

## Níveis atmosféricos de esporos de *Alternaria* e *Cladosporium* na cidade de Beja e seu envolvimento na doença alérgica respiratória

Elsa Almeida<sup>1,2</sup>, Elsa Caeiro<sup>3,4</sup>, Ana Todo-Bom<sup>5</sup>, Luiz Gazarini<sup>4,6</sup>, Ana Duarte<sup>7</sup>

1. Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora. Évora, Portugal. elsaalmeida.1983@gmail.com
2. Serviço de Patologia Clínica, Hospital José Joaquim Fernandes, Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo. Beja, Portugal.
3. Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Lisboa, Portugal.
4. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora. Évora, Portugal.
5. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.
6. Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora. Évora, Portugal.
7. Serviço de Cardiopneumologia, Hospital José Joaquim Fernandes, Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo. Beja, Portugal.

**RESUMO: Introdução** – Os esporos fúngicos são uma das maiores componentes biológicas atmosféricas; no entanto, são ainda pouco estudados e não lhes é reconhecida a influência devida na doença alérgica respiratória. Neste trabalho pretende-se determinar a importância dos níveis de esporos atmosféricos de *Alternaria* e *Cladosporium* na doença alérgica respiratória na cidade de Beja. **Método** – Analisaram-se os níveis atmosféricos de esporos de *Alternaria* e *Cladosporium* na cidade de Beja. A metodologia utilizada é recomendada pela Rede Portuguesa de Aerobiologia: utilizou-se um coletor volumétrico do tipo Hirst, um *Burkard seven-day Volumetric Spore-trape*<sup>®</sup>; os esporos foram coletados numa bobine que continha uma fita de Melinex impregnada com silicone e corados com solução de glicerogelatina com fucsina básica. Para a leitura das amostras utilizou-se o método de leitura das quatro linhas longitudinais ao microscópio ótico com uma ampliação de 400x. Os resultados obtidos foram convertidos e expressos em número de esporos por metro cúbico de ar. Selecionaram-se doentes alérgicos a fungos com provas de sensibilização positivas para o alérgénio mx1 e realizou-se uma análise de diagnóstico molecular de sensibilização ao alérgénio Alt a1 através do equipamento Phadia 250<sup>®</sup> pelo método de imunoensaio fluoroenzimático. **Resultados** – No período deste estudo registaram-se 320.862 esporos do tipo *Cladosporium* e 20.741 esporos do tipo *Alternaria*. Os testes de diagnóstico molecular confirmaram que 81% dos doentes sensibilizados a fungos são alérgicos a *Alternaria*. **Conclusão** – Os níveis atmosféricos de *Alternaria* são elevados e provocam sensibilização alérgica nos doentes da região de Beja. O alérgénio Alt a1 permite identificar a maioria dos doentes alérgicos a fungos nesta região.

*Palavras-chave: Esporos fúngicos; Alternaria; Cladosporium; Alt a1; Alergia respiratória*

## Atmospheric levels of *Alternaria* and *Cladosporium* spores in the city of Beja and their involvement in respiratory allergic disease

**ABSTRACT: Introduction** – Fungal spores are one of the major biological components of the air, but are still poorly studied and their influence on respiratory allergic disease is not recognized. In this work we intend to determine the importance of the atmospheric spores of *Alternaria* and *Cladosporium* in respiratory allergic disease in Beja. **Methods** – The atmospheric levels of *Alternaria* and *Cladosporium* spores in Beja were analysed. The methodology used and recommended by the Portuguese Aerobiology Network was used: a Hirst volumetric collector, a *Burkard seven-day Volumetric Spore-trape*<sup>®</sup>; the spores were collected on a reel containing a Melinex tape impregnated with silicone and stained with glycerogelatin solution with basic fuchsin. For the reading of the samples was used the method of reading the four longitudinal lines to the optical microscope with a magnification of 400x. The results obtained were converted and expressed in number of spores per cubic meter of air. Allergic patients with fungal allergens with positive mx1

allergen sensitization were selected and a molecular diagnosis of allergen sensitization to Alt a1 was performed via the Phadia 250® device by the fluoroenzyme immunoassay method. **Results** – During the study period, 320,862 *Cladosporium* spores and 20,741 spores of the *Alternaria* type were recorded. Molecular diagnostic tests have confirmed that 81% of patients sensitized to fungi are allergic to *Alternaria*. **Conclusion** – The atmospheric levels of *Alternaria* are high and cause allergic sensitization in patients in Beja region. The Alt a1 allergen allows the identification of most fungal allergic patients in this region.

*Keywords: Fungal spores; Alternaria; Cladosporium; Alt a1; Respiratory allergic disease*

## Introdução

Os fungos são organismos eucariotas, saprófitos e cosmopolitas, têm capacidade de colonizar diferentes substratos e de resistir a condições ambientais extremas. Constituem uma grande componente de bioaerossóis, quer dos ambientes interiores quer dos ambientes exteriores. São importantes na colonização de campos de cultivo, locais de armazenamento e também no desperdício de géneros alimentícios. O seu *habitat* é preferencialmente húmido e escuro e vivem à custa da digestão de matéria orgânica<sup>1</sup>.

Os fungos *Alternaria* e *Cladosporium* desenvolvem-se preferencialmente em temperaturas amenas, entre 13 e 22 °C, e valores de humidade baixos, entre 50-60%. Valores inferiores ou muito superiores a estes intervalos dificultam o seu desenvolvimento<sup>2-4</sup>. A *Alternaria* pertence à classe dos Deuteromycetas e a maioria das espécies são saprófitas e capazes de colonizar vários substratos como o papel e alimentos<sup>5</sup>. A sua identificação é muito complexa, devida à grande variabilidade morfológica das espécies. A forma, cor e biometria dos conídios é afetada por condições ambientais e fatores intrínsecos. Assim, a forma dos conídios pode ser cilíndrica, elipsoidal, obpiriforme ou oblavada. A coloração pode variar entre acastanhado a castanho-escuro, a parede pode ser lisa ou verrucosa, com número variável de septos transversais e longitudinais ou por vezes até oblíquos. Os esporos formam-se em esporóforos livres, que podem ser individuais ou cadeias de tamanho variável<sup>5</sup>. O género *Cladosporium* pertence à mesma classe e apresenta grande variabilidade de formas, tamanhos, número de septos e coloração, e as cadeias podem ser mais ou menos longas e ramificadas. O tamanho dos esporos ou conídios é em média 10 µm, mas pode variar entre 3 e 200 µm de diâmetro<sup>6</sup>.

A dispersão e o transporte dos esporos fúngicos são feitos pelo ar e o seu reduzido tamanho torna-os potencialmente nefastos para o Homem, sendo que alguns são considerados alergizantes<sup>7</sup>. O desencadeamento, o tipo e o grau de sintomatologia da doença alérgica dependem dos níveis de concentração de esporos presentes na atmosfera e do tempo de exposição dos indivíduos<sup>8</sup>. Níveis de *Cladosporium* superiores a 2.000 esporos/m<sup>3</sup>/dia e de *Alternaria* superiores a 50 esporos/m<sup>3</sup>/dia são citados na literatura como capazes de desencadear sintomas alérgicos, como prurido, rinorreia, obstrução nasal, espirros e tosse<sup>6</sup>.

Em países desenvolvidos, cerca de 6% da população humana apresenta sensibilização<sup>9-10</sup>. Num estudo Europeu, desenvol-

vido pela *Global Allergy and Asthma European Network*, 8,5% dos doentes Portugueses alérgicos eram sensibilizados para *Alternaria* e 10,3% para *Cladosporium*<sup>11</sup>. Em Portugal não existem muitos estudos sobre a carga aeromicológica atmosférica; para a localidade de Beja não se conhece nenhum estudo, o que torna a monitorização dos esporos de fungos presentes no ar atmosférico desta região de grande interesse.

O estudo de sensibilização a extratos de *A. alternata* é dificultado pela grande variabilidade que apresenta. Em culturas consecutivas os perfis podem sofrer pequenas variações e a presença dos principais alergénios depende das condições para o seu desenvolvimento. No entanto, a biologia molecular permitiu uma melhor compreensão da relação destes alergénios com a doença. São conhecidos vários alergénios relacionados com *Alternaria*, mas Alt a1 é um alergénio *major* com 29,2-31 kDa e o principal alergénio de *Alternaria* conhecido. É estável a temperaturas elevadas.

Neste trabalho pretende-se relacionar o conteúdo em esporos de *Cladosporium* e *Alternaria* da atmosfera da cidade de Beja e avaliar a seu envolvimento nas sensibilizações em doentes alérgicos, nomeadamente ao alergénio Alt a1.

## Métodos

### Análise aerobiológica

Monitorizaram-se os esporos fúngicos de *Cladosporium* e *Alternaria* de uma forma contínua desde dia 12 de abril de 2012 até 30 de julho de 2014. A metodologia utilizada foi a recomendada pela Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA)<sup>12-13</sup>. Utilizou-se um coletor volumétrico do tipo Hirst, um *Burkard seven-day Volumetric Spore-trape*® que foi colocado na latitude (38° 0' 50" E) e longitude (7° 52' 12" W). Os esporos foram coletados numa bobine que continha uma fita de Melinex impregnada numa solução de silicone (substância adesiva). A amostragem decorreu durante sete dias consecutivos e, após esse período, a bobine foi recolhida e substituída para nova amostragem. Este coletor tem um fluxo de 10L/min semelhante ao inalado pelo Homem. Em laboratório, as amostras foram processadas, a fita foi cortada em segmentos de 48mm (segmentos de um dia), colocada em lâminas de microscopia e corada com uma solução de glicero-gelatina com fucsina básica. O corante utilizado não se destinava à identificação dos esporos de fungos mas à dos grãos de pólen. O uso deste corante não afetou a identificação dos esporos fúngicos analisados. Para a leitura das amostras utilizou-se o método de leitura das quatro linhas longitudinais

ao microscópio ótico com uma ampliação de 400x. Os resultados obtidos foram convertidos e expressos em número de esporos por metro cúbico de ar<sup>13</sup>.

### População

Para a análise da sensibilização ao alergénio molecular *major* do fungo *Alternaria* selecionaram-se dezasseis doentes, cujo critério de inclusão era o de o doente apresentar sensibilização a esporos fúngicos (mx1). Dado que o número de doentes sensibilizados a mx1 foi reduzido, não foi estabelecido qualquer critério de exclusão.

A maioria era do sexo masculino (10/16), com idades entre 5 e 58 anos e com uma média de idades de 23 anos.

### Estudo molecular de sensibilização

Utilizou-se a tecnologia *singleplex* ImmunoCAP (monocomponentes) para alergénios moleculares em dezasseis doentes. Fizeram-se determinações dos alergénios do alergénio m229 (Alt a1) no equipamento automático Phadia 250<sup>®</sup> Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden. O equipamento utiliza uma fase sólida de um polímero hidrofílico ativado onde o alergénio está covalentemente ligado, incorporado numa cápsula que servirá de recipiente para o ensaio. É um imunoensaio fluoroenzimático (FEIA) em sanduíche. O alergénio purificado reagiu com as IgE específicas presentes na amostra de soro do doente. Após a lavagem para retirar compostos não ligados, adicionaram-se anticorpos marcados por uma enzima (fluoróforo) contra a IgE específica e formam-se complexos. Após incubação, o complexo formado, enzima-anti-IgE, foi incubado com o substrato. Por fim, a reação foi interrompida com uma solução *stop* e mediu-se a fluorescência do eluído. A fluorescência foi diretamente proporcional à presença de IgE específica na amostra<sup>14-15</sup>. Seguiram-se todas as recomendações do fabricante, as curvas de calibração, controlos da curva e controlos de qualidade interna permitiram a validação e aceitação dos valores obtidos. Foram considerados positivos valores de IgE superiores a 0,35KU<sub>A</sub>/L.

### Condições de ética

Este artigo não foi publicado em nenhuma revista anteriormente e não será enviado enquanto aguarda a aprovação solicitada. Os autores participaram diretamente na execução e leram e concordaram com a versão final aqui apresentada.

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética da Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo (ULSBA, EPE) e os autores não declaram qualquer conflito de interesses.

## Resultados

### Caracterização anual das concentrações atmosféricas

Os esporos do tipo *Cladosporium* registaram-se na atmosfera de Beja durante todo o período analisado, tendo-se coletado um total de 320.862 esporos. Em 2012 contaram-se 92.351 esporos de *Cladosporium*. Em 2013 analisaram-se 123.864 e em 2014 registou-se a presença de 104.647 esporos de *Cladosporium* na atmosfera da cidade de Beja (cf. Tabela 1).

**Tabela 1.** Índice anual de esporos de fungos de *Cladosporium* contados durante os vários anos do período de estudo (abril de 2012 a julho de 2014)

	Total esporos contados
2012	92.351
2013	123.864
2014	104.647

Relativamente ao tipo *Alternaria*, no período analisado coletou-se um total de 20.741 esporos. No ano de 2012 registaram-se 6.306 esporos de *Alternaria*. Em 2013 coletaram-se 5.822 e no ano de 2014 registaram-se 8.613 esporos (cf. Tabela 2).

**Tabela 2.** Índice anual de esporos de fungos de *Alternaria* contados durante os vários anos do período de estudo (abril de 2012 a julho de 2014)

	Total esporos contados
2012	6.306
2013	5.822
2014	8.613

### Níveis capazes de desencadear sintomatologia

Apesar dos níveis de *Cladosporium* obtidos, não se detetou nenhum dia em que a concentração média diária de esporos fosse superior a 2.000 esporos/m<sup>3</sup>/dia, valor de concentração mínimo citado na literatura capaz de desencadear sintomas de alergia<sup>6</sup>.

No caso dos esporos de *Alternaria*, níveis superiores a 50 esporos/m<sup>3</sup>/dia estão citados como capazes de provocar sintomatologia alérgica<sup>6</sup>. Durante o ano de 2013, este facto verificou-se em 24 dias, distribuídos pelos meses de maio, junho, julho, setembro e outubro (cf. Tabela 3).

**Tabela 3.** Dias com níveis de esporos de fungos de *Alternaria* prejudiciais para pacientes alérgicos registados durante o período de estudo (abril de 2012 a julho de 2014)

Esporos/m <sup>3</sup>	2012	2013	2014	Total
[40-50]	12	10	17	39
>50	22	21	38	81
>100	11	3	22	36
Total dias	45	34	77	156

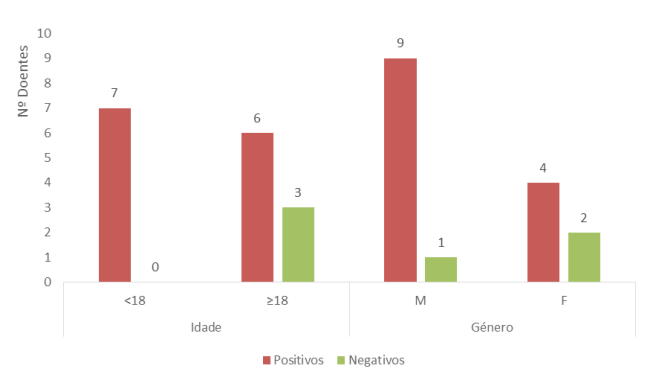
### Sensibilização a alérgenos moleculares de *Alternaria*

No grupo de doentes, a maioria dos participantes é do sexo masculino e apenas seis são do sexo feminino. As idades variam entre cinco e 58 anos e a média é de 23 anos. Neste grupo, 13 apresentam sensibilização para o alérgeno Alt a1 e só três doentes foram negativos para esta pesquisa (cf. Tabela 4).

**Tabela 4.** Distribuição da população sensibilizada ao alérgeno Alt a1

	Frequência	%
Positivos	13	81
Negativos	3	19

Graficamente percebe-se que o maior número de doentes sensibilizados (representados a vermelho) é do sexo masculino e menor de 18 anos (cf. Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição de sensibilização para o alérgeno Alt a1 por idade e género.

### Discussão

Os esporos de *Cladosporium* são descritos como os esporos mais frequentes e/ou abundantes em vários estudos<sup>8,16</sup>. Em Beja observou-se a sua presença na atmosfera durante todo o ano. Os valores dos índices anuais de *Cladosporium* nos anos de 2012 (92.351 esporos) e 2014 (104.647 esporos) foram inferiores aos registados em 2013 (123.864 esporos); esta variabilidade poderá ser explicada pelas diferenças climáticas, meteorológicas e a vegetação, entre outras<sup>17</sup>.

Apesar das concentrações importantes, não se registaram valores de concentrações diárias superiores aos limites citados por Ivanovic e seus colaboradores<sup>6</sup> com capacidade de desencadear sintomas alérgicos.

Neste estudo, os índices anuais de *Alternaria* foram inferiores aos de *Cladosporium*. No ano de 2013 coletaram-se 5.822 esporos e em 2012 e 2014, que não foram estudados

na totalidade, 6.306 e 8.613 esporos, respetivamente. Nunes e colaboradores<sup>8</sup> descrevem as cidades da região Sul de Portugal, pelas suas características climatéricas e de vegetação, como tendo uma maior concentração de esporos fúngicos na atmosfera, destacando uma representatividade de 6,9% em Coimbra, 4,4% em Lisboa, 2,9% em Évora e 3,3% em Portimão. Segundo Oliveira e seus colaboradores<sup>1</sup>, no Porto e em Amares, os esporos de *Alternaria* representam 1% do pólen total. Os esporos de *Alternaria*, apesar de muito menos abundantes no ar atmosférico, constituem importantes alérgenos na doença alérgica respiratória<sup>8,11</sup>. *Alternaria* é referida como o fungo que produz o número mais elevado de testes cutâneos positivos, seguido pelos *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Candida*<sup>18</sup>. Neste estudo registaram-se vários dias cujos níveis de esporos de *Alternaria* ultrapassaram os 50 esporos/m<sup>3</sup>, níveis citados como capazes de provocar sintomatologia em doentes sensibilizados<sup>6</sup>. Estes limites de risco não são consensuais entre todos os autores. Por exemplo, Rizzi-Longo e seus colaboradores<sup>19</sup> consideram níveis superiores a 100 esporos/m<sup>3</sup> – este limiar também foi ultrapassado em vários dias durante este estudo.

Em Espanha, 6% dos doentes com rinoconjuntivite eram sensibilizados e pensa-se que 8,5% da asma neste país é induzida por contacto com esporos fúngicos. Em Portugal, esta realidade também se observa em 8,5% dos doentes com suspeita de doença alérgica respiratória<sup>11</sup>. Num estudo realizado na região Centro de Portugal, 23% dos doentes com rinite alérgica estudados estavam sensibilizados ao extrato total de *Alternaria Alternata*<sup>20</sup>. Curiosamente, os valores de sensibilização a esporos fúngicos em Beja foram baixos ao contrário do descrito na literatura<sup>11,21</sup>. A dificuldade em associar a sintomatologia à presença de esporos atmosféricos<sup>22-23</sup>, mas também o clima predominantemente quente e com escassez de humidade, não é muito sugestivo do desenvolvimento de fungos.

Apesar de não ser possível, neste estudo, relacionar a sintomatologia e os níveis de esporos fúngicos, estes poderão contribuir para o agravamento da patologia, como demonstrado por outros autores<sup>10-11,24</sup>. A dificuldade em estabelecer suspeição de relação entre exposição e aparecimento de sintomatologia resulta numa diminuta solicitação por parte dos clínicos de testes de diagnósticos dirigidos à identificação de alergia a fungos<sup>22-23</sup>. Acresce o facto dos extratos totais conterem elevada variabilidade antigénica e, consequentemente, levantarem dúvidas na sua interpretação, nomeadamente por não serem conclusivos no que diz respeito a alérgenos de reatividade cruzada<sup>25</sup>. Contudo, as elevadas concentrações atmosféricas de *Alternaria* sugerem que são importantes agentes sensibilizadores na população do Baixo Alentejo.

Optou-se, no presente estudo, por identificar a sensibilização ao alérgeno Alt a1, por ser o alérgeno *major* da *Alternaria Alternata*. A *Alternaria* é o principal alérgeno fúngico sensibilizante para ambiente exterior<sup>25-26</sup> e >90% dos doentes sensibilizados apresentam provas reativas para Alt a1<sup>29</sup>. A família Pleosporaceae (*Stemphylium botryosum*, *Ulocladium Botrytis* e *Curvularia lunata*) apresenta um alérgeno homólogo

a Alt a1 e um elevado índice de reatividade cruzada com este alergénio<sup>25</sup>.

Neste estudo, o número de participantes foi reduzido face ao reduzido número de doentes que foram identificados pelos clínicos como tendo suspeição de alergia a fungos, através da sintomatologia e contexto clínico. Do grupo de dezasseis doentes testados, treze (81%) apresentaram sensibilização para o alergénio Alt a1 e apenas três (19%) foram não reativos. Face à elevada sensibilidade e estabilidade deste teste admite-se que, nos doentes com testes de sensibilização para Alt a1 negativos e com testes de rastreio (mx1) positivos, podem estar presentes sensibilizações a outros esporos de fungos, nomeadamente a *Cladosporium*. Percebe-se que o maior número de doentes sensibilizados é do sexo masculino. Demonstrou-se também que os menores de 18 anos estão mais sensibilizados do que os adultos.

Atualmente, e apesar de a alergenicidade dos fungos estar provada, a sua importância na doença alérgica é ainda subestimada<sup>27-28</sup>. Apenas com procura clínica mais cuidada se poderão identificar corretamente os doentes e relacionar os níveis atmosféricos com indicadores de controlo da doença ou consumo de medicação.

## Conclusão

Este trabalho permitiu concluir que os esporos de *Cladosporium* são muito comuns na atmosfera da cidade de Beja e estão presentes no ar durante todo o ano. Também os esporos de *Alternaria* apresentaram níveis atmosféricos importantes, mas menos abundantes, comparativamente com os esporos de *Cladosporium*.

Os esporos de *Alternaria* registaram em vários dias concentrações médias superiores aos valores limites referidos com capacidade para desencadear sintomas alérgicos em indivíduos sensíveis.

Apesar dos baixos índices de suspeita de sensibilização a fungos na cidade de Beja, o alergénio Alt a1 apresenta resultados reativos na maioria dos doentes estudados. Assim, fica demonstrado que este tipo de sensibilização está presente na região e que face à elevada exposição ambiental a fungos fortemente alergizantes, o número de doentes registados não representa, provavelmente, o valor real de sensibilização.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Évora e à Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo pela colaboração neste projeto; à Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica pelo empréstimo do coletor; à empresa Thermo Fisher Scientific que gentilmente cedeu os testes moleculares de diagnóstico. Um agradecimento especial ao Professor Rui Brandão que projetou e creditou o projeto desde o início.

## Referências bibliográficas

- Oliveira M, Ribeiro H, Delgado JL, Abreu I. The effects of meteorological factors on airborne fungal spore concentration in two areas differing in urbanisation level. *Int J Biometeorol*. 2009;53(1):61-73.
- de Linares C, Belmonte J, Canela M, Díaz-de-la-Guardia C, Alba-Sanchez F, Sabariego S, et al. Dispersal patterns of *Alternaria* conidia in Spain. *Agric For Meteorol*. 2010;150(12):1491-500.
- Rodríguez-Rajo FJ, Iglesias I, Jato V. Variation assessment of airborne *Alternaria* and *Cladosporium* spores at different bioclimatical conditions. *Mycol Res*. 2005;109(Pt 4):497-507.
- Grinn-Gofroñ A, Bosiaccka B. Effects of meteorological factors on the composition of selected fungal spores in the air. *Aerobiologia (Bologna)*. 2015;31(1):63-72.
- Sabariego S, Bouso V, Pérez-Badia R. Comparative study of airborne *Alternaria* conidia levels in two cities in Castilla-La-Mancha (central Spain), and correlations with weather-related variables. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(2):227-32.
- Ianovici N, Maria C, Radutoiu MN, Hanis A, Tudorica D. Variation in airborne fungal spore concentrations in four different microclimate regions in Romania. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*. 2013;41(2):450-7.
- Pantoja LD, Couto MS, Paixão GC. Diversidade de bioaerossóis presentes em ambientes urbanizados e preservados de um campus universitário [Diversity of the bioaerosols present in urbanized environment and preserves of a university campus]. *Biológico*. 2007;69(1):41-7. Portuguese
- Nunes C, Câmara I, Ferreira MB, Almeida M, Gaspar Â, Loureiro C, et al. Fungos na atmosfera de Portugal. *Rev Port Imunoalergol*. 2008;16(4):377-94.
- Aira MJ, Rodríguez-Rajo FJ, Fernández-González M, Seijo C, Elvira-Rendueles B, Abreu I, et al. Spatial and temporal distribution of *Alternaria* spores in the Iberian Peninsula atmosphere, and meteorological relationships: 1993-2009. *Int J Biometeorol*. 2013;57(2):265-74.
- Oliveira M, Ribeiro H, Abreu I. Annual variation of fungal spores in a atmosphere of Porto: 2003. *Ann Agric Environ Med*. 2005;12(2):309-15.
- Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, et al. GA<sup>2</sup>LEN skin test study I: GA<sup>2</sup>LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy*. 2009;64(10):1498-506.
- Caeiro E, Brandão R, Carmo S, Lopes L, Almeida MM, Gaspar Â, et al. Rede Portuguesa da Aerobiologia: resultados da monitorização do pólen atmosférico (2002-2006) [The Portuguese Aerobiology Network: airborne pollen results (2002-2006)]. *Rev Port Imunoalergol*. 2007;15(3):235-50.
- Rede portuguesa de aerobiologia [homepage]. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica; 2007-2018. Available from: [www.rpaerobiologia.com](http://www.rpaerobiologia.com)
- Thermo Fisher Scientific [homepage]. Uppsala: Thermo Scientific; 2016. Available from: [www.phadia.com](http://www.phadia.com)
- Pavão CS. Diagnóstico das alergias: o papel do laboratório de análises clínicas [Dissertation]. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2015.

16. Sabariego S, Díez A, Gutiérrez M. Monitoring of airborne fungi in Madrid (Spain). *Acta Bot Croat.* 2007;66(2):117-26.
17. Abu-Dieyeh M, Barham R, Abu-Elteen K, Al-Rashidi R, Shaheen I. Seasonal variation of fungal spore populations in the atmosphere of Zarqa area, Jordan. *Aerobiologia.* 2010;26(4):263-76.
18. Cosentino S, Fadda ME, Plamas F. Pollen and mould allergy in Southern Sardinia (Italy): comparison of skin-test frequencies and air sampling data. *Grana.* 1995;34(5):338-44.
19. Rizzi-Longo L, Pizzulin-Sauli M, Ganis P. Seasonal occurrence of *Alternaria* (1993-2004) and *Epicoccum* (1994-2004) spores in Trieste (NE Italy). *Ann Agric Environ Med.* 2009;16(1):63-70.
20. Pereira C, Valero A, Loureiro C, Dávila I, Martínez-Cócera C, Murio C, et al. Iberian study of aeroallergens sensitization in allergic rhinitis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2006;38(6):186-94.
21. Kim BS, Jin HS, Kim HB, Lee SY, Kim JH, Kwon JW, et al. Airway hyperresponsiveness is associated with total serum immunoglobulin E and sensitization to aeroallergens in Korean adolescents. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(12):1220-7.
22. Bousquet PJ, Burbach G, Heinzerling LM, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, et al. GA2LEN skin test study III: minimum battery of test inhalent allergens needed in epidemiological studies in patients. *Allergy.* 2009;64(11):1656-62.
23. Burbach GJ, Heinzerling LM, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, et al. GA(2)LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. *Allergy.* 2009;64(10):1507-15.
24. Oliveira M, Abreu I, Ribeiro H, Delgado L. Esporos fúngicos na atmosfera da cidade do Porto e suas implicações alérgicas [Fungal spores in the atmosphere in the city of Oporto and its allergological implications]. *Rev Port Imunoalergol.* 2007;15(1):61-85. Portuguese
25. Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J, Martín-Martín R, Fernández-Caldas E, Galindo PA, et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(3):154-9.
26. Simon-Nobbe B1, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;145(1):58-86.
27. Santos A, Carrapatoso I, Rodrigues F, Galdes L, Loureiro C, Chieira C. Padrão clínico e laboratorial de sensibilização a fungos [Clinical and laboratory profile of sensitisation to moulds]. *Rev Port Imunoalergol.* 2009;17(3):225-41. Portuguese
28. Damialis A, Halley JM, Gioulekas D, Vokou D. Long-term trends in atmospheric pollen levels in the city of Thessaloniki, Greece. *Atmos Environ.* 2007;41(33):7011-21.
29. Prester L, Macan J. Determination of Alt a 1 (*Alternaria Alternata*) in poultry farms and a sawmill using ELISA. *Med Mycol.* 2010;48(2):298-302.

#### Conflito de interesses

Os autores declaram não ter quaisquer conflitos de interesse.

#### Fontes de financiamento

Este trabalho de investigação não recebeu qualquer financiamento.

Artigo recebido em 12.10.2017 e aprovado em 07.03.2018.