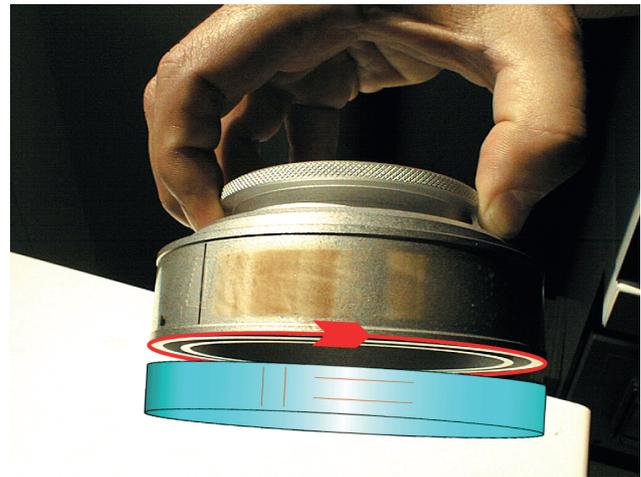
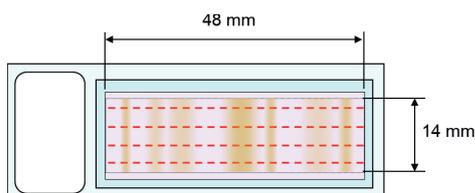
Los análisis de las muestras se realizarán al microscopio óptico, siguiendo un protocolo concreto desde el montaje de las preparaciones, al cálculo de la concentración de polen y esporas.

Montaje de las preparaciones. La preparación de los portaobjetos para el análisis microscópico se realizará a temperatura ambiente, tan pronto como sea posible y siempre en menos de 14 días después de retirar el tambor del captador.

La cinta transparente, una vez seccionada en porciones correspondientes a un día, se incluirá a modo de "sándwich" entre un portaobjetos y un cubreobjetos con un agente fijador y un colorante específico. Los agentes de fijación apropiados son glicerina/gelatina, glicerina simple, mezclas específicas que contienen alcohol polivinílico u otros productos listos para usar. Para el polen, los agentes de tinción serán fucsina o safranina.

Método de lectura (Figura 3). La lectura de las muestras se puede realizar mediante barridos paralelos horizontales o verticales. Puesto que el área que se examinará depende del tamaño del campo de visión del microscopio y de los aumentos utilizados, se deberá definir un número mínimo de segmentos (horizontales o verticales) que garantice al menos un 10 % de superficie examinada de cada portaobjetos. Se recomienda la lectura de campos paralelos horizontales, ya que la deposición de las partículas no es uniforme en el tiempo.

Figura 3. Imagen de un tambor muestreado y esquema del método de lectura recomendado.



**Recuento.** Los portaobjetos con las muestras diarias se examinarán al microscopio óptico, con un aumento variable, que nos permita distinguir y diferenciar fácilmente cada tipo polínico o de esporas fúngicas. Bajos aumentos pueden incrementar el error de identificación, pero aumentos grandes requieren una mayor área de lectura. Se recomienda usar objetivos de 400 aumentos.

**Factor de conversión.** Los recuentos de polen o esporas de hongos deberán expresarse como un promedio diario de concentración (número de partículas por metro cúbico de aire). Para ello se multiplicará el número de polen o esporas contadas, por un factor obtenido a partir del volumen de aire muestreado (10 L/min), del área de lectura y del tamaño del campo de visión del microscopio.

## GESTIÓN DE LA SUPERVISIÓN DE LA RED

Finalmente, los datos de todas las estaciones de muestreo serán almacenados permanentemente y de forma segura, en una base de datos depositada en un centro coordinador de una red nacional, que tendrá la obligación de verificar la validez de los mismos. La validación de los datos deberá ser comunicada a las estaciones. En cooperación con hospitales y centros clínicos especializadas, el centro coordinador de la red deberá adaptar periódicamente el espectro de los tipos de polen considerados como relevantes desde el punto de vista alérgico.

Se deberán hacer esfuerzos constantes para promover redes de monitorización de polen y esporas fúngicas en todo el continente europeo.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Mandrioli P, Ariatti A. Aerobiology: futurecourse of action. *Aerobiologia*. 2001; 17:1-10.
2. García-Mozo H. The use of aerobiological data on agronomical studies. *Ann Agric EnvironMed*. 2011; 18:1-6.
3. Smith M et al. Geographic and temporal variations in pollen exposure across Europe. *Allergy*. 2014; 69:913-23.
4. Mandrioli M, Caneva C, Sabbioni C. Cultural Heritage and Aerobiology. 2003; 243 pp. Kluwer Academic Publishers. London.
5. Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. *Ann App Biol*. 1952; 39:257-65.
6. Buters J. Pollen allergens and geographical factors; in Akdis C, Agache I (eds). *Global Atlas of Allergy*. Zurich. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 1:36-7.
7. Galán C, et al. Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis. *Aerobiologia*. 2014; 30:385-95.
8. Fröhlich-Nowoisky J, et al. Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. *Atmospheric Research*. 2016;182:346-76.
9. UNI 11108. «Air quality; Method for sampling and counting airborne pollen grains and fungal spores» 2004. Italy.
10. Galán C, Cariñanos P, Alcázar P, Domínguez E. *Manual de Calidad y Gestión de la Red Española de Aerobiología*; 2007. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.