

¿Cuantificación de aeroalérgenos polínicos o recuentos de granos de polen?

Airborne pollen allergen quantification or pollen grain counts?

Quantificação de alergénicos polínicos ou contagem de grãos de pólen?

Stella Moreno-Grau, Belén Elvira-Rendueles, Jose M^a Moreno

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial. Universidad Politécnica de Cartagena. C/Dr. Fleming sn. 30202. Cartagena.

Cita: Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno JM. ¿Cuantificación de aeroalérgenos polínicos o recuentos de granos de polen? Rev. salud ambient. 2017; 17(2):165-175.

Recibido: 30 de octubre de 2017. **Aceptado:** 15 de noviembre de 2017. **Publicado:** 15 de diciembre de 2017.

Autor para correspondencia: Stella Moreno Grau.

Correo e: stella.moreno@upct.es

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. C/Dr. Fleming sn. Universidad Politécnica de Cartagena. 30202. Cartagena. (Murcia).

Financiación: Proyectos CICYT BOS 2000-0563; BOS 2003-06329 y CGL2006-15103.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

Existe un consenso generalizado sobre la necesidad de conocer la aeropalinoología local para poder comprender de modo adecuado la polinosis y realizar un diagnóstico etiológico correcto. Por otro lado, los datos aerobiológicos suministrados por las redes de vigilancia permiten implantar medidas eficaces para evitar la exposición.

La caracterización aeropalinoológica del aerosol atmosférico se realiza tradicionalmente mediante el muestreo volumétrico de las partículas en suspensión en la atmósfera y posterior recuento de los tipos polínicos y fúngicos presentes en las muestras. Uno de los métodos de muestreo más utilizado se basa en el propuesto por Hirst en 1952. La correcta identificación de los tipos polínicos y fúngicos en las muestras requiere una formación altamente especializada, para poder reconocer las características morfológicas que permiten la adecuada adscripción a un tipo polínico o fúngico.

A lo largo de las últimas décadas del siglo XX fueron apareciendo en publicaciones científicas datos que dirigieron el interés de los investigadores hacia la cuantificación de los alérgenos polínicos. Además, se ha señalado la falta de relación encontrada entre los recuentos de granos de polen y los síntomas de la polinosis (rinitis, conjuntivitis y el asma). Por otro lado, existe una controversia alrededor del tamaño de los granos de polen y su posibilidad de penetrar profundamente en las vías respiratorias. Este conjunto de evidencias propiciaron la introducción del concepto de carga alérgica y la necesidad de su cuantificación en el aerosol atmosférico.

Son muchos los esfuerzos que se han realizado en este sentido, en este trabajo complementaremos nuestra experiencia en el tema con una revisión de la bibliografía publicada, tratando de examinar si se puede contestar a la pregunta formulada por Beggs ya en 1998; ¿qué hay que considerar el polen o los alérgenos polínicos?. El análisis del tema permite evidenciar que no siempre hay una correlación estrecha entre los recuentos de granos de polen y la carga alérgica, en algunos casos este comportamiento es fácilmente justificable y era previsible, en otros casos las razones no son tan evidentes. Sin embargo, hasta el momento no todos los aeroalérgenos han podido ser cuantificados en el bioaerosol, por lo que todavía no nos encontramos en condiciones de sustituir los recuentos aeropalinoológicos tradicionales y se requiere seguir investigando en este campo para poder desarrollar una metodología de toma de muestras y cuantificación de aeroalérgenos que pueda ser implementada en las redes de vigilancia aerobiológica de la atmósfera. Siguiendo con la revisión bibliográfica realizada se apuntan otras opciones posibles para los estudios aerobiológicos y se recoge la opinión de los autores sobre sus posibilidades de futuro.

Palabras clave: Aerobiología; granos de polen; esporas de hongos; aeroalérgenos.

Abstract

There is a generalized consensus about the need to know the local aeropalynology in order to be able to properly understand pollinosis and make a correct etiological diagnosis. On the other hand, the aerobiological data provided by monitoring networks allow effective measures to be taken to prevent exposure.

The aeropalynological characterization of the atmospheric aerosol is traditionally carried out by sampling by volume the particles suspended in the atmosphere and subsequently counting the pollen and fungus types present in the samples. One of the most commonly used sampling methods is based on the one proposed by Hirst in 1952. The correct identification of the pollen and fungus types present in the samples requires an important, previous education and training so as to be able to recognize the morphological features that would lead to a correct identification of the former.

In the last decades of the 20th century data began to appear in scientific publications that drew the interest of researchers to the quantification of pollen allergens. In addition, the lack of a link between pollen grain counts and pollinosis symptoms (rhinitis, conjunctivitis and asthma) has been pointed out. On the other hand, there is controversy around the size of pollen grains and their likelihood to penetrate deeply into the respiratory tract. All this evidence led to the introduction of the concept of allergen load and the need to quantify it in the atmospheric aerosol.

A lot of work has been done in this regard. In this paper we will supplement our experience in the subject matter with a review of the published literature in an attempt to determine whether we can answer the question posed by Beggs back in 1998: do we have to take pollen or pollen allergens into account? The analysis of the subject matter shows that there is not always a close correlation between pollen grain counts and the allergen load. In some cases, this behavior was expected and can be explained easily; in others, the reasons are not as clear. However, it has not been possible up until now to quantify all of the airborne allergens that are present in the bioaerosol. Thus, we are not ready to replace traditional aeropalynological counts yet and need to keep researching in this field to be able to develop a airborne allergen sampling and quantification methodology that can be implemented in aerobiological atmosphere monitoring networks. Based on the literature review we have conducted, we propose other possible avenues for aerobiological studies and voice our opinions about their future prospects.

Keywords: Aerobiology; pollen grains; fungal spores; airborne allergens.

Resumo

Existe um consenso generalizado sobre a necessidade de conhecer a aeropalinologia local para poder compreender de modo adequado a polinose e realizar um diagnóstico etiológico correto. Por outro lado, os dados aerobiológicos fornecidos pelas redes de vigilância permitem implementar medidas eficazes para evitar a exposição.

A caracterização aeropalinológica do aerossol atmosférico realiza-se tradicionalmente através da amostragem volumétrica de partículas em suspensão na atmosfera e posterior contagem dos tipos polínicos e fúngicos presentes nas amostras. Um dos métodos de amostragem mais utilizado baseia-se no proposto por Hirst em 1952. A correta identificação dos tipos polínicos e fúngicos nas amostras requer uma importante formação prévia, que permita reconhecer as características morfológicas necessárias a uma correta identificação.

Ao longo das últimas décadas do século XX foram surgindo em publicações científicas dados que direcionaram o interesse dos investigadores para a quantificação de alérgenos polínicos. Além disso, assinalou-se a falta de relação encontrada entre as contagens de grãos de pólen e os sintomas de polinose (rinites, conjuntivites e asma). Por outro lado, existe uma controvérsia em redor do tamanho dos grãos de pólen e a sua possibilidade de penetrar profundamente nas vias respiratórias. Este conjunto de evidências propiciou a introdução do conceito de carga alérgica e a necessidade da sua quantificação no aerossol atmosférico.

São muitos os esforços que se realizaram nesse sentido, neste trabalho complementaremos a nossa experiência neste tema com uma revisão da bibliografia publicada, apreciando se é possível responder à pergunta formulada por Beggs já em 1998; "O que se deve considerar, o pólen ou os alérgenos polínicos?". A análise do tema permite evidenciar que nem sempre há uma correlação estreita entre as contagens de grãos de pólen e a carga alérgica, em alguns casos esta situação é facilmente justificável e era previsível, em outros casos as razões não são tão evidentes. Porém, até ao momento nem todos os aeroalérgenos podem ser quantificados no bioaerossol, pelo que não nos encontramos em condições de substituir as contagens aeropalinológicas tradicionais, sendo necessário dar continuidade à investigação neste campo no sentido de se desenvolver uma metodologia de colheita de amostras e quantificação de aeroalérgenos que possam ser implementadas nas redes de vigilância aerobiológica da atmosfera. Em consequência da revisão bibliográfica realizada registam-se outras opções possíveis para os estudos aerobiológicos e recolhe-se a opinião de outros autores sobre as possibilidades futuras.

Palavras-chave: Aerobiologia; grãos de pólen, esporos de fungos; aeroalérgenos.

INTRODUCCIÓN

La vigilancia de la calidad del aire es la pieza clave para el control de la contaminación atmosférica. Esta vigilancia se centra en la caracterización de las sustancias gaseosas, sólidas y líquidas presentes en el aire. El conjunto de sustancias en estado sólido y líquido en suspensión en el aire, recibe el nombre de aerosol atmosférico¹, y por su origen puede ser abiótico (sustancias orgánicas o inorgánicas que no proceden de los seres vivos) y biótico (sustancias que proceden de los seres vivos). Dentro del aerosol abiótico se puede estudiar la materia particulada sedimentable, los denominados depósitos (partículas con altas velocidades de sedimentación, con tiempos cortos de permanencia en la atmósfera) y aerosol en suspensión. La Legislación europea introduce valores límite ambientales para muchas sustancias en la fase gaseosa y para el aerosol abiótico (PM10, PM2.5, determinados metales, etc.). Sin embargo, no hay legislación sobre los contaminantes de origen biológico. De hecho la ley 34/2007 de calidad del aire y protección de la atmósfera² excluye de su ámbito de aplicación (artículo 2) entre otros, a este tipo de contaminantes, para los que indica que se regirán por su normativa específica.

Como en todo problema ambiental, una parte importante de la política de prevención parte de la base de contar con redes de vigilancia que aporten datos sobre los niveles de calidad del aire. Es decir, ser capaces de responder a las preguntas ¿qué hay? y, ¿cuánto hay?.

Para la comprensión y control de la polinosis y poder realizar un diagnóstico etiológico correcto es necesario conocer la aeropalinología local³, por ello, una herramienta básica es la vigilancia aerobiológica de la atmósfera. Así, los recuentos de granos de polen son una instrumento de trabajo imprescindible para los alergólogos⁴, pues permite identificar o confirmar los tipos polínicos causantes de polinosis en cada área geográfica. A partir de los datos aerobiológicos se pueden emprender, y cesar, acciones y tratamientos preventivos, planificar actividades, como pueden ser excursiones o viajes, aconsejar sobre la elección de flora en parques y jardines, acondicionamiento arquitectónico en interiores, etc.^{5,6}.

La caracterización aeropalinológica del aerosol atmosférico se realiza tradicionalmente mediante el muestreo volumétrico de las partículas atmosféricas y posterior recuento de los tipos polínicos y fúngicos presentes en las muestras. Se han desarrollado diversas metodologías tanto de muestreo, como para el manejo de la muestra, todas ellas dirigidas a obtener una preparación que pueda ser observada a microscopía

óptica. El método de muestreo más utilizado se basa en el propuesto por Hirst en 1952⁷. La correcta identificación de los tipos polínicos y fúngicos en las muestras requiere una formación previa altamente especializada, para poder reconocer las características morfológicas que permiten la adecuada adscripción a un tipo polínico o fúngico. Siendo estas metodologías, además, altamente consumidoras de tiempo⁸⁻¹¹.

A principios de la década de los años 90, cuando los recuentos aerobiológicos de la ciudad de Barcelona fueron asumidos por el laboratorio del Ayuntamiento de la ciudad, nuestra maestra en el mundo de la Aerobiología, la Dra. Suárez-Cervera inició una línea de trabajo centrada en aspectos relacionados con la biología del polen, y, en la identificación del momento de aparición y la localización de las proteínas alergénicas durante estos procesos. Así, tras un primer proyecto de su grupo de investigación financiado por la CICYT (PB93-0755) denominado: "Estudio del pollenkitt en granos de polen anemófilos y entomófilos: Potencial alergógeno; papeles en el reconocimiento polen-estigma y en la atraktividad de insectos polinizadores", empezamos a colaborar en un segundo proyecto, también financiado por la CICYT (PB96-0393) denominado "El papel del pollenkitt en los procesos de activación y germinación del grano de polen". En estos estudios se pudo poner de manifiesto la aparición de proteínas alergénicas en los procesos de activación, maduración y germinación del grano de polen.

Paralelamente, a lo largo de las últimas décadas del siglo XX fueron apareciendo en publicaciones científicas datos que dirigieron el interés de los investigadores hacia la cuantificación de los alérgenos polínicos, por ejemplo:

- La presencia en el bioaerosol de fracciones alergénicas menores que el grano de polen, partículas que han recibido el nombre de paucimicrónicas, y que han sido encontradas en el aire antes, durante y después de las estaciones polínicas¹²⁻¹⁴ y la aparición de síntomas alérgicos en estos periodos.
- La actividad antigénica y la presencia de alérgenos polínicos en otras partes de las plantas^{15,16}.
- La falta de relación encontrada entre los recuentos de granos de polen y el asma¹⁷, o el conjunto de las sintomatologías alérgicas de la polinosis¹⁸.
- La controversia alrededor del tamaño de los granos de polen y su posibilidad de penetrar profundamente en las vías respiratorias^{14,18}, poniendo en duda su participación como agente etiológico del asma.

Todas estas evidencias que se fueron publicando dieron lugar a la aparición del concepto de carga alérgica, y a la propuesta a los aerobiólogos de Rantio-Lehtimäki et ál.¹⁹ para realizar un nuevo esfuerzo tendente a la cuantificación de los aeroalérgenos en el bioaerosol atmosférico.

CONCEPTO DE AEROSOL TORÁCICO

Acabamos de señalar la controversia alrededor del tamaño de los granos de polen y su capacidad de penetrar profundamente en las vías respiratorias. Como el interés del muestreo de los aerosoles está frecuentemente motivado por sus posibles efectos en la salud humana, se han definido unos rangos de tamaño de partículas relevantes desde el punto de vista de la salud, entre ellas la fracción torácica, aquella parte de las partículas inspiradas que es capaz de penetrar en el tracto respiratorio más allá de la laringe¹. En torno al concepto de aerosol torácico se producen importantes confusiones, por lo que consideramos importante explicar algunos aspectos.

Antes de continuar conviene decir que en la disciplina Ciencia de los Aerosoles se utilizan con frecuencia diámetros equivalentes, en los párrafos siguientes nos referiremos al diámetro aerodinámico equivalente (d_{ae}). Es decir, el diámetro de la partícula esférica de densidad 1 g/cm^3 con la misma velocidad de sedimentación que la partícula estudiada. Lo que significa que una partícula de $15 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro real y densidad $0,5 \text{ g/cm}^3$, tendrá un d_{ae} de $10,6 \text{ }\mu\text{m}$, mientras que si tiene una densidad de 2 g/cm^3 , tendrá un d_{ae} de $21,2 \text{ }\mu\text{m}$. Tengamos en cuenta que el grano de polen tiene una propiedad denominada harmomegacia, el proceso por el cual los granos de polen y las esporas cambian de forma para adaptarse a las variaciones en el volumen del citoplasma causadas por el cambio de hidratación²⁰. Según McCrone et ál.²¹ la densidad del grano de polen varía entre $0,5\text{-}1,1 \text{ g/cm}^3$, por lo que su diámetro aerodinámico equivalente no tiene por qué coincidir con el diámetro que observamos al microscopio, pudiendo variar desde diámetros menores a mayores al observado.

En el primer informe de ISO del año 1981 se indica la existencia de alguna dificultad para poder llegar a un criterio cuantitativo definitivo de aerosol torácico. Uno de los problemas involucraba la pregunta de cómo decidir qué valor para el diámetro aerodinámico equivalente (d_{ae}) es el más apropiado para describir el 50 % de la masa de las partículas que penetran más allá de la laringe, en estos momentos iniciales 10 o $15 \text{ }\mu\text{m}$. Finalmente, se adoptó una curva que describe la penetración de las partículas inspiradas hasta más allá de la laringe en

función del d_{ae} . Curva que tiene la forma de una función lognormal acumulativa (figura 1.a), con la mediana en el valor de $10 \text{ }\mu\text{m}$ para el d_{ae} y una desviación estándar geométrica de $1,5^1$.

Estos valores del convenio ISO 7708 para el aerosol torácico aparecen tabulados en el Anexo A de la norma UNE EN 12341:1999²², Convenio de muestreo PM10 (actualmente derogada). Si en vez de representar el % de masa acumulada, representamos el % de masa vs. diámetro aerodinámico equivalente, tendríamos la curva que se recoge en la figura 1.b. En ella, podemos comprobar cómo, en masa, el porcentaje de materia particulada en suspensión (MPS) es prácticamente el mismo para $4 \text{ }\mu\text{m}$ (3,6 %) que para $15 \text{ }\mu\text{m}$ (3,7 %).

Por otro lado, el criterio de aerosol torácico está adoptado en unas condiciones determinadas, que implican la respiración por la nariz. Pero, ¿respiramos todos y siempre por la nariz?. La variabilidad individual y los diferentes hábitos respiratorios han sido evidenciados en diferentes trabajos²³⁻²⁴.

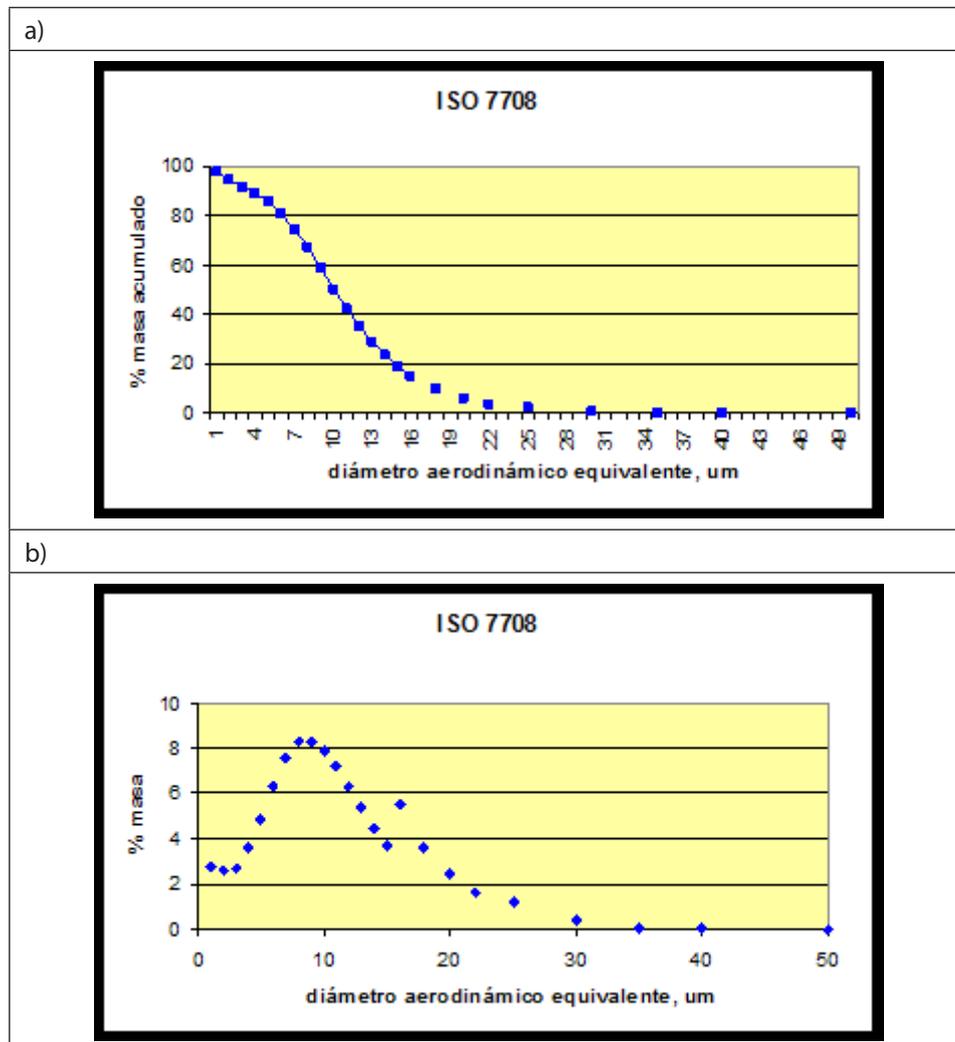
Por lo tanto, desde nuestro punto de vista, la afirmación extendida de que el grano de polen es demasiado grande para penetrar profundamente en el tracto respiratorio debe ser matizada y entendida en los términos teóricos a los que nos hemos referido.

Además, los alérgenos son proteínas hidrosolubles que están implicadas en los procesos de reconocimiento polen-estigma, la germinación del grano de polen y la fecundación²⁵⁻²⁶. Durante la germinación del grano de polen estas proteínas aparecen en el medio que circunda al grano de polen. Por lo que una germinación abortiva, producida como consecuencia de la hidratación del grano de polen, por ejemplo en la mucosa nasal de un individuo sensible, podría liberar las proteínas alérgicas y ser resuspendidas en la corriente de aire inspirado, pudiendo así penetrar hasta regiones más profundas.

CUANTIFICACIÓN DE AEROALÉRGENOS POR MÉTODOS INMUNOANALÍTICOS CON ANTICUERPOS MONO O POLICLONALES

Nuestro grupo de trabajo obtuvo financiación para la cuantificación de aeroalérgenos en el año 2000 (CICYT BOS 2000-0563 Universidad de Barcelona y Universidad Politécnica de Cartagena y la colaboración de la empresa BIAL-Arístegui) y posteriormente en los proyectos BOS 2003-06329 (UB y UPCT) y CGL2006-15103 (UB, UPCT, U. de León y U. de Vigo). En esta revisión vamos a complementar nuestra experiencia en el tema con una revisión de la bibliografía publicada, tratando de

Figura 1. a) Convenio de muestreo PM10, ISO 7708 Porcentaje acumulado de masa % vs. diámetro aerodinámico equivalente (Valores tomados del anexo A de la norma UNE EN 12341:1999²⁰). b) Porcentaje de masa vs. diámetro aerodinámico equivalente



contestar a la pregunta formulada por Beggs¹⁷ en 1998; ¿qué hay que considerar el polen o los alérgenos polínicos?, recorriendo el camino indicado por Cecchi²⁷: De los recuentos de polen a la potencia del polen.

Hay que indicar que se han hecho importantes esfuerzos para cuantificar los alérgenos en el bioaerosol. Tanto para la toma de muestra como para su manejo y métodos de cuantificación se encuentran diversas alternativas. En la bibliografía podemos encontrar trabajos en los que para la toma de muestra se han utilizado captadores tanto de alto como de bajo volumen^{8, 28-37}. A su vez, se han podido utilizar metodologías con o sin fraccionamiento de tamaño^{19,32,33,38-46}.

En cuanto a la metodología de preparación de la muestra, la más extendida es la elución de la muestra y arrastre de las proteínas solubles^{8,19,28,36,37,39,47}, pero hay trabajos en los que se ha utilizado la transferencia a membrana^{36,41}. La cuantificación más extendida es por métodos inmunoanalíticos, sobre todo metodología de ELISA^{8,19,36,39,45,48-51}. También podemos encontrar trabajos en los que se hayan utilizado técnicas moleculares de identificación por ADN (PCR, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación masiva)⁵²⁻⁵⁴, algunos investigadores han utilizado la resonancia de plasmones superficiales^{43,55}. Recientemente, se han publicado algunos trabajos en los que se utiliza la citometría de flujo⁵⁶.

Una revisión bibliográfica sobre la cuantificación de los aeroalérgenos, realizada con anticuerpos bien monoclonales o policlonales, pero no con pool de sueros, muestra que los aeroalérgenos estudiados son Ole e 1^{8,37,57-60}; Par j 1 y Par j 2^{8,58,61}; Phl p 5^{33,44,62,70}; Bet v 1^{32,63-65}; Pla a 1^{58,66-68}; Pla l 1^{67,69}; Lol p 1^{51,58,71}; Fra e 1⁷²; Asp f 1⁷³. También hemos encontrado un trabajo en el que se cuantifica Cup a 1 por citometría de flujo⁵⁶, y la determinación por esta misma metodología de Bet v 1 ligada a partículas de PM10¹⁴.

En el inicio de nuestras investigaciones, nos planteamos cuantificar un panalérgeno, en nuestro caso la profilina Ole e 2. En este caso únicamente encontramos valores cuantificables del alérgeno en 4 de las muestras analizadas (datos no publicados). Esto nos llevó a hacer un cambio en el abordaje del problema y a derivar hacia la cuantificación de los alérgenos mayoritarios. En el proyecto BOS 2003-06329 nos propusimos cuantificar los aeroalérgenos Ole e 1; Par j 1-Par j 2; Pla a 1 y Cup a 1; en un segundo proyecto el CGL2006-15103 incluimos también Lol p 1. Pasemos a comentar brevemente los resultados.

Olea vs. OLE E 1

En nuestros estudios se observa en general una buena correlación entre los recuentos de granos de polen de *Olea* y las concentraciones de Ole e 1⁸. Este es el aeroalérgeno más estudiado, y este resultado coincide con lo publicado por De Linares et ál.⁵⁷, aunque estos autores analizan la carga alérgica fuera del periodo principal de polinización (PPP) y utilizan un impactador en cascada, encontrando actividad alérgica fuera del PPP, y presencia de alérgenos en fracciones menores que el grano de polen. Galán et ál.⁵⁹, encuentran que la correlación entre el alérgeno y los recuentos de granos de polen son mayores en Córdoba que en Évora, y también encuentran capacidad alérgica en fracciones del bioaerosol pequeñas.

En relación con la presencia de alérgenos en fracciones menores que el grano de polen, se ha evidenciado⁷⁴ la ruptura mecánica de los granos de polen de abedul inducida por el viento. Así que nos planteamos esta pregunta, aún hoy sin resolver. ¿No es posible que las tensiones a las que se someten los granos de polen en los impactadores en cascada pueda producir la ruptura de los granos de polen y liberación de proteínas? ¿Podría ser esta la causa de la presencia de Ole e 1 en las fracciones pequeñas del bioaerosol?.

Plaza et ál.⁶⁰ indican una buena correlación entre los recuentos de *Olea* y la concentración de Ole e 1, destacando en este estudio la variación de la potencia

alérgica del polen de año en año. Este hecho ya había sido puesto de manifiesto para abedul/Bet v 1³². En 2007 Fernández Caldas et ál.⁷⁵, estudiaron el contenido en Ole e 1 en 6 variedades de olivo a lo largo de 5 años, encontrando que la cantidad de alérgeno es diferente entre años. Diferencias que los autores relacionan con las precipitaciones del invierno de esos años. Nuestro grupo de trabajo también señaló este hecho³⁷, es decir, una correlación negativa entre el índice polínico anual y la concentración de Ole e 1, pero lo consideramos relacionado con el fenómeno de la vecería. En recientes trabajos se ha indicado la mayor o menor abundancia de compuestos fenólicos⁷⁶ y de intermediarios en los procesos de expresión genética⁷⁷⁻⁷⁸ que se asocian con la vecería del olivo.

URTICACEAE VS. PAR J 1-PAR J 2

Las correlaciones entre los recuentos de granos de polen del tipo polínico Urticaceae y los alérgenos Par j 1- Par j 2 son más bajas que en el caso de *Olea*, encontrando tanto momentos en los que los recuentos son mayores que los aeroalérgenos, y lo contrario⁸. Este es un comportamiento esperado, pues el tipo polínico Urticaceae comprende los granos de polen de *Urtica* y *Parietaria*, indistinguibles con los recuentos aerobiológicos tradicionales. Sin embargo, a pesar de ser dos géneros próximos, sus proteínas no presentan homología, teniendo *Parietaria* una alta prevalencia entre la población sensible, mientras que *Urtica* es considerado no alérgico. Es decir, hay momentos en el que los recuentos pueden hacer referencia únicamente a *Urtica*, por lo que no habrá alérgeno en las muestras, mientras que en otros, esté presente *Parietaria*, por lo que sí se podrá cuantificar el alérgeno en la muestra. Otro aspecto que se ha señalado es el incremento en la presencia del aeroalérgeno tras episodios de lluvia^{8,61}.

Platanus vs. PLA A 1

Con las primeras pruebas para cuantificar Pla a 1 nos encontramos con el problema de que no veíamos actividad alérgica en los extractos en los periodos de floración del *Platanus*. Por ello, se realizó una electroforesis en gel tanto del extracto como del resto sólido tras la centrifugación, obteniendo que el alérgeno permanecía en la fracción sólida (datos no publicados). Así pues se procedió a una modificación del método de extracción que permitió cuantificar también este alérgeno. La correlación entre los recuentos de granos de polen de *Platanus* y Pla a 1 difiere de una ciudad a otra, así en nuestros estudios es mayor en Orense que en Cartagena⁵⁸, encontrando en esta última ciudad que tras eventos de lluvia se incrementa la cantidad de alérgeno presente en el bioaerosol. En León la correlación

encontrada no es significativa⁶⁶. En el estudio realizado en Córdoba, se encuentra una muy buena correlación entre los recuentos y el alérgeno⁶⁸.

POACEAE VS. LOL P 1

Nuevamente se observa que la correlación entre los recuentos de granos de polen y la cuantificación de alérgenos difiere de una a otra localidad⁵⁸. Encontrando también una importante variación en la concentración de aeroalérgenos entre años diferentes⁵¹. También se señala el incremento en la concentración de alérgeno tras episodios de lluvia. Se justifica la presencia de alérgeno en periodos en los que no hay recuentos de granos de polen con la presencia de alérgenos homólogos al Grupo 1 de las Poaceae en otras partes de las plantas. Otros estudios⁷¹ señalan una buena correlación entre los recuentos de los granos de polen del tipo polínico Poaceae y la cuantificación de aeroalérgeno Lol p 1 durante el periodo principal de polinización.

CUPRESSACEAE VS. CUP A 1

Con los diferentes métodos de extracción que hemos usado en nuestros estudios, no ha sido posible extraer Cup a 1, por lo que no ha podido ser hasta el momento cuantificado. Tampoco hemos encontrado en la búsqueda bibliográfica realizada ningún estudio en el que se cuantifique Cup a 1 por la metodología ELISA utilizada en los trabajos que venimos comentando. Sin embargo, la búsqueda bibliográfica realizada ha identificado el trabajo de Moreno-Benitez et ál.⁵⁶, en el que cuantifican Cup a 1 por citometría de flujo, tras la resuspensión en agua del bioaerosol recogido con un ciclón Burkard con tampón fosfato, y la incubación de una alícuota con anticuerpo Cup a 1 policlonal de conejo, realizan una doble cuantificación, por un lado efectúan un recuento de granos de polen de *Cupressus*, y por otro, determinan la carga alérgica. La citometría de flujo les permite reconocer tres regiones, encontrando para dos de ellas importantes marcajes del anticuerpo de Cup a 1 de conejo. Los autores separan estas regiones por centrifugación, estudiando cada una de ellas por microscopía confocal y de fluorescencia. Mostrando que una de las regiones está formada por los granos de polen completos, y que el marcaje se produce en la exina; la segunda región es una mezcla de restos del grano de polen, pero no contiene exina (es la que presenta un menor marcaje con el anticuerpo). Los autores indican que la tercera de las regiones está constituida por partículas pequeñas y heterogéneas, que son reconocidas por el anticuerpo en un 68 %. Se muestra una buena correlación entre los recuentos de granos de polen de *Cupressus* y la cuantificación del alérgeno Cup a 1. También indican los autores la gran labilidad del grano de polen de *Cupressus*.

En este momento, financiado por la Fundación SEAIC, se está desarrollando un proyecto, coordinado por el Dr. D. Francisco Javier Fernández en el que junto a la cuantificación de aeroalérgenos, se realizan recuentos aerobiológicos clásicos y se está realizando un estudio clínico paralelo. Participan en el estudio Alicante, Alcázar de S. Juan, Badajoz, Barcelona, Cartagena, Murcia, Córdoba, Toledo y Madrid.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

1.-MÉTODOS ÓPTICOS DE RECuento DE GRANOS DE POLEN O CUANTIFICACIÓN DE AEROALÉRGENOS

1.1.-Recuentos tradicionales vs. lectores automáticos

En los últimos años han aparecido en el mercado sistemas automatizados para la identificación de granos de polen y esporas de hongos. Estos sistemas utilizan análisis de imagen para el reconocimiento de los granos de polen^{10,79}. Hasta el momento se encuentra limitado el número de tipos polínicos que pueden identificar y el sistema mantiene el problema de los recuentos tradicionales de la obtención de la información con retardo frente al momento de la exposición.

1.2.- Fluorescencia; Amplificación de luz por emisión estimulada de radiación (Láser); Resonancia de plasmones superficiales, etc.

En la bibliografía se pueden encontrar algunos trabajos en los que se utilizan otros sistemas. Por ejemplo, fluorescencia inducida por luz ultravioleta⁸⁰. La emisión de fluorescencia por parte de partículas biológicas ha sido utilizada para su caracterización, habiendo desarrollado equipos automáticos y en tiempo real que permite la rápida y no destructiva detección de partículas biológicas en el bioaerosol, entre ellas granos de polen y esporas de hongos⁹. Aunque para estos sistemas se ha señalado que en ambientes urbanos la población de partículas puede estar dominada por partículas no biológicas también fluorescentes que pueden producir interferencias⁸⁰. Ello hace que se tengan que usar algoritmos de cálculo para discriminar entre unas partículas y otras y que estos sistemas estén calibrados para un número finito de partículas. Por ejemplo O'Connor et ál.⁹ estudian 8 tipos de granos de polen y 5 esporas de hongos. Sin embargo, todavía no se puede afirmar que sean metodologías aplicables de modo rutinario en la vigilancia de la calidad del aire⁸⁰.

Otros sistemas están basados en la utilización de luz láser, bien en el Infrarrojo (PA-300 de Plair⁸¹) o en el ultravioleta (BARDet⁸²), o utilizando los dos, como es el caso de Rapid-E de Plair⁸³, en este último equipo se

pueden cuantificar 15 tipos polínicos y 4 fúngicos.

El sistema basado en la resonancia de plasmones superficiales ha sido desarrollado por BIACORE, en resumen, se liga el anticuerpo del alérgeno que se quiere cuantificar sobre un chip, al unirse el antígeno, se produce un cambio en el ángulo en el que se refleja la luz polarizada que incide sobre el chip. El cambio en este ángulo, es directamente proporcional a la masa de alérgeno ligado al antígeno, por lo que el método es cuantitativo, y en tiempo real. Esta metodología solo la hemos encontrado aplicada a aerobiología para el alérgeno Cry j 1, (el alérgeno mayoritario de *Cryptomeria japonica*)^{43,55}.

Desde nuestro punto de vista son sistemas prometedores, pero que se encuentran todavía en una fase inicial de desarrollo y no pueden sustituir a los recuentos tradicionales que se hacen en las redes de vigilancia aerobiológica.

2.-CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR

En determinados estudios se identifican los tipos polínicos y fúngicos presentes en el bioaerosol mediante PCR. En principio, se puede realizar tanto una PCR cualitativa (listado de los diferentes tipos polínicos y fúngicos), como cuantitativa (además de la identificación, su cantidad). Además permitiría la identificación de otros seres vivos presentes en el bioaerosol, como bacterias, incluso distinguiendo entre viables y no viables⁸⁴. Otra ventaja que se señala para esta metodología es la posibilidad de obtener la información en tiempo real⁸⁵. Consideramos que esta metodología comporta el problema de no poder dilucidar si en el aire está presente el grano de polen u otra parte de la planta, especialmente importante sería esto para los hongos, pues es muy frecuente encontrar en el bioaerosol restos de hifas, que también serían identificadas y consideradas como la correspondiente espora del hongo.

3.-CUANTIFICACIÓN DE AEROALÉRGENOS POR MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

3.1.-ELISA

La cuantificación de aeroalérgenos por metodología ELISA, la utilizada en la mayor parte de los trabajos discutidos en esta revisión, puede ser una buena perspectiva de futuro, siempre que se encuentren métodos de extracción para todos los tipos polínicos de interés en un área concreta. Desde nuestro punto de vista podría tener la ventaja de poder desarrollar métodos automatizados de cuantificación que permitan la obtención de datos en tiempo real. Además, permitiría conocer la carga alérgica, o potencia del polen, independientemente de la concentración de granos de

polen, el periodo de tiempo de la determinación o la fracción del aerosol en el que se encuentre. Sin embargo, en el estado actual de desarrollo de la metodología requiere el complemento de los recuentos tradicionales de granos de polen y esporas de hongos, ya que las metodologías desarrolladas hasta el momento no cubren la riqueza en tipos polínicos del bioaerosol. Otro aspecto a señalar es que este tipo de métodos centraría su interés en estudios relacionados con las alergias, perdiendo importancia las aplicaciones en otras disciplinas (agronómicas, botánicas, etc.) de la aerobiología.

3.2.-Otras metodologías

Ya nos hemos referido con anterioridad a los trabajos publicados en los que se utiliza para la cuantificación la citometría de flujo, tras una reacción inmunoquímica. Aunque son pocas las publicaciones con esta metodología, consideramos que sería susceptible de automatización, por lo que se podría disponer de datos en tiempo real, aunque con algunas de las limitaciones de la metodología anterior (número de alérgenos identificables, y enfoque dirigido a la polinosis). En el trabajo de Moreno Benítez et ál.⁵⁶, el alérgeno Cup a 1 permanece en la exina del grano de polen. En los estudios que hemos comentado en esta revisión para otros tipos polínicos, las proteínas alérgicas son eluidas con disoluciones tampón.

CONCLUSIÓN

¿Cuantificación de aeroalérgenos polínicos o recuentos de granos de polen?, todavía no nos encontramos en condiciones de contestar a esta pregunta. Aunque se ha avanzado mucho en el desarrollo de metodologías complementarias a los recuentos tradicionales de polen y esporas, todavía no se pueden sustituir los recuentos aeropalínológicos tradicionales y se requiere seguir investigando en este campo para poder desarrollar una metodología de toma de muestras y cuantificación de aeroalérgenos que pueda ser implementada en las redes de vigilancia aerobiológica de la atmósfera.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vincent JH. Aerosol Sampling: Science and Practice. Chichester: John Wiley and Sons. 1989.
2. Ley 34/2007, de 29 de diciembre, de Calidad del aire y protección de la atmósfera. BOE nº 314 de 30/12/2004.
3. Belchí-Hernández J, Moreno-Grau S, Sánchez-Gascón F, et ál. Sensization of *Zygophyllum fabago* pollen. A clinical and immunological study. Allergy 1998; 53: 241-8.

4. Martínez-Cócera C, Villalón-García AL. Pasado, presente y futuro de los recuentos de pólenes de la SEAIC. *Alergol. Inmunol. Clin.* 2003; 18:1-4.
5. Wallace DV, Dykewicz MS, Bernstein DI, et ál. The diagnosis and management of rhinitis: an updated practice parameter. *Allergy Clin. Immunol.* 2008; 122(2 Suppl):S1-84.
6. D'Amato G, Holgate ST, Pawankar R, et ál. Meteorological conditions, climate change, new emerging factors, and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organization Journal* 2015; 8:25. DOI 10.1186/s40413-015-0073-0.
7. Hirst, J.M. An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biology* 1952; 39: 257-65.
8. Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno J, et ál. Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 2006; 96: 858-64.
9. O'Connor DJ, Iacopino D, Healy DA, et ál. The intrinsic fluorescence spectra of selected pollen and fungal spores. *Atmospheric Environment* 2011; 45:6451-8.
10. Marcos JV, Nava R, Cristóbal G, et ál. Automated pollen identification using microscopic imaging and texture analysis. *Micron* 2015; 68:36-46.
11. Thibaudon M, Oliver G. Pollens, allergens and real time information. En: Abstracts Book Mediterranean Palynology APLE_GPPSBI_APLF Symposium; 2017 4-6 septiembre; Barcelona, España. p. 66.
12. Busse WW, Redd CE, Hoehme JH. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? II Demonstration of ragweed antigen in airborne particles smaller than pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1972; 50: 289-93.
13. Knox RB. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 1993; 23: 354-9.
14. Süring K, Bach S, Höflich C, Straff W. Flow Cytometric Analysis of Particle-bound Bet v 1 Allergen in PM10. *Journal of Visualized Experiments* 2016; 117:E54721.
15. Fernández-Caldas E, Carnés J, Iraola V, Casanovas M. Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2007; 98:464-70.
16. D'Amato G, De Palma R, Verga A. Antigen activity of non-pollen parts (leaves and stems) of allergenic plants. *Annals of Allergy* 1991; 67: 421-4.
17. Beggs PJ. Pollen and pollen antigen as triggers of asthma-What to measure?. *Atmospheric Environment* 1998; 32:1777-83.
18. D'Amato G. Airborne paucimicronic allergen-carrying particles and seasonal respiratory allergy. *Allergy* 2001; 56: 1109-11.
19. Rantio-Lehtimäki A, Viander M, Koivikko A. Airborne birch pollen antigens in different particles sizes. *Clinical and Experimental Allergy* 1994; 24: 23-8.
20. Punt W, Hoen PP, Blackmore S, et ál. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 2007; 143:1-81.
21. McCrone WC, Draftz RG, Delly JG, McCrone WC. The particle atlas. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science publishers Inc; 1967.
22. Norma UNE EN 12341:1999. Calidad del aire. Determinación de la fracción PM 10 de la materia particulada en suspensión. Método de referencia y procedimiento de ensayo de campo para demostrar la equivalencia de los métodos de medida al de referencia. Madrid: AENOR. pp. 27.
23. Hofmann W, Asgharian B, Winkler-Heil R. Modeling intersubject variability of particle deposition in human lungs. *J. Aerosol Sci.* 2002; 33:219-35.
24. Valero Santiago AL, Picado Vallés C. Polinosis. En: Polinosis: polen y alergia. AL. Valero y Á Cadahía editores. Barcelona: MRA ediciones. 2002. pp 17-21.
25. Castells T, Arcalis E, Moreno-Grau S, et ál. Immunocytochemical localization of allergenic proteins from mature to activated *Zygophyllum fabago* L. (Zygophyllaceae) pollen grains. *Eur. J. Cell Biol.* 2002; 81:107-15.
26. Vega-Maray AM, González-Fernández D, Valencia-Barrera R, Suárez-Cervera M. Detection and release of allergenic proteins in *Parietaria judaica* pollen grains. *Protoplasma* 2006; 228:115-20.
27. Cecchi L. From pollen count to pollen potency: the molecular era of aerobiology. *Eur. Respir. J.* 2013; 42:898-900.
28. Agarwal MK, Yunginger JW, Swanson MC, Reed CE. An immunological method to measure atmospheric allergens. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 1981; 68:194-200.
29. Spieksma FThM, Nikkels BH, Dijkman JH. Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clin. Exp. Allergy* 1995;25: 234-239.
30. Riediker M, Koller T, Monn C. Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clin. Exp. Allergy* 2000; 30: 867-873.
31. Cabrera M, Martínez-Cócera C, Fernández-Caldas E, et ál. Trisetum paniceum (Wild Oats) Pollen Counts and Aeroallergens in the Ambient Air of Madrid, Spain. *International archives of allergy and immunology* 2002; 128:123-9.
32. Butters JTM, Thibaudon M, Smith M, et ál. Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from Hialine study. *Atmospheric Environment* 2012; 55:496-505.
33. Butters JTM, Prank M, Sofiev M, et ál. 2015. Variation of the group 5 grass pollen allergen content of airborne pollen in relation to geographic location and time in season. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 136:87-95
34. Remström A, Gordon S, Larsson PH, et ál. Comparison of a

- radioallergosorbent (RAST) inhibition method and a monoclonal enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for aeroallergen measurement. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27:1314-21.
35. Solomon WR, Burge HA, Muilenberg ML. 1983. Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983; 72:443-7.
 36. Yli-Panula E, Takahashi Y, Rantio-Lehtimäki A. 1997. Comparison of direct immunostaining and electroimmunoassay for analysis of airborne grass-pollen antigens. *Allergy* 1997; 52:541-6.
 37. Moreno-Grau S, Aira MJ, Elvira-Rendueles B. Assessment of the *Olea* pollen and its major allergen Ole e 1 concentrations in the bioaerosol of two biogeographical areas. *Atmospheric Environment* 2016; 145:264-71.
 38. Spielsma FTHM, Nikkels AH. Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergens in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy* 1999; 54:235-41.
 39. Pehkonen E, Rantio-Lehtimäki A. Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic factors. *Allergy* 1994; 49:472-7.
 40. Schumacher MJ, Griffith RD, O'Rourke MK. Recognition of pollen and other particulate aeroantigens by immunoblot microscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82:608-16.
 41. El-Ghazaly G, Takahashi Y, Nilsson S, et al. Orbicules in *Betula pendula* and their possible role in allergy. *Grana* 1995; 34:300-4.
 42. Williams RH, Ward E, McCartney A. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *App. Environ. Microbiol.* 2001; 67:2453-9.
 43. Takahashi Y, Ohashi T, Nagoya T et al. Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of surface plasmon resonance. *Aerobiologia* 2001; 17:313-18.
 44. Plaza MP, Alcázar P, Hernández-Ceballos MA, Galán C. Mismatch in allergens and airborne grass pollen concentrations. *Atmospheric Environment* 2016; 144:361-9.
 45. Acevedo F, Vesterberg O, Bayard C. Visualization and quantification of birch-pollen allergens directly on air-sampling filters. *Allergy* 1998; 53:594-601.
 46. Haig CW, Mackay WG, Walker JT, Williams C. Bioaerosol sampling: sampling mechanisms, bioefficiency and field studies. *Journal of Hospital Infection* 2016; 93:242-55.
 47. Agarwal MK, Swanson MC, Reed CE, Yunginger JW. Airborne ragweed allergens: Association with various particles sizes and short ragweed plant parts. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 1984; 74:687-93.
 48. Emberlin J. Analysis of allergens on airborne particles: Progress and problems. 3 Europäisches Pollenflug-Symposium. Bad Lippspringer 1994. Dusseldorf: Vorträge und Berichte. 1995; pp 48-62.
 49. Holmquist L, Vesterberg O. Luminiscence immunoassay of pollen allergens on air sampling polytetrafluoroethylene filters. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999; 41:49-60.
 50. Razomvski V, O'Meara TJ, Taylor DJM, Tovey ER. A new method for simultaneous immunodetection and morphologic identification of individual sources of pollen allergens. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 2000; 105:725-31.
 51. Fernández-González D, Rodríguez-Rajo FJ, González-Parrado Z, et al. Differences in atmospheric emissions of Poaceae pollen and Lol p 1 allergen. *Aerobiologia* 2011; 27:301-9.
 52. Williams RH, Ward E, McCartney A. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *App. Environ. Microbiol.* 2001; 67:2453-9.
 53. Calderon C, Ward E, Freeman J, McCartney A. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Aerosol Sci.* 2002; 33:283-96.
 54. Gutiérrez AM, Ferencova Z, Núñez A, et al. Análisis por técnicas morfológicas y secuenciación de ADN del polen atmosférico de la Comunidad de Madrid: estudios preliminares. *Rev. salud ambient.* 2016; 16(1):71-7.
 55. Wang Q, Gong X, Suzuki M, et al. Size-segregated allergenic particles released from airborne *Cryptomeria japonica* pollen grains during the yellow sand events within the pollen scattering seasons. *Asian Journal of Atmospheric Environment* 2013; 7-4:191-8.
 56. Moreno-Benítez F, Camacho L, Cuvillo-Bernal A, et al. Determination of allergenic load and pollen count of *Cupressus arizonica* pollen by flow cytometry using Cup a 1 polyclonal antibody. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2014; 86B:63-9.
 57. De Linares C, Nieto-Lugilde D, Alba F, et al. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain. *Clinical and Experimental Allergy* 2007; 37:125-32.
 58. Rodríguez-Rajo FJ, Jato V, González-Parrado Z, et al. The combination of airborne pollen and allergen quantification to reliably assess the real pollinosis risk in different bioclimatic areas. *Aerobiologia* 2011; 27:1-12.
 59. Galán C, Antunes C, Brandao R, et al. Airborne olive pollen counts are not representative of exposure to the major olive allergen Ole e 1. *Allergy* 2013; 68:809-12.
 60. Plaza MP, Alcázar P, Galán C. Correlation between airborne *Olea europaea* pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012-2014. *Int. J. Biometeorol.* 2016; 60:1841-7.
 61. Jato V, Rodríguez-Rajo FJ, González-Parrado Z, et al. Detection of airborne Par j1-Par j 2 allergens in relation to Urticaceae pollen counts in different bioclimatic areas. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2010; 105:50-6.
 62. De Linares C, Postigo I, Belmonte J, et al. Optimization of the measurement of outdoor airborne allergens using a protein

- microarrays platform. *Aerobiologia* 2014; 30:217-27.
63. Ramirez J, Carpizo JA, Ipsen H, et ál. Quantification in mass units of Bet v 1, the main allergen of *Betula verrucosa* pollen, by a monoclonal antibody based-ELISA. *Clinical and Experimental Allergy* 1997; 27:926-31.
 64. Thibaudon M, Sindt C. Mesure des allergènes de pollens d'arbre dans l'air (bouleau, olivier). *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 2008; 48:179-86.
 65. Buters JTM, Weichenmeier I, Ochs S, et ál. The allergen Bet v 1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. *Allergy* 2010; 65:850-8.
 66. Fernández-González D, González-Parrado Z, Vega-Maray AM, et ál. *Platanus* pollen allergen, Pla a 1:quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. *Clinical and Experimental Allergy* 2010; 40:1701-8.
 67. Fernández-González D, Guedes A, Abreu I, Rodríguez-Rajo FJ. Pla a₁ aeroallergen immunodetection related to the airborne *Platanus* pollen content. *Science of the Total Environment* 2013; 463-464:855-60.
 68. Alcázar P, Galán C, Torres C, Domínguez-Vilches E. Detection of airborne allergen (Pla a 1) in relation to *Platanus* pollen in Córdoba, South Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2015; 22:96-101.
 69. González-Parrado Z, Fernández-González D, Camazón B, et ál. Molecular aerobiology – *Plantago* allergen Pla I 1 in the atmosphere. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2014; 21:282-9.
 70. De Linares C, Postigo I, Belmonte J, Martínez J. Airborne allergen measurement with microarrays technology. *Allergy* 2013; 65:32.
 71. De Linares C, Diaz de la Guardia C, Nieto Lugilde D, et ál. Airborne Study of Grass Allergen (Lol p 1) in Different-Sized Particles. *International Archives Of Allergy and Immunology* 2010; 152:49-57.
 72. Vara A, Fernández-González M, Aira MJ, Rodríguez-Rajo FJ. *Fraxinus* pollen and allergen concentrations in Ourense (South-western Europe). *Environmental Research* 2016; 147:241-8.
 73. Prester L, Macan J. Levels of the fungal allergen Asp f 1 in dust from two sawmills in Croatia:a pilot study. *Aerobiologia* 2014; 30:189-96.
 74. Visez N, Chassard G, Azarkan N, et ál. Wind-induced mechanical rupture of birch pollen:Potential implications for allergen dispersal. *Journal of Aerosol Science* 2015; 89:77-84.
 75. Fernández-Caldas E, Carnés J, Iraola V, Casanovas M. Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* 2007; 98:464-70.
 76. Mert C, Barut E, Ipek A. Quantitative Seasonal Changes in the Leaf Phenolic Content Related to the Alternate-Bearing Patterns of Olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). *Journal of Agricultural Science and Technology* 2013;15:995-1006.
 77. Yanik H, Turktas M, Dundar E, et ál. Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (*Olea europaea* L.). *BMC Plant Biology* 2013; 13:10.
 78. Dündar E, Suakar O, Unver T, Dagdelen A. Isolation and expression analysis of cDNAs that are associated with alternate bearing in *Olea europaea* L. cv. Ayvalik. *BMC Genomics* 2014; 14:219.
 79. Oteros J, Pusch G, Weichenmeier I, et ál. Automatic and Online Pollen Monitoring. *Int Arch Allergy Immunol* 2015; 167:158-66.
 80. Ruske S, Topping DO, Foot VE, et ál. Evaluation of machine learning algorithms for classification of primary biological aerosol using a new UV-LIF spectrometer. *Atmos. Meas. Tech.* 2017; 10:695-708.
 81. Crouzy B, Stella M, Konzelmann T, et ál. All-optical automatic pollen identification:Towards an operational system. *Atmospheric Environment* 2016; 140:202-12.
 82. Kaliszewski M, Włodarski M, Młyńczak J, et ál. A new real-time bio-aerosol fluorescence detector based on semiconductor CW excitation UV laser. *Journal of Aerosol Science* 2016; 100:14-25.
 83. Plair. Solution for real-time pollen counting. [citado el 2 de octubre de 2017] Disponible en:<http://www.plair.ch/pdf/Brochure/PLAIR%20Real-Time%20Pollen%20Counting.pdf>.
 84. Chang ChW, Hung NT, Chen NT. Optimization and application of propidium monoazidequantitative PCR method for viable bacterial bioaerosols. *Journal of Aerosol Science* 2017; 104:90-99.
 85. Longhi S, Cristofori A, Gatto P, et ál. Biomolecular identification of allergenic pollen:a new perspective for aerobiological monitoring?. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 2009; 103:508-14.