



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**ESTUDIO DE AEROALÉRGENOS POR
MÉTODOS INMUNOLÓGICOS. MUESTREO
Y TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS EN EL
ANÁLISIS DE LOS ALÉRGENOS DE
OLEÁCEAS.**

Autores: Guillermo Escudero Sánchez y Carmen Prieto Gil

Tutor: Adela Montserrat Gutiérrez Bustillo

Convocatoria: Julio 2018

RESUMEN:

La polinosis es un problema de creciente importancia y prevalencia en España y Europa.

Los sistemas de monitorización de polen y alérgenos ganan importancia por su potencial utilidad en el establecimiento de sistemas de alerta para la población. La monitorización de polen y alérgenos implica distintos procesos, tanto de captación como de cuantificación.

La recogida de polen es un proceso estandarizado que se realiza principalmente mediante el captador volumétrico tipo Hirst, mientras que la recogida de alérgenos se lleva a cabo mediante captadores de tipo ChemVol o Cyclone; la identificación de los alérgenos presentes en los diferentes tipos de polen, se llevará a cabo utilizando técnicas inmunológicas entre las que destaca el ELISA, pero no está estandarizada.

Actualmente, existen pocos estudios que evalúen la eficacia de los métodos de inmunoensayo ELISA en la cuantificación de aeroalérgenos, la escasez es aún mayor en el caso de comparativas entre los distintos tipos de ELISA.

En los artículos revisados, se han estudiado una gran variedad de alérgenos contenidos en distintos pólenes: hay estudios de alérgenos de gramíneas, donde destacan Phl p 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12 y 13, aunque sólo Phl p 1, 2, 5 y 6 son marcadores específicos del polen de gramíneas; también pólenes de *Olea*, destacando sus alérgenos Ole e 1, 6, 7, y 10; *Fraxinus* con su alérgeno principal, Fra e 1, que además supone un ejemplo de la reactividad cruzada que se ha visto que hay entre ciertos alérgenos, y que permite entender ciertas reacciones alérgicas en épocas de polinización distintas a las de la especie a la que se es alérgico. La captación de pólenes y alérgenos se realizó a diario ininterrumpidamente (salvo fallo técnico) en todos los estudios.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES:

La alergia es una de las enfermedades crónicas más comunes en Europa, con una prevalencia de más del 20% en el total de la población. Se trata también de un fenómeno altamente estudiado, habiendo surgido numerosos estudios que se centran, no sólo en las alergias alimentarias o a medicamentos, sino también en el estudio de las reacciones alérgicas al polen o polinosis.

Existen tres tipos de alérgenos en función de la vía de contacto, aeroalérgenos, si la exposición es por inhalación; alérgenos por ingestión y alérgenos por inoculación (picaduras de insectos, fármacos...). Los aeroalérgenos se encuentran de forma natural

en la atmósfera, siendo parte de su material particulado. En el aire ambiente exterior están presentes por tanto los granos de polen y las esporas fúngicas susceptibles de producir alergia, más los alérgenos liberados a la atmósfera por estas partículas o por otras partes de las plantas productoras y que forman parte del bioaerosol atmosférico. Recordemos que, al conjunto de las sustancias sólidas y líquidas que se encuentran suspendidas en la atmósfera, se le denomina aerosol atmosférico.

La evidente relación entre la presencia atmosférica de polen y las reacciones alérgicas, es la razón es la razón por la que en el periodo 1990-2010, se ha producido un gran desarrollo de estudios aerobiológicos sobre aeroalérgenos y de los epidemiológicos y clínicos sobre la alergia al polen, que han proporcionado abundante información sobre la presencia atmosférica y la prevalencia de los tipos polínicos más alérgicos.

Los tipos de polen responsables de sintomatología alérgica son solo unos pocos, de los muchos presentes en el aire que respiramos. En el aire de las ciudades, es posible identificar, a lo largo del año, 70 o más tipos polínicos diferentes, pero solo unos pocos alcanzan concentraciones atmosféricas elevadas y tienen importancia alérgica. El polen de *Olea europea* es la principal causa de alergias en todo el Mediterráneo y la segunda de polinosis en España, después del polen de *Poaceae*. También son importantes el polen procedente de los plátanos de paseo (*Platanus sp.*) y el de las cupresáceas.

Los granos de polen son alérgicos porque contienen alérgenos, que son moléculas con la capacidad de estimular respuestas inmunes. Pueden ser proteínas o glucoproteínas naturales o de síntesis, generalmente hidrosolubles, de bajo peso molecular y con actividad proteolítica (lo que facilita su paso a través de las mucosas), y que pueden desencadenar la respuesta inmune por sí solos o tras unirse a proteínas portadoras endógenas del individuo.

Los alérgenos del polen pueden liberarse, salir fuera de los granos de polen y quedar en el aire que respiramos formando parte del aerosol atmosférico. Por ello, si el objetivo es proporcionar información relacionada con la cantidad de alérgenos del aire ambiente y conocer el riesgo de exposición de las personas sensibles, será necesario muestrear, además del polen, los aeroalérgenos liberados a la atmósfera.

No existe necesariamente una asociación entre la emisión de alérgenos y la presencia de polen. La emisión del polen, se ve favorecida por el tiempo seco y soleado, que provoca la apertura de las anteras y después de su liberación, es posible su dispersión y transporte. Los alérgenos, en cambio, pueden ser emitidos por cualquier parte de la planta, aunque su contenedor principal es el polen, emisión que se interpreta como un

mecanismo de respuesta a diferentes factores exógenos como el aumento de la humedad ambiental o la exposición a elementos extraños, como los contaminantes¹.

De ahí que, aunque las mayores concentraciones de alérgenos coinciden con altas concentraciones de polen durante su estación polínica, su comportamiento es más difícil de predecir al no depender tanto de la fenología de la planta.

Las dos principales afecciones alérgicas asociadas con la exposición a polen, son la rinitis alérgica y el asma, que suponen un importante problema de salud, con un gran coste económico. El estudio de los aeroalérgenos polínicos liberados a la atmosfera, abre un nuevo frente en la comprensión de la rinitis alérgica y el asma, habiéndose comprobado que los alérgenos polínicos libres, pueden penetrar hasta dos veces más profundamente en las vías aéreas que los granos de polen, sobre todo en las condiciones de humedad relativa del 100% que encontramos en los días lluviosos.

Nuestro objetivo en este trabajo será analizar estos avances y los nuevos descubrimientos que traen consigo.

OBJETIVOS:

Revisar la bibliografía publicada en las dos últimas décadas sobre el estudio de los aeroalérgenos polínicos presentes en la atmosfera para conocer:

1. La metodología para el muestreo y cuantificación del polen atmosférico.
2. La metodología utilizada para la captación de alérgenos.
3. La metodología utilizada en la cuantificación de los alérgenos atmosféricos por métodos inmunológicos.
4. Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de captación y cuantificación de aeroalérgenos utilizados.
5. La diversidad de aeroalérgenos estudiados.
6. Estudio del polen atmosférico y los aeroalergenos de oleáceas, olivo (*Olea*) y fresno (*Fraxinus*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica tanto en soporte papel como digital. Se han empleado recursos electrónicos, destacándose el uso de bases de datos especializadas, motores de búsqueda, publicaciones de revistas científicas y tesis doctorales (Pubmed, Google Scholar, Alergológica, etc.)

Dicha búsqueda bibliográfica se ha realizado en dos idiomas: inglés y castellano empleándose palabras clave (*Olea*, pollen, Ole e 1, *Fraxinus*, indirect ELISA, Cyclone sampler, ChemVol sampler, sandwich ELISA, immunology) y diversas combinaciones de estas. La bibliografía revisada ha sido la más actual y a nuestro juicio, la más relevante para el tema que nos ocupa. Las referencias bibliográficas se presentan según el orden de aparición en el texto con la correspondiente numeración correlativa en números arábigos en superíndices.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Metodología para el muestreo y cuantificación del polen atmosférico

El estudio del polen y las esporas fúngicas, principales partículas biológicas alergénicas presentes en el aire ambiente exterior, se lleva haciendo desde los años 70².

El control rutinario del polen atmosférico ha dado lugar al desarrollo de redes aerobiológicas, principalmente en Europa y América del Norte. Los métodos de ensayo utilizados en la toma de muestras y en su posterior análisis generalmente siguen las normas dadas por la International Association for Aerobiology (IAA), y en España, las estaciones integradas en la Red Española de Aerobiología (REA), siguen en sus procedimientos de muestreo y análisis su Manual de Calidad y Gestión ^{3,4,5}.

Los datos de presencia atmosférica de polen y esporas se obtienen de la siguiente manera: cada estación aerobiológica, equipada con un captador volumétrico tipo Hirst (marca Burkard; Lanzoni), realiza un muestreo continuo de las partículas atmosféricas, de tal manera que se obtiene una muestra, para cada día; esta muestra es una preparación microscópica, que debe analizarse al microscopio óptico (M.O.), identificando y contando los granos de polen presentes en la misma. La identificación se basa en la morfología de estas partículas, que es específica de determinados grupos de plantas; como resultado del análisis de cada muestra obtenemos una relación de tipos morfológicos de polen (espectro diario) cuantificados mediante el valor medio diario de estas partículas por metro cúbico de aire. Es un análisis costoso, que no puede realizarse de forma automática y que requiere cada día varias horas de trabajo de un técnico de laboratorio con formación específica.

En² se da un inventario de las estaciones de monitoreo de polen que funcionan actualmente en todo el mundo y se hace un mapa interactivo que permite visualizar su distribución y la metodología utilizada para el muestreo (Figura 1). Hay al menos 879 estaciones activas de monitoreo de polen en el mundo, la mayoría de las cuales están en Europa (> 500). Los captadores más utilizados para el muestreo son de tipo Hirst (> 600 estaciones).

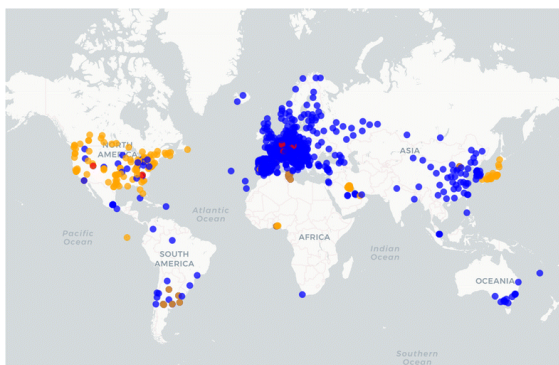


Figura 1. Captura de pantalla del mapa interactivo de estaciones de monitoreo de esporas de hongos y polen en el mundo. El mapa está disponible en https://otros.shinyapps.io/pollen_map; Puntos azules (trampa Hirst), rojo (estación automática), naranja (otro manual).

España es actualmente uno de los países europeos con mayor número de estaciones aerobiológicas en funcionamiento (Figura 2) y todas ellas siguen metodología estandarizada ^{3,4,5}.



Figura 2 Captura de pantalla del mapa interactivo de estaciones de monitoreo de esporas de hongos y polen en España (Acceso 16-05-2018). En España todas las estaciones utilizan captadores Hirst (puntos azules); https://otros.shinyapps.io/pollen_map

2. La metodología utilizada para la captación de alérgenos

Así como para el muestreo del polen atmosférico ya hay una metodología estandarizada, no sucede lo mismo en el caso de los alérgenos polínicos ⁶. Para la captura de alérgenos son varios los captadores utilizados, con ventajas e inconvenientes que suelen poner en duda la eficiencia del aparato. En numerosos casos, se han llegado a adaptar algunos de los captadores de polen para la detección de alérgenos, con el objetivo de comparar resultados.

En los diferentes trabajos consultados, se utilizan principalmente dos métodos de captación de alérgenos: el ChemVol y el ciclón Burkard.

El captador en **cascada ChemVol**, con un volumen de aspiración de 800 L/min, consta de tres posibles capas de captura progresivamente más finas, el sustrato de impacto

es una espuma de poliuretano que permite reducir el rebote de partículas, facilitando el muestreo durante períodos prolongados.

El **captador Cyclone** (Fig. 3) es un captador de alérgenos que funciona por fuerzas centrífugas de origen ciclónico, aspirando un volumen de aire de 16 L/min. El mecanismo de captación se basa en una corriente ciclónica continua de aire generada por un flujo de 16,5 L/min a través de canal de salida del vórtex en la parte superior de la cámara de captación. La corriente ciclónica conduce el aire en espiral hacia la parte inferior, en donde se encuentra el tubo Eppendorf. Las partículas, en función de su diámetro aerodinámico equivalente, tendrán mayor o menor dificultad para adaptarse a los cambios de dirección del flujo de aire, por lo que las partículas dentro de los rangos de eficacia del equipo, abandonarán el flujo de aire, quedando depositadas en el tubo Eppendorf para el posterior análisis de inmunoensayo.

Las características más destacables de este tipo de ciclones son: bajo volumen de flujo de aire (16.5 L/min); las muestras se recogen en un tubo Eppendorf o similar; eficacia similar a la del muestreador tipo HIRST; no ofrece separación por tamaños de diámetro de partícula; bajo tiempo de tratamiento de la muestra; evita el problema de sobrecarga de los filtros; deposición del material. La eficacia de captación es del 100% de partículas entre 3-10,6 micras; 98,63% para 1,06-0,87 y 93,81% para 0,87-0,75 micras⁷.



Figura 3. Captador ciclónico Burkard

3. La metodología utilizada en la cuantificación de los alérgenos atmosféricos por métodos inmunológicos.

La cuantificación de los alérgenos polínicos presentes en el aerosol atmosférico se realiza mediante técnicas de inmunoensayo (ELISA), basada en la detección del antígeno o anticuerpo (proteína alérgica) mediante dos componentes acoplados: el anticuerpo

específico de un antígeno determinado, y la enzima que activa la función de unión al antígeno¹⁷. En los artículos revisados, se han utilizado dos tipos de ELISA: ELISA indirecto^{8, 9}, y ELISA en sándwich^{10, 11, 12, 13, 14, 16}. A continuación, describimos brevemente los dos tipos de ELISA utilizados basándonos en¹⁷

ELISA indirecto

Los pasos a seguir están esquematizados en la figura 4. En el paso I, el antígeno es diluido en un tampón; tampones con pH básico (9,6) (carbonato/bicarbonato) o neutros (PBS). Es importante que el tampón no contenga proteínas que puedan competir con el antígeno diana por la unión a la fase sólida (los antígenos son, principalmente, proteínas que se unen pasivamente al plástico durante el período de incubación). El paso II consistirá en la adición de los anticuerpos específicos y su incubación para que se unan a la fase sólida, la temperatura y tiempo de incubación no son tan importantes como la estandarización de las condiciones, y el uso de incubadoras a 37°C es recomendable, debido a su alta presencia en los laboratorios. Tras la incubación, el antígeno excedente es totalmente eliminado mediante un lavado simple. El paso III consiste en la adición de anticuerpos de detección, producidos por conejos y no marcados, de Ole e 1, que se diluyen en un tampón para prevenir la unión inespecífica a proteínas del antisuero a la fase sólida.

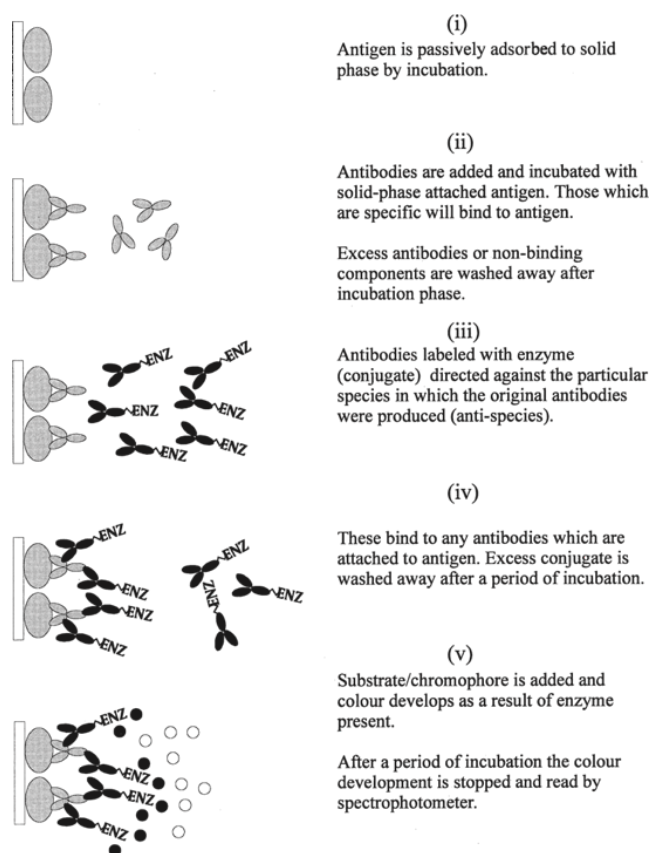


Figura 4¹⁷

Seguidamente, se lleva a cabo una incubación y un lavado del exceso de anticuerpos no unidos, para conseguir una unión específica en el paso IV. El paso V consiste en la adición de anticuerpos específicos de la especie de anticuerpos utilizados en el paso III conjugados con una enzima, diluidos en un tampón de bloqueo, seguido de una incubación y lavado. Es entonces cuando se añade el sustrato/cromóforo y se desarrolla el color, esta fase es detenida en el paso VIII y valorada en el paso IX en un espectrofotómetro.

ELISA en sándwich

Se trata de una técnica utilizada en distintos estudios de aeroalérgenos. Esta técnica puede, a su vez, dividirse en directo e indirecto:

Directo

Consiste en una unión pasiva de anticuerpos a la fase sólida en los dos primeros pasos (ver Fig. 5). Estos anticuerpos (anticuerpos captadores) se unen entonces a antígenos añadidos en el paso III. Los antígenos se diluyen en un tampón de bloqueo para evitar la unión inespecífica a la fase sólida. Aquí, los componentes del tampón de bloqueo no deberían contener ningún antígeno al que se pudiesen unir para capturar los anticuerpos.

Tras la incubación y el lavado, el complejo antígeno-anticuerpo se une a la fase sólida. El antígeno capturado se detecta por la adición e incubación de anticuerpos específicos marcados por enzima en un tampón de bloqueo (paso V). De este modo, esto forma un conjugado específico con las dianas antigénicas del antígeno capturado. Este segundo anticuerpo puede ser el mismo que el utilizado para la captura, o ser diferentes en términos de la fuente animal específica o las especies en las que fue producido.

Tras la incubación y el lavado que se realizan en el paso VI, la enzima conjugada es activada por la adición del sustrato/cromógeno (Fig. 6) (paso VII), siendo detenida en el paso VIII y finalmente leído el resultado utilizando un espectrofotómetro (paso IX).

Indirecto

Como se ilustra en la Fig. 6. Los primeros cuatro estados del ELISA en sándwich indirecto son muy similares al ELISA en sándwich directo. El paso V implica la adición de anticuerpos detectores. En este caso, los anticuerpos no están marcados con un enzima. Tras la incubación y el lavado, los anticuerpos detectores son detectados mediante la adición e incubación de anticuerpos enzima-conjugados anti-especies.

El conjugado se procesa de igual forma a los métodos anteriores

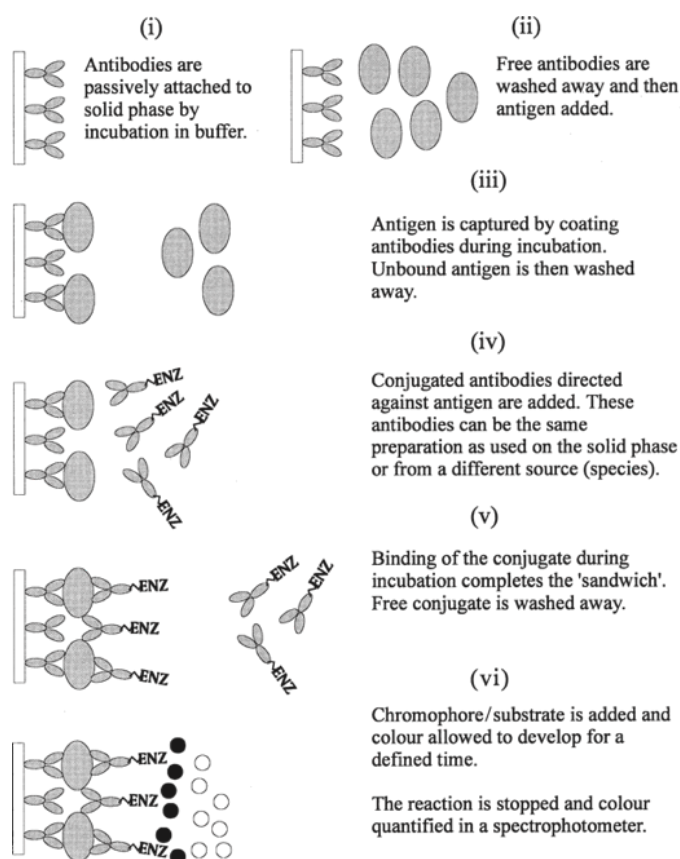


Figura 5¹⁷

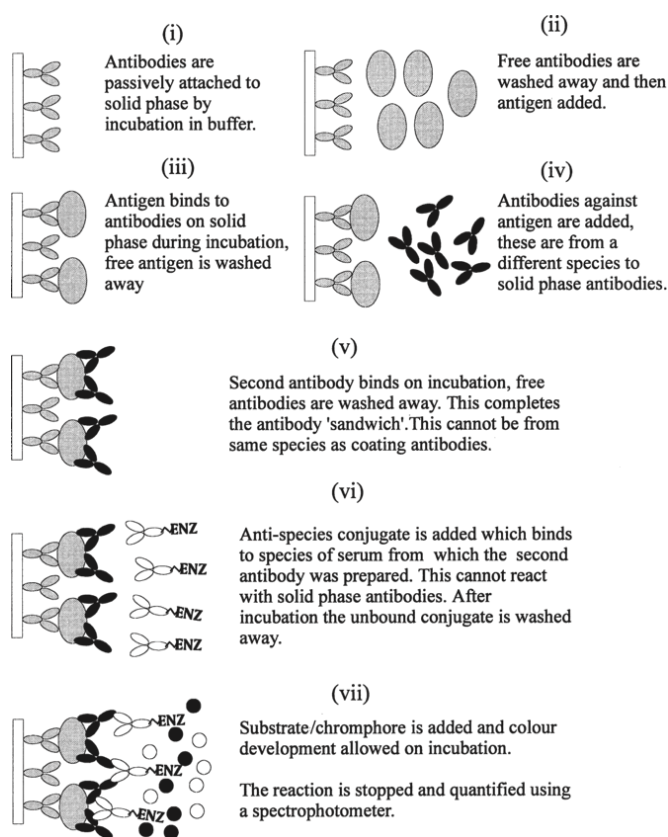


Figura 6¹⁷

Todos estos sistemas pueden utilizarse en ensayos de inhibición y competición en los que la medición implica la cuantificación de una sustancia por su habilidad para interferir con un sistema pre-titrado. Estos ensayos de inhibición y competición pueden utilizarse para detectar anticuerpos o antígenos, a excepción del ELISA en sándwich, en que sólo pueden utilizarse para detectar anticuerpos.

4. Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de captación y cuantificación de aeroalérgenos utilizados.

En¹⁸ se compararon los métodos de captación ChemVol y Cyclone para la captación de los alérgenos Ole e 1 y Phl p5 procedentes del polen del Oliva y Fresno, respectivamente.

Las muestras obtenidas por el ciclón Burkard fueron recogidas en Eppendorfs de 1,5 mL y centrifugadas a 600 rpm durante 3 minutos de manera que las partículas quedaban depositadas en el fondo del tubo. Más tarde se resuspendieron en 120 µL de extracto buffer y centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue recolectado y colocado en un nuevo Eppendorf.

El método ChemVol recogió las muestras en filtros de poliuretano de distinto tamaño; uno de ellos recogía las partículas mayores de 10 µm y el otro, aquellas comprendidas entre los tamaños de 2,5 - 10 µm. Estas fueron extraídas con albúmina de suero bovino; más tarde se crearon alícuotas que se congelarían hasta su análisis inmunológico.

Se determinó una mayor sensibilidad del Ciclón a las bajas concentraciones de polen de antes y después de la estación polínica. Las concentraciones de aeroalérgenos recolectadas por el ciclón fueron mayores que las que se obtuvieron con el ChemVol; en 2012 a recolectó el 72,78% del total de alérgeno Phl p 5 recogido por ambos dispositivos, y el 65,98% del total de Ole e 1. También se observaron que los picos de valores de alérgenos fueron mayores en el captador ciclónico que en el ChemVol, a excepción de Ole e 1 en 2014.

El índice de alérgeno fue similar, pero el potencial alérgico varió entre los captadores y entre los años de estudio, obteniéndose valores mayores con el captador ciclónico (excepto en *Olea* en 2014).

Se encontró una significativa correlación positiva entre las concentraciones de aeroalérgenos y las de polen atmosférico utilizando ambos captadores, pero ésta fue mayor utilizando el ChemVol, excepto en 2012 con el polen de olivo.

Todos los años, con el método de captación ChemVol se observó que en ambos alérgenos había una correlación negativa entre las concentraciones de los mismos en el ambiente y las lluvias y humedad; mientras que, con el Ciclón, esta misma correlación únicamente pudo apreciarse en los resultados obtenidos el año 2014.

Una de las ventajas del ciclón es su elevada eficacia para la captación de una amplia gama de partículas, el 90% de las partículas en el rango de 1micra; el captador ChemVol, por su parte, permite la discriminación de partículas en función de su tamaño.

El ciclón tiene la ventaja de que los tubos Eppendorf pueden cambiarse semanalmente, mientras que la espuma de poliuretano, que sirve como sustrato de impacto en el método de captación ChemVol, debe cambiarse diariamente.

Con el tampón ChemVol, se puede realizar la liofilización de la muestra durante el procedimiento de extracción, lo que ayudará a la eliminación de sustancias interferentes que alteran la prueba ELISA y a aumentar la sensibilidad.

El muestreador ChemVol es más eficiente a la hora de capturar polen en sustratos sólidos; sin embargo, el muestreador ciclón es capaz de capturar tanto el polen como los aeroalérgenos libres en viales.

MÉTODO DE CAPTACIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Ciclón Burkard	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor sensibilidad a bajas concentraciones y elevada eficacia para la captación de una amplia gama de partículas. • Evita problema de sobrecarga de filtros, deposición del material. • Requiere bajo tratamiento de la muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo flujo. • El tamaño de las muestras es pequeño.
ChemVol	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor utilidad para el muestreo de partículas durante periodos prolongados y para la captación de sustratos sólidos. • Permite liofilización de la muestra y eliminación de interferencias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio diario de la espuma de poliuretano.

Tabla 1. Principales ventajas e inconvenientes de estos dos captadores

Basándonos en¹⁷, estudiaremos las ventajas y desventajas de ELISA como método de cuantificación.

Con respecto a otros métodos inmunológicos, el ELISA presenta numerosas ventajas, como se muestra en la figura 7.

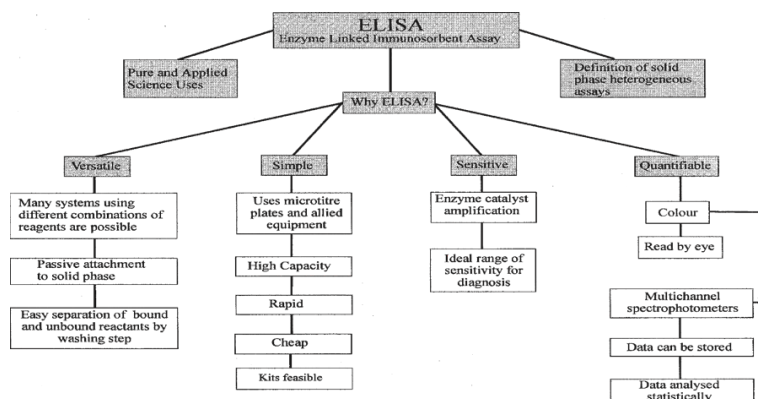


Figura 7¹⁷

Una de las claves del ELISA es su flexibilidad, puesto que pueden utilizarse más de un sistema para medir lo mismo. Esto permite adaptar los ensayos a los reactantes disponibles, así como a diferenciar las posibles áreas en las que se deben investigar nuevos reactantes.

El ELISA directo tiene severas limitaciones cuando se usa como único método, pero tiene una gran importancia como el sistema objetivo en ensayos de competición e inhibición, particularmente cuando los anticuerpos monoclonales están conjugados y/o se usan antígenos altamente definidos.

En el ELISA en sándwich directo, debido a que sólo un anticuerpo conjugado a una enzima es utilizado, el sistema está limitado por la especificidad y las propiedades inherentes a ese anticuerpo en particular. Esto limita la versatilidad del test. Además, el sistema está limitado debido a que los antígenos deben tener, al menos, dos epítomos antigénicos, puesto que tanto los anticuerpos captadores como los detectores deben unirse. Esto puede limitar el ensayo a complejos antigénicos relativamente grandes.

El uso de los mismos anticuerpos para capturar y detectar los antígenos puede acarrear problemas debido a la importante limitación de sitios de unión disponibles para el detector.

Estas limitaciones se resuelven con el ELISA en sándwich indirecto. Las ventajas de esta técnica son que se puede añadir tantos anticuerpos detectores provenientes de diferentes especies como se requieran, siempre y cuando las especies en las que se produjeron no son las mismas que las de los anticuerpos captadores. Los anticuerpos enzima-conjugados anti-especies no reaccionan con los anticuerpos utilizados para capturar al antígeno. Es posible utilizar anticuerpos de las mismas especies si se utilizan

técnicas inmunoquímicas para seleccionar y producir formas particulares de anticuerpos, y poniendo atención a la especificidad del conjugado enzimático utilizado.

El estudio¹⁹, cuyo objetivo era la revisión de los puntos esenciales para la monitorización de la exposición ambiental y ocupacional a alérgenos, analizó las técnicas inmunológicas utilizadas en el estudio de numerosos antígenos; siendo el ELISA en sándwich el único método utilizado en la cuantificación de aeroalérgenos polínicos. Los resultados mostraron altos niveles de sensibilidad en la mayoría de los alérgenos, teniendo límites de detección <1 ng. Este artículo establece que “los ELISA en doble sándwich pueden ser entre 10-1000 veces más sensitivos que los ensayos de inhibición utilizando los mismos anticuerpos, pudiendo además aumentarse la sensibilidad mediante kits de ampliación de la señal que utilizan sistemas en cascada o ciclónicos”. Cabe destacar que, los ensayos de inhibición, no son aplicables a la detección de antígenos mediante un ELISA en sándwich¹⁷

MÉTODO CUANTIFICACIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
ELISA DIRECTO	<ul style="list-style-type: none"> - Método muy flexible - Utilidad en ensayos con Ac monoclonales conjugados y/o Ag altamente definidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Posee limitaciones si se utiliza como único método.
ELISA EN SÁNDWICH DIRECTO	<ul style="list-style-type: none"> - Es entre 10-1000 veces más sensible que los ensayos de inhibición con los mismos anticuerpos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Está limitado por la especificidad (sólo permite el uso de un anticuerpo conjugado a enzima) y las propiedades inherentes al anticuerpo utilizado. - Necesidad de presencia de 2 epítopos antigénicos en los Ag.
ELISA SÁNDWICH INDIRECTO	<ul style="list-style-type: none"> - Permite el uso de todos los Ac detectores provenientes de distintas especies necesarios. 	<ul style="list-style-type: none"> - En los ensayos de inhibición, es imprescindible que no existan anticuerpos libres en los pocillos para el pre-titrado.

Tabla 2. Principales ventajas e inconvenientes de los métodos de cuantificación utilizados.

Según el estudio²⁰, en el que se trataba de dar respuesta a la cuestión de si es mejor la consideración del polen o los alérgenos polínicos: “la cuantificación de aeroalérgenos por metodología ELISA 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”. Establece también que podría tener la ventaja de desarrollar métodos automatizados de cuantificación que permitan la obtención de datos en tiempo real, pudiendo además conocer la carga alérgica, o potencia del polen, independientemente de

la concentración de granos de polen, el período de tiempo de la determinación o la fracción de aerosol en la que se encuentre. Como inconvenientes, establece que “el estado actual del 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 los tipos polínicos del bioaerosol.

5. La diversidad de aeroalérgenos estudiados

Durante las últimas décadas, se ha estudiado con mayor profundidad la cuantificación de los aeroalérgenos polínicos. Como ya hemos dicho, existen más de 70 tipos de polen diferente, de los que sólo unos pocos tienen importancia alérgica. En la tabla 3, se recogen algunos de los alérgenos del polen que han sido identificados: Ole e 1, Phl p5, Pla a 1 y Fra e 1 en los artículos consultados.

Autor	Año	Alérgeno estudiado	Tipo de polen
Artículo 1, 8 y 9	2007; 2016; 2017	Ole e 1	<i>Olea</i>
Artículo 2	2010	Pla a 1	<i>Platanus</i>
Artículo 3 y 4	2010; 2011	Lol p1	<i>Poaceae</i>
Artículo 5 y 6	2015; 2016	Phl p5	<i>Phleum pratense</i>
Artículo 7	2016	Fra e 1	<i>Fraxinus</i>

Tabla 3. Principales alérgenos del bioaerosol español.

6. Estudio del polen atmosférico y los aeroalérgenos de oleáceas, olivo (*Olea*) y fresno (*Fraxinus*).

Polen atmosférico de *Olea* y sus alérgenos

El polen de *Olea europea* es la principal causa de alergias en toda el área Mediterránea y la segunda causa de polinosis en España, tras el polen de *Poaceae*⁸. En⁸ se estudió la relación entre las concentraciones de polen de *Olea europea* y las de sus alérgenos en la atmósfera.

Hasta el momento se han encontrado 10 alérgenos siendo Ole e 1 uno de los principales. Ole e 1 es un alérgeno específico que únicamente se detecta en el tejido del polen y no en tejidos de hojas, frutos o tallos.

Los alérgenos fueron capturados y muestreados del 30 de abril al 26 de junio de 2005 entre las 12 y las 17 mediante un método de captación de impacto en cascada. Esto

separó las partículas suspendidas en el aire en diferentes grupos en función de su tamaño; se localizaron principalmente en los grupos 0 ($>9\mu\text{m}$) y el 1 ($5,8\text{-}9\mu\text{m}$).

En la figura 8 puede verse como la liberación del polen de *Olea* se produjo con mayor intensidad entre principios de mayo y los primeros días de junio. La cantidad de polen liberado fue similar y tuvo el mismo comportamiento que el de otros años por estas mismas fechas. Las concentraciones de polen y de alérgeno alcanzaron los valores máximos en el aire el mismo día (28 de mayo). También muestra cómo se produjeron diferencias de concentraciones los días previos y posteriores al pico máximo de polinización.

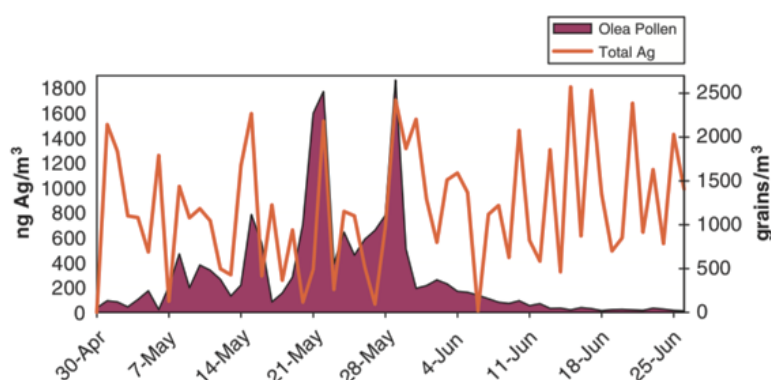


Figura 8. Comparación entre las actividades antigénicas del polen de *Olea* en las muestras de aire y las fluctuaciones diarias de granos de polen por metro cúbico de aire desde abril a junio⁸.

En el artículo¹⁶ también se estudió el comportamiento entre el polen de *Olea* y las concentraciones de Ole e 1 en la atmósfera. Ole e 1 es el alérgeno principal del olivo, siendo detectado en el suero un 80% de los alérgicos a *Olea*. Ole e 6, 7, 9 y 10 también presentan una importante incidencia. “Los fenómenos de reactividad cruzada entre Ole e 1 fueron confirmados en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, mientras que la reactividad cruzada relacionada a las demás proteínas alergénicas es producida por especies no relacionadas”. Las concentraciones de Ole e 1 y del polen de *Olea* se cuantificaron entre los años 2003 y 2008 en Cartagena y entre los años 2009 y 2013 en Ourense.

Para la comparación de las concentraciones se colocaron juntos los aparatos de medida en las áreas geográficas antes del periodo de floración del olivo. Se observó que el periodo de floración del olivo tuvo lugar en abril o mayo. Las concentraciones que se obtuvieron tanto de alérgeno como de polen se muestran en la tabla 4. En esta tabla se recogieron las variaciones de los índices de polen anual en las diferentes áreas geográficas. Se observó que durante los años en los que había mayores concentraciones de polen las

concentraciones de alérgenos eran menores. Las concentraciones más altas, tanto para el polen como para Ole e 1, se registraron en Cartagena.

Table 1

Number of days of the sampled period (N). Yearly average of the mean daily pollen and allergen concentrations (Mean). Pollen and allergen daily peak concentrations each studied year (Peak) and annual pollen index and the total annual allergen concentration (Total) each studied year. Allergenic potency calculated as the ratio between allergen/pollen. Average values of each sampling area were also showed.

City	Year	N	Allergen Ole e 1			Pollen Olea			Allergenic Potency
			Mean pg/m ³	Peak pg/m ³	Total pg	Mean pollen/m ³	Peak pollen/m ³	Total pollen	
Cartagena	2003	23	70.61	640.42	1624.03	99	453	2277	0.71
	2004	22	288.59	899.39	6348.98	63	246	1385	4.58
	2005	23	671.21	5182.29	15437.94	27	111	590	26.17
	2006	29	497.46	2752.86	14426.3	85	518	2461	5.86
	2007	12	709	3519.08	8508	206	311	2476	3.44
	2008	44	335.4	1777.56	14757.6	32	134	1397	10.56
	Average	26	428.7	2461.9	10183.8	85	296	1764	5.77
Ourense	2009	36	12.124	137.59	436.21	7	63	235	1.86
	2010	17	4.07	19.75	69.13	6	62	107	0.65
	2011	25	6.02	16.52	150.58	17	91	413	0.36
	2012	29	11	99.86	320	13	136	385	0.83
	2013	23	9.3	17.21	213.22	5	38	124	1.72
	Average	26	8.5	58.2	237.8	10	78	253	0.94

Tabla 4. Media anual de las concentraciones medias del polen diarias, picos de polen y concentración total anual del alérgeno¹⁶

Los cambios meteorológicos podrían explicar la discordancia entre las concentraciones de polen y las de alérgeno. Se pudo observar que, en Cartagena, las mayores concentraciones de polen y alérgeno en la atmósfera coincidieron con el paso de grandes masas de aire procedente del sur de España. En el caso de Ourense, las masas de aire durante los episodios de picos de alérgenos y polen provenían de grandes olivares situados en Portugal.

El análisis de correlación entre el polen de *Olea* o las concentraciones de alérgenos y las principales variables meteorológicas (temperatura, humedad, punto de rocío, velocidad del viento y precipitación) mostraron un alto grado de asociación positiva entre la presencia de Ole e 1 y la velocidad del viento y entre las concentraciones de polen y las temperaturas en Ourense.

En otros estudios, se ha determinado que las concentraciones anuales de polen de olivo en el sur de la Península Ibérica son 2'4 veces mayores que en el centro, siendo la exposición al alérgeno Ole e 1 7'6 veces mayor.

Polen atmosférico de *Fraxinus* y sus alérgenos

El fresno es un árbol de la familia *Oleaceae* con una amplia distribución en las zonas templadas del norte y centro de Europa. La sensibilidad al fresno es un problema en las zonas norte y centroeuropeas, así como en el área mediterránea. Su importancia alérgica no ha sido ampliamente estudiada en el sur de Europa debido a que sus niveles de polen atmosférico son bajos en esta zona²¹, aún así, debido a su alto grado de relación con el principal alérgeno del polen de olivo, con el que comparte el 88% de su ADN, constituye una causa importante de enfermedades respiratorias alérgicas tempranas en el sureste europeo.

En el artículo²² estudiaban cuatro alérgenos del polen de *Fraxinus*: Fra e 1, Fra e2, Fra e3 y Fra e9. Fra e 1 es el alérgeno principal de los pacientes sensibilizados al fresno y forma parte de la familia de proteínas similares a Ole e 1, mostrando una importante homología con otras proteínas de los miembros de la familia *Oleaceae* y presentando anticuerpos IgE específicos de este alérgeno alrededor de un 80% de alérgicos al fresno. Fra e 2 es reconocido por el 50% de los pacientes alérgicos al fresno. Fra e 3 es una proteína de unión a calcio y Fra e 9 es una 1,3 β -glucanasa ampliamente distribuida entre los vegetales superiores y considerada como un alérgeno importante.

En²⁴ las concentraciones de Fra e 1 en las muestras de aerosol fueron cuantificadas utilizando un Elisa específico de dos epítomos y anticuerpos anti Ole e 1, debido a la importante homología entre las proteínas de *Olea* y *Fraxinus*. El material de referencia utilizado fue Ole e 1, obtenido a partir de *Olea europea* por métodos cromatográficos estándar.

En²² se demuestra la presencia de reactividad cruzada entre diferentes especies de la familia *Oleaceae* así como la existencia de homólogos de Ole e 1 en extractos de polen de fresno en concentraciones similares a las detectadas en el polen de olivo en²³

En el artículo²⁴ también se determina la presencia de proteínas similares a Ole e 1, que podían ser detectadas utilizando anticuerpos anti Ole e 1. De esta forma, la gente sensibilizada a los granos de polen de olivo, pueden sufrir episodios alérgicos durante los meses de enero y febrero como consecuencia de la polinización de *Fraxinus* debido a fenómenos de reactividad cruzada entre sus alérgenos. El alérgeno Ole e 1 podría usarse como un biomarcador de los alérgenos de *Olea* y *Fraxinus*.

CONCLUSIONES

Para la cuantificación del polen atmosférico existen métodos estandarizados; se utiliza un captador volumétrico tipo Hirst (marca Burkard; Lanzoni). Las muestras se analizan al microscopio óptico y su identificación se basa en la morfología de esas partículas.

Se utilizan principalmente dos captadores de alérgenos, el ChemVol y el ciclón Burkard. El ChemVol es un método de captación de gran volumen y cuyo mecanismo se basa en el impacto de las partículas contra una espuma de poliuretano. El ciclón Burkard, por el contrario, es de bajo volumen y su mecanismo de acción consiste en la utilización de las fuerzas centrífugas de origen ciclónico.

Los métodos más utilizados en la cuantificación de los alérgenos polínicos son los inmunoensayos ELISA, siendo el ELISA en sándwich indirecto el más utilizado.

La cuantificación de alérgenos por ELISA puede ser una buena perspectiva de futuro, pudiendo permitir desarrollar métodos automatizados de cuantificación. Sin embargo, el estado actual de la metodología no permite usarla como único método de cuantificación de alérgenos.

La exposición al polen de olivo en el sur de la Península Ibérica es 2,4 veces mayor que en el centro, siendo la exposición a Ole e 1 7,6 veces mayor.

Hasta el momento, se han encontrado 10 alérgenos de *Olea*, siendo Ole e 1 su alérgeno principal. Existen homólogos de Ole e 1 en extractos de polen de fresno en concentraciones similares a las detectadas en el polen de olivo, siendo Fra e 1, el alérgeno principal de *Fraxinus*, uno de ellos.

Las concentraciones de polen y alérgeno en la atmósfera no siempre coinciden, dependen principalmente de la meteorología (lluvias, temperaturas, viento) pero también de factores estacionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. de Linares, D. Nieto-Lugilde, et al. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to Olea europaea pollen in S Spain. 2007;37(1):125-32.
2. Buters JTM, Antunes C, Galveias A, et al. Pollen and spore monitoring in the world. Clin Transl Allergy. 2018;8(1):1-5. doi:10.1186/s13601-018-0197-8
3. Galán C, Smith M, Thibaudon M, Frenguelli G, Oteros J, Gehrig R, Berger U, Clot B, Brandao R & EAS QC Working Group. Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis. Aerobiologia 2014; 30:385-395. Doi:10.1007/s10453-014-9335-5
4. Thibaudon M, Monnier S, Galán C, Bonini M, Röseler S. & Fernández González D. Normalización del método volumétrico tipo Hirst para redes aerobiológicas CEN/C264/WG39. Revista de Salud Ambiental 2017; 17: 40-43.
5. Galán C, Cariñanos P, Alcázar P & Domínguez E. Manual de calidad y gestión de la Red Española de Aerobiología. 2007, 61 pags. + CD. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba. ISBN 978-84-690-6354-5
6. Galán C, Plaza MP, Alcázar-Teno P. Muestreo de aeroalérgenos polínicos. Análisis y comparativa de técnicas. Rev. salud ambient. 2017;17(Espec. Congr.):39-49
7. Medicina FDE. Pólenes Y Las Variables Meteorológicas. 2011. Cabrera Sierra, M. (2011). Cuantificación de alérgenos de poaceae, oleaceae, plantaceae y cupressaceae en la atmósfera de Madrid y su correlación con los recuentos de pólenes y las variables meteorológicas y de contaminación. Doctorado. Complutense de Madrid.
8. De Linares, C., Nieto-Lugilde, D., Alba, F., Díaz de la Guardia, C., Galán, C. & Trigo, M. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to Olea europaea pollen in S Spain. Clin. Exp. Allergy 2007; 37: 125-132. Doi: 10.1111/j.1365-2222.2006.02620.x
9. De Linares, C., Díaz de la Guardia, C., Nieto Lugilde, D. & Alba, F. Airborne study of grass allergen (Lol p 1) in different-sized particles. Int Arch Allergy Immunol.

- 2010;152(1):49-57. doi: 10.1159/000260083.
10. Fernandez-Gonzalez, D., Gonzalez-Parrado, Z., Vega-Maray, A. M., Valencia-Barrera, R. M., Camazon-Izquierdo, B., De Nuntiis, P. & Mandrioli, P. Platanus pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. Clin. Exp. Allergy 2010; 40(11): 1701-1708. Doi 10.1111/j.1365-2222.2010.03595.x.
 11. Fernández-González, D., Rodríguez Rajo, F. J., González Parrado, Z., Valencia Barrera, R. M., Jato, V. & Moreno Grau, S. Differences in atmospheric emissions of Poaceae pollen and Lol p 1 allergen. Aerobiologia 2011; 27: 301-309. Doi 10.1007/s10453-011-9199-x
 12. Galán C, Plaza MP, Alcázar-Teno P. Muestreo de aeroalérgenos polínicos. Análisis y comparativa de técnicas. Rev. salud ambient. 2017;17(Espec. Congr.):39-49
 13. Plaza, M. P., Alcazar, P., Hernandez-Ceballos, M. A. & Galán, C. Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations. Atmospheric Environment 2016; 144: 361-369. Doi 10.1016/j.atmosenv.2016.09.008
 14. Plaza, M.P., Alcázar, P., Velasco-Jiménez, M.J. & Galán, C. Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods. Aerobiology. 2017; 33: 363-373. Doi 10.1007/s10453-017-9475-5.
 15. Vara, A., Fernández-González, M., Aira M. J. & Rodríguez-Rajo, F. J. Fraxinus pollen and allergen concentrations in Ourense (South-western Europe). Environ. Res. 2016; 147: 241-248. doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.014.
 16. Moreno-Grau, S., Aira, M.J., Elvira-Rendueles, B., Fernández-González, M., Fernández-González, D., García-Sánchez, A., Martínez-García, M.J., Moreno, J.M., Negral, L., Vara, A. & Rodríguez-Rajo, F.J. Assessment of the Olea pollen and its major allergen Ole e 1 concentrations in the bioaerosol of two biogeographical áreas. Atmosph. Environ. 2016; 145: 264-271. Doi 10.1016/j.atmosenv.2016.09.040.
 17. Crowther JR. The ELISA guidebook (2nd Edn.) in Series Springer Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 516 (Walker, J., Series ed.) Humana Press, New Jersey, 2009, 566 p. DOI: 10.1134/S000629790909017X
 18. Plaza, M.P., Alcázar, P., Velasco-Jiménez, M.J. & Galán, C. Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods. Aerobiology. 2017; 33: 363-373. Doi 10.1007/s10453-017-9475-5.
 19. Raulf, Monika & Buters, Jeroen & Chapman, Martin & Cecchi, Lorenzo & Blay, Frédéric & Doekes, G & Eduard, Wijnand & Heederik, Dick & Jeebhay, Mohamed. (2014). Monitoring of occupational and environmental aeroallergens – EAACI Position Paper. Allergy. 69. 1280-1299.
 20. 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.
 21. Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(2):351-357. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.001.
 22. Kernerman SM, McCullough J, Green J, Ownby DR. Evidence fo cross-reactivity between olive, ash, privet, and Russian olive tree pollen allergens. Ann Allergy; 1992; 69(6): 493-6. DOI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1471780.
 23. Lombardero M., Obispo T., Calabozo B., et al. Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e1-related proteins. Allergy 2002; 57(Suppl, 71): 29-34. Doi: 10.1034/j.1398-9995.2002.057s71029.x.
 24. Vara, M. Fernández-González, M.J. Aira et al. Fraxinus pollen and allergen concentrations in Ourense (South-western Europe). 2016; 147: 241-248. https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.014.