

NTP 335: Calidad de aire interior: evaluación de la presencia de polen y espora fúngicas

Qualité de l'air intérieur: évaluation de la présence des grains de pollen et des spores fongiques
Indoor air quality: pollen grains and fungi spores evaluation

Las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición.

Redactoras:

M. Carmen Martí Solé
Licenciada en Farmacia

Rosa M. Alonso Espadalé
Licenciada en Biología

Angelina Constans Aubert
Ingeniero Técnico Químico

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

Como continuación de las anteriores Notas Técnicas de Prevención referentes a la calidad de aire interior, se expone aquí el procedimiento a seguir para la evaluación en aire de polen y esporas fúngicas, cuya presencia en el mismo puede ser el origen de la aparición o aumento de los casos de alergia detectados en un ambiente interior.

Introducción

En los últimos años los problemas de contaminación biológica en ambientes interiores han recibido una importante atención, admitiéndose en general que los microorganismos presentes en el aire interior pueden causar problemas de naturaleza infecciosa y alérgica. Básicamente los efectos que pueden causar los distintos contaminantes biológicos presentes en el ambiente interior de un edificio sobre la población expuesta son:

- **Virus:** infecciones, aunque necesitan ser huéspedes de un ser vivo (célula) para desarrollarlas.
- **Bacterias:** infecciones.
- **Polen:** alergias.
- **Hongos y sus esporas:** alergias, aunque algunos hongos son capaces de producir unas sustancias tóxicas denominadas micotoxinas. Un ejemplo de estas últimas son las aflatoxinas.

Un procedimiento para la determinación de bacterias y hongos en aire interior se halla descrito en la NTP 299- Método para el recuento de bacterias y hongos en aire, existiendo métodos para el recuento total de bacterias y hongos en ambientes cerrados, así como para determinados tipos de bacterias como estafilococos, estreptococos y legionella. El método que se describe en esta NTP permite, además del recuento e identificación de hongos, la identificación de esporas fúngicas y de granos de polen directamente por observación al microscopio óptico.

Una variada gama de bacterias saprofitas y hongos se desarrollan en el interior de los edificios y pueden crecer en las superficies de recubrimiento de paredes, suelos y lugares donde se acumula polvo y en los sistemas HVAC (calefacción, ventilación, y aire acondicionado), liberando esporas y células en el aire, siendo Cladosporium y Penicillium los mohos más abundantes.

El polen y las esporas son elementos reproductores de las plantas fanerógamas y los hongos, respectivamente que son liberados de las anteras y esporangios por dehiscencia de estos órganos. Esta liberación puede ser de forma explosiva, de una sola vez, o de forma gradual, dependiendo de la planta de que se trate. Por ello, podemos considerar a las plantas como centros emisores de partículas, en este caso de partículas biológicas.

El polen se origina principalmente en las plantas de exterior y su concentración en el interior de edificios es normalmente mucho más baja que en el exterior debido al denominado efecto escudo de los edificios. En consecuencia, problemas respiratorios asociables a la presencia de polen en interiores, aparecerán en situaciones de elevada concentración exterior. En los edificios cerrados, la presencia

de polen en el aire interior pondrá de manifiesto un mal funcionamiento del sistema de filtración del aire de renovación o bien que existen aberturas al exterior no controladas. También pueden llegar a través de las personas y materiales procedentes del exterior por haberse fijado en éstos.

Alergias en ambientes interiores

Las alergias causadas por las esporas fúngicas y el polen son, según algunos autores, la causa más común del Síndrome del Edificio Enfermo (SEE). De ahí el interés de disponer de un procedimiento para su evaluación.

Se define la alergia como una reacción de hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad son consecuencia de la exposición a materiales del ambiente que actúan a modo de antígenos, estimulando la producción de anticuerpos específicos.

La Aerobiología estudia las partículas vivas, o biológicamente activas, constituyendo una parcela más del control del medio ambiente. El polen y las esporas fúngicas presentes en la atmósfera son partículas vivas, dispersas en el aire que entran en contacto con el organismo a través de las mucosas, durante el proceso de respiración. Su estudio en aire comprende la parte de la Aerobiología denominada Aeropalinología, que por otra parte presenta los casos más corrientes de la Aerobiología.

La Aeropalinología es una ciencia que está cobrando un gran interés en la actualidad, aunque ya era conocida desde el siglo pasado, cuando se descubrió que los granos de polen presentan una gran actividad al entrar en contacto con las mucosas humanas. Los fenómenos derivados de tal actividad se conocen con el nombre de Polinosis, que constituye un conjunto de afecciones producidas por el polen y las esporas con una importancia clínica y social de primer orden. La alergia polínica es una de las enfermedades más molestas y persistentes entre las no fatales, estando relacionada, tanto con la presencia en el aire de determinados granos de polen y esporas, como la concentración de los mismos. La etiología de dichas afecciones se debe a determinadas sustancias, existentes en las estructuras de los propios granos de polen y esporas, capaces de desencadenar procesos anafilácticos en los pacientes con una capacidad de reacción específica alterada frente a las mismas.

Los equipos de humidificación y enfriamiento del aire acondicionado pueden ser fuentes de bioaerosoles. Hay estudios que demuestran que humidificadores contaminados con agentes alergógenos como *Cephalosporium* y *Penicillium* se implicaron en episodios de alveolitis alérgica, también se ha descrito que los humidificadores de aire acondicionado pueden ser fuentes de contaminación de importantes antígenos como *Alternaria alternata* y *Aureobasidium pollulans* que son relevantes para la alveolitis alérgica denominada "pulmón del humidificador".

Métodos de captación

Para la captación del polen y esporas presentes en el aire existen diferentes procedimientos, agrupables en procedimientos pasivos (gravimétricos y de impacto pasivo) y activos o volumétricos (de impacto activo, y de filtración activa).

Los procedimientos activos de impacto y filtración, son los únicos que permiten expresar los resultados cuantitativamente, por unidad de volumen, relacionable, con la unidad de volumen respirada por la persona susceptible de padecer reacciones alérgicas. Por ello solamente se hará referencia a ellos.

Captación por impacto activo. "SAS compact"

Un volumen de aire es aspirado y conducido a través de una superficie perforada sobre una placa conteniendo un medio de cultivo adecuado. Este método es útil para la captación de bacterias y hongos y es el que se ha venido empleando en el INSHT para estos microorganismos (ver NTP-299), pero no es válido para la captación de granos de polen y solamente permite captaciones puntuales. Por ello en este estudio se ha empleado el captador MCV que se comenta posteriormente.

Captación por impacto activo. Captador Burkard

Este método se basa en el impacto de una masa de aire sobre una superficie captadora, que se desplaza con lentitud. La corriente de aire, en este caso, es activa gracias a una bomba de aire colocada debajo del colector. El aire entra por un orificio anterior e impacta sobre una superficie dispuesta verticalmente, constituida por una cinta transparente, impregnada por sustancias adhesivas.

Este método es útil porque la cinta puede permanecer durante una semana expuesta al aire. Gracias a los dispositivos mecánicos del aparato, el movimiento lento de la misma permite separar las capturas diarias y, también, hacer una aproximación horaria de las mismas. Por contra, debe tenerse especial cuidado en el montaje de la cinta para la observación microscópica, evitando la formación de burbujas y preparando montajes no demasiado gruesos.

Captación por filtración activa. Captador MCV

El aire a examinar es aspirado, a través de un filtro de acetato de celulosa (Millipore). Este tipo de filtro permite la identificación inmediata de las partículas ya que se transparenta con aceite de inmersión. Consta de una cámara filtradora con dispositivo de veleta, una bomba electromagnética de membrana para la aspiración de aire a bajo volumen, un contador y un temporizador horario. Este método fue diseñado por Suárez-Cervera & Seoane-Camba en 1983, comercializado por MCV (Barcelona) y es el descrito en la presente NTP.

Reactivos y productos

Todos los reactivos y productos deben tener como mínimo la especificación "para análisis" y el agua utilizada ha de ser bidestilada o de

calidad equivalente. Como medio de cultivo se emplea Agar Sabouraud con cloranfenicol (ver NTP-299) y como aceite de inmersión el específico para Microscopia.

Aparatos y material

Captador MCV.

Microscopio óptico (Objetivo de 32x, y objetivos de inmersión de 50x y de 100x).

Estufas de cultivo:

- Estufa de cultivo a 25 °C de temperatura, para los hongos.
- Estufa de cultivo a 37 °C de temperatura, para pruebas de esterilización de placas.

Campana de Seguridad Biológica de tipo II A.

Contador de Colonias.

Autoclave.

Filtros de éster de celulosa (Millipore) de 5 mm de poro y 7 cm de diámetro.

Portaobjetos: 76x26 mm

Portaobjetos: 75x25x1,0 mm cantos pulidos 450.

Cubreobjetos.

Contenedores para residuos biológicos.

Placas de Petri.

Procedimiento

Toma de muestras

El aire aspirado por la bomba entra en la cámara filtradora a través de un orificio de 3 mm de diámetro, e incide perpendicularmente sobre el filtro, que está dispuesto en sentido horizontal. El diseño de la cámara permite que sobre el filtro queden retenidas tanto las partículas directamente aspiradas por la bomba, como aquellas que por efecto de la turbulencia, pudieran quedar en suspensión en la cámara. El aparato se pone en marcha 24 horas, transcurridas las cuales se procede al cambio de filtro.

Preparación y lectura del filtro

Cada filtro correspondiente a una muestra se divide en dos mitades, una de las cuales se dispone sobre dos portaobjetos con aceite de inmersión. Sobre el filtro, que debe quedar completamente transparente, se colocan dos cubreobjetos de 24x60 mm, cortando el filtro por la línea del portaobjetos y quedando así la preparación lista para ser observada al microscopio óptico (MO) y archivada por tiempo indefinido. Esta preparación permite efectuar la identificación y recuento de granos de polen y determinadas esporas a partir del cual se procede al cálculo del número de granos de polen y esporas por m³ de aire. Los granos de polen y las esporas se hallan dispersos en el filtro, aunque son fácilmente identificables. El resultado se basa en un barrido completo de todo el portaobjetos, lo cual es un proceso extremadamente lento. Una estimación aproximada del tiempo necesario para la observación completa de un portaobjetos se fijaría alrededor de 8 horas, aunque, según de donde proceda la muestra tendrá mayor o menor número de elementos para su identificación, lo que puede modificar este tiempo de análisis. En el apartado de observación al microscopio se dan más detalles del procedimiento.

Cultivo

La otra mitad del filtro se subdivide a su vez en dos partes y cada una de ellas se dispone en una placa de Petri conteniendo Agar Sabouraud como medio de cultivo y a continuación se incuba durante cinco días a una temperatura de 25°C.

También se utilizará el mismo medio de cultivo para las resiembras posteriores mediante las cuales se llegará a la identificación morfológica de los hongos crecidos en la placa.

Recuento de colonias

Transcurrido el tiempo de incubación, se observa el crecimiento de las colonias que en este caso ya son los hongos y se procede al recuento de los mismos mediante un contador de colonias que proporciona el n° de hongos por placa.

Posteriormente se procede a la identificación morfológica.

Observación al microscopio

Para la identificación del polen y las esporas es totalmente imprescindible obtener preparaciones muy limpias y utilizar un objetivo de inmersión para obtener determinaciones exactas. Dado que se trata de un trabajo laborioso y diariamente debe procederse al conteo de muchos granos de polen y esporas es aconsejable utilizar un objetivo de pequeño aumento (por ejemplo de 32x) para hacer los recuentos rutinarios, mientras que para resolver algún problema concreto, es aconsejable uno de inmersión de 50x, y en algunos casos es necesario finalizar la observación con uno de inmersión de 100x.

Polen

Por lo que se refiere a los granos de polen, sólo interesará obtener una idea cuantitativa aproximada. En principio sólo deben encontrarse en casos de edificios muy abiertos cuando la concentración exterior es muy elevada o bien cuando el aire de renovación no es adecuadamente filtrado. También pueden penetrar adheridos a ropa y materiales procedentes del exterior. Un análisis cualitativo exhaustivo sólo tendría sentido en casos de detección de reacciones alérgicas muy específicas.

Esporas

En cuanto al recuento de esporas, algunas tienen forma característica y particular y por lo tanto es fácil diferenciarlas. En otros casos, sin embargo, ocurre que aunque se trate de géneros distintos las esporas presentan la misma forma; en este caso se engloban de forma genérica en los apartados siguientes:

1. espora de color.
2. espora hialina.
3. didimospora de color.
4. didimospora hialina.
5. fragmospora de color.
6. fragmospora hialina.

Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, por ejemplo, se encuentran como esporas hialinas y, en cambio, el *A. niger*, aparece como espora de color.

Cálculos

Se efectúa al M.O un recuento del nº de granos de polen y de esporas en la parte del filtro examinada y, conocido el volumen de muestreo, los resultados se obtienen según la siguiente expresión:

$$\text{nº total de GP} = \frac{\text{RGP (o RE)} \times 1.7}{V}$$

nº total de GP: número de granos de polen por m³

RGP (o RE): número de granos de polen (o esporas) hallados en el recuento.

1,7: Factor de corrección.

V: Volumen de aire muestreado expresado en m³

Evaluación

La Comisión de la ACGIH para los Bioaerosoles ha desarrollado unas guías para evaluar estos agentes en los ambientes interiores recogidas en la publicación titulada *Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment*, ACGIH (1989). Estas guías tienen en cuenta la valoración médica de los síntomas, la evaluación del funcionamiento del edificio y el juicio profesional. Por las razones que se indican a continuación, no hay criterios numéricos o valores TLVs que permitan una interpretación sencilla de los datos sobre bioaerosoles, no recomendándose un muestreo rutinario para estos agentes. Si fuera necesario muestrear (p.e. para documentar la contribución de las fuentes identificadas) en las guías se recomiendan protocolos estándar.

Las mezclas de los contaminantes ambientales producidos biológicamente están omnipresentes en la naturaleza y pueden modificarse por la actividad humana. Todas las personas están expuestas repetidamente, día tras día, a una amplia variedad de estos contaminantes. No hay valores TLVs para las concentraciones de organismos totales cultivables o contables y partículas (p.e. *Aspergillus fumigatus*), agentes infecciosos (p.e. *Legionella pneumophila*) o contaminantes de procedencia biológica analizables (p.e. endotoxinas o compuestos orgánicos volátiles).

Un valor TLV general para la concentración de los bioaerosoles cultivables (p.e. hongos y/o bacterias totales) o contables (p.e. pólenes totales, esporas de hongos o bacterias) no tiene justificación científica porque:

- Los organismos cultivables o esporas contables no constituyen una sola entidad; es decir, los bioaerosoles son mezclas complejas de diferentes clases de partículas.
- Las respuestas de los humanos a los bioaerosoles varían desde efectos inocuos hasta enfermedades graves, dependiendo del agente específico y los factores de susceptibilidad de cada persona.
- Las concentraciones medidas de los bioaerosoles cultivables y contables dependen del método de toma de muestra y análisis.

No es posible recoger y evaluar todos los componentes de los bioaerosoles utilizando un único método de muestreo.

En ambientes considerados estériles el nº de UFC/ m³ debe ser 0.

Glosario

Dado que se han empleado términos poco corrientes en calidad de aire interior, se incluye un pequeño glosario de los mismos.

ANTERA: Parte del estambre de las flores que contiene el polen.

ANTICUERPO: Sustancia que se produce en el organismo y que se opone a la acción de elementos patógenos. También se puede definir como sustancia específica de los animales inmunes, producida como reacción a la presencia de un antígeno y que ejerce una acción antagónica específica sobre la sustancia por cuya influencia se ha formado. Es el agente de la inmunidad.

ANTÍGENO: Sustancia que, introducidas en el organismo, estimula la formación de anticuerpos.

BACTERIA: Microorganismo celular que se reproduce por escisión.

DEHISCENCIA: Apertura de forma natural de las anteras de las flores para dar salida al polen. Se emplea también para denominar la apertura del polipodio de un fruto para expulsar la semilla.

DIDIMOSPORA: Espora fragmentada en dos porciones.

ENDOTOXINA: Toxina retenida en el cuerpo vivo de las bacterias, que no se separa de ellas sino por disgregación de las mismas.

ESPORANGIO: Fruto o cápsula que contiene las esporas libres en su interior.

ESTAFILOCOCO: Nombre dado a ciertas bacterias de forma redondeada, que se agrupan como en racimos.

ESTAMBRE: Órgano sexual masculino de las plantas fanerógamas, que se halla hacia el centro de las flores.

ESTREPTOCOCO: Nombre dado a ciertas bacterias de forma redondeada que se agrupan en forma de cadena.

FANERÓGAMA: Plantas cuyos órganos sexuales se distinguen a simple vista.

FRAGMOSPORA: Espora dividida en diferentes porciones

HONGO: Cualquiera de las plantas acotiledóneas o celulares, desprovistas de clorofila, y de consistencia esponjosa, carnosa o gelatinosa.

LEVADURA: Organismo unicelular, de la familia de los blastomicetos, que se reproduce por gemación.

MICOTOXINA: Sustancia tóxica secretada por hongos microscópicos.

MICROORGANISMO: Organismo microscópico.

MOHO: Depósito o capa que se presenta en las sustancias orgánicas por el desarrollo de diferentes hongos de los géneros Mucor, Penicillium, Aspergillus, etc.

VIRUS: Cualquiera de los agentes infecciosos más pequeños que las formas corrientes de bacterias, algunas apenas visibles y otras invisibles con el microscopio ordinario, que pasan a través de los filtros, de un tamaño entre 0,2 y 0,01 m. Se multiplican en el cuerpo animal pero no pueden ser cultivados en medios inertes sino que requieren células vivas.

Bibliografía

(1) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS
Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment
ACGIH, Cincinnati, Oh. USA, (1989)

(2) ACGIH
1993-1994.TLVs. Valores límite para sustancias químicas y agentes físicos en el ambiente de trabajo. BEIs. Índices biológicos de exposición

ACGIH, Cincinnati, Oh, USA (1993)
Versión española. Generalitat Valenciana. Conselleria de Treball i Afers Socials. Valencia, (1994)

(3) ANTÓ J. M., SUNYER J., RODRIGUEZ R., SUAREZ-CERVERA M., VAZQUEZ L.
Community Outbreaks of Asthma Associated with Inhalation of Soybean Dust

(4) INEGOLD S., BARON E.

Diagnóstico Microbiológico (Bayley and Scott)

Ed. Médica Panamericana, 7ª Edición. (1989)

(5) BERENGUER M.J., HERNANDEZ A., MARTÍ M.C., NOGAREDA C., SOLÉ M.D., GUARDINO X.

El Síndrome del edificio enfermo. Guía para su evaluación (en impresión)

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Madrid, España. (1994)

(6) DIRECTIVA 901679/CEE

Directiva del Consejo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (Séptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE).

Diario Oficial de Comunidades Europeas L 374, 1-12, (31-12-90)

(7) FERNANDEZ D., SUAREZ-CERVERA M., DIAZ T., VALENCIA R.M.

Airborne pollen spores of León (Spain)

Int. J. Biometerol. 37:89-95 (1993)

(8) FLANNIGAN B.

Indoor Microbiological Pollutants-Sources, Species, Characterisation and Evaluation, in Chemical, Microbiological, Health and Comfort Aspects of Indoor Air Quality-State of the Art in SBS, de Knóppel, H. y Wolkoff, P., editores. Kluwer Academic Publishers (for the CEC). Dordrecht, (1992).

(9) INSTITUT PASTEUR PRODUCTION

Culture Media and Laboratory Reagents Pasteur. 2ª Edición

Institute Pasteur. Paris, (1982)

(10) LENNETTE E., BALOWS A., HAUSLER W., SHADOMY H.

Manual de Microbiología Clínica, 4ª Edición

Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. (1987)

(11) MAC FADDIN J. F.

Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria, 2nd Edition

Ed. Williams & Wilkins. (1980)

(12) MARTÍ M.C.

Determinación de contaminantes biológicos en ambientes cerrados

Proc. I Conferencia Nacional de Higiene Industrial. Valencia, 16-18, Noviembre (1988)

(13) MULLER E., LOEFFLER W.

Micología. 1ª Edición

Ediciones Omega, S.A., Barcelona (1976)

(14) ROSES M., TORRES J.

An aerobiological study of pollen grains and fungal spores of Barcelona (Spain)

Aerobiología 8:255-265 (1992)

(15) SUAREZ-CERVERA M., MARQUEZ J.

Manual de Aerobiología

Departamento de productos Naturales. Biología Vegetal Sanitaria y Edatología: Unidad de Botánica Universidad de Barcelona. Barcelona (1990)

(16) SUAREZ-CERVERA M., SEOANE J.

Sobre el sistema de filtración automática en aerobiología

An Asoc. Palinol. Leng. Esp. 2:307-317(1985)

(17) MIEBERLING F., SCHWANTES H.

Botánica Sistemática. 2ª Edición

Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1976