

# Esporos fúngicos na atmosfera da cidade do Porto e suas implicações alergológicas

*Fungal spores in the atmosphere in the city of Oporto and its allergological implications*

Rev Port Imunoalergologia 2007; 15 (1): 61-85

Manuela Oliveira<sup>1,2</sup>, Ilda Abreu<sup>1,2</sup>, Helena Ribeiro<sup>1</sup>, Luís Delgado<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 1911, 4150-181 Porto, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Biologia Molecular e Celular, Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugal; e-mail: inoronha@ibmc.up.pt

<sup>3</sup> Serviço e Laboratório de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Alameda Professor Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto

## RESUMO

**Introdução:** Os esporos fúngicos constituem uma fracção significativa das biopartículas atmosféricas, sendo encontrados em concentrações várias vezes superiores às dos grãos de pólen, actuando como potenciais alergénios em indivíduos atópicos. Os aeroalergénios fúngicos mais frequentes pertencem aos géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (estes géneros reunidos na família *Aspergillaceae*) sendo capazes de estimular a produção de IgE específica e, em indivíduos sensibilizados, podem agravar os sintomas clínicos de doenças respiratórias. **Objectivo:** Este trabalho pretende avaliar a distribuição dos esporos de fungos potencialmente alergizantes no Porto e caracterizar não só a sua prevalência na atmosfera como também estudar a influência dos factores meteorológicos. **Material e métodos:** A distribuição sazonal da concentração de esporos fúngicos, na cidade do Porto, foi observada continuamente, entre 1 de Janeiro de 2003 e 31 de Dezembro de 2004, usando um captador volumétrico tipo Hirst. **Resultados:** No ano de 2003, a concentração total de esporos presentes na atmosfera flutuou entre 2 e 2198 esporos/m<sup>3</sup>, com uma média diária de 403 esporos/m<sup>3</sup>. No ano de 2004, os mesmos valores oscilaram entre 2 e 2299 esporos/m<sup>3</sup>, com uma média diária de 412 esporos/m<sup>3</sup>. Durante os dois anos de estudo, as concentrações mais elevadas de esporos na atmosfera foram observadas durante os meses de Verão e Outono, enquanto as concentrações mais baixas foram registadas nos meses de Inverno em 2003 e Inverno e início da Primavera em 2004. Entre os 42 tipos de esporos

fúngicos identificados na atmosfera do Porto, foram encontrados tipos com características alergizantes, como por exemplo: *Cladosporium* (71%), o esporo mais frequente, seguido por *Ganoderma* (14%), *Aspergillaceae* (3%) e *Alternaria* (1%). No entanto, verificámos que os esporos fúngicos apresentaram comportamentos diferentes. Assim, alguns esporos foram encontrados, em concentrações variáveis, ao longo de todo o ano (exemplos: *Alternaria*, *Aspergillaceae*, *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Ganoderna*), enquanto outros esporos apresentaram comportamento esporádico, surgindo em baixas concentrações (exemplos: *Corynespora*, *Didymella*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Pleospora*, *Rhizopus*, *Torula* e *Ustilago*). A maioria dos esporos fúngicos encontra-se correlacionada positivamente com a temperatura, não se correlacionando com os outros factores analisados, como a humidade relativa, a precipitação e a velocidade do vento. **Conclusão:** Estes estudos revestem-se de interesse no campo alergológico, uma vez que a monitorização dos esporos fúngicos presentes na atmosfera permitirá, a médio prazo, a elaboração de calendários da ocorrência destes esporos, possibilitando aos clínicos uma melhor interpretação de agudizações respiratórias em doentes alérgicos sensibilizados.

**Palavras-chave:** Aeromicologia, alergia a fungos, esporos fúngicos, atmosfera exterior, Porto.

## ABSTRACT

**Introduction:** Fungal spores are a significant fraction of atmospheric bioparticles, being found in concentrations several times higher than pollen grains. These fungal particles may act as potential allergens in atopic individuals. The most frequent fungal aero-allergens belong to the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* and *Penicillium* (gathered under the family *Aspergillaceae*) and, in sensitized individuals, they can worsen the clinical symptoms of respiratory diseases. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the distribution of potentially allergenic spores in the city of Oporto, characterizing its prevalence in the outdoor atmosphere and studying the influence of the meteorological factors. **Material and methods:** The seasonal distribution of the concentration of fungal spores, in the city of Oporto, was continually studied from January 1, 2003 to December 31, 2004, using a volumetric Hirst-type spore sampler. **Results:** In the year of 2003, the total concentration of spores fluctuated between 2 and 2198 spores/m<sup>3</sup>, with a daily average of 403 spores/m<sup>3</sup>. In the following year, these values were from 2 and 2299 spores/m<sup>3</sup>, with a daily average of 412 spores/m<sup>3</sup>. During the two years, the highest spore concentrations were observed during the summer and autumn months, while the lowest values registered during the winter and early spring months. Among the 42 identified spore types, several presented allergenic characteristics, as for instance: *Cladosporium* (71%), *Ganoderma* (14%), *Aspergillaceae* (3%) and *Alternaria* (1%). These fungal spores presented different behaviours. Some were found along the whole year, in variable concentrations (examples: *Alternaria*, *Aspergillaceae*, *Cladosporium*, *Epicoccum* and *Ganoderna*) while other had a sporadic prevalence, appearing in low concentrations (examples: *Corynespora*, *Didymella*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Pleospora*, *Rhizopus*, *Torula* and *Ustilago*). The majority of these fungal spores were found to be positively correlated with the temperature while no influence was observed from the remaining meteorological factors (relative humidity, precipitation and wind speed). **Conclusion:** These studies may have impact in allergy management, as monitoring of atmospheric fungal spores and the future elaboration of fungal spore's calendars will allow doctors to make a better interpretation of respiratory exacerbations in sensitized patients.

**Key-words:** Aeromicology, mould allergy, fungal spores, outdoor environment, Oporto.

## INTRODUÇÃO

**A** atmosfera é constituída por gases, gotículas de água e uma grande diversidade de partículas orgânicas e inorgânicas. Entre as partículas de origem biológica contam-se fragmentos de insectos, animais e plantas, grãos de pólen de plantas superiores, esporos de Pteridófitas, hifas e esporos fúngicos, leveduras, bactérias e vírus<sup>1</sup>. Os esporos fúngicos constituem uma fracção significativa das biopartículas presentes na atmosfera, sendo habitual encontrar concentrações de 1000 esporos/m<sup>3</sup>, ou seja, concentrações que ascendem várias vezes às de outras partículas, como de grãos de pólen<sup>2</sup>. Apesar destes dois tipos de partículas biológicas apresentarem especificidades individuais e poder alergizante não comparável, os esporos fúngicos são frequentemente considerados como potenciais alergénios para indivíduos atópicos.

Calcula-se actualmente que, nos países industrializados, pelo menos 20% da população esteja sensibilizada a抗ígenos ambientais, produzindo anticorpos da classe IgE para material proteico comum no ar ambiente, quer interior quer exterior. Entre esses抗ígenos contam-se os de origem fúngica, sendo as suas principais manifestações clínicas a asma, a rinite, a polipose nasal, as micoses broncopulmonares e a pneumonite de hipersensibilidade<sup>3,4</sup>.

Os estudos de aerobiologia possibilitam determinar a concentração de esporos fúngicos presentes na atmosfera<sup>5</sup>. Tais estudos têm sido desenvolvidos em diferentes países<sup>5-17</sup>.

A variedade dos fungos presente na atmosfera depende, fundamentalmente, de factores meteorológicos e/ou de outros aspectos, como a topografia e o tipo de vegetação existente<sup>6-8,11,16</sup>.

Os fungos presentes no ar ambiente ou os que colonizam a espécie humana podem causar reacções alérgicas. Os alergénios mais comuns pertencem à classe dos fungos impecfeitos (*Deuteromycetes*), nomeadamente, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras. Os抗ígenos fúngicos são capazes de estimular a produção de IgE específica, em indivíduos atópicos, isto é, com predisposição familiar

## INTRODUCTION

The atmosphere is made up of gases, water droplets and a wide variety of organic and inorganic particles. Among the particles of biological origin are fragments of insects, animals and plants, pollen grains from more evolved plants, spores from pteridophytes, hypha pteridophytes and fungal spores, yeasts, bacteria and viruses<sup>1</sup>. Fungal spores represent a significant fraction of atmospheric bioparticles, usually found in concentrations of 1000 spores/m<sup>3</sup>, levels that exceed those of other particles such as pollen grains<sup>2</sup>. Despite these two types of biological particles presenting specific individual characteristics and non-comparable allergenic power, fungal spores are frequently considered as being among potential allergens for atopic individuals. It is currently calculated that at least 20% of the population in industrialised countries are sensitized to environmental antigens, producing IgE antibodies for common proteinic material in the air, both indoors and outdoors. Among these antigens are those of fungal origin, which have their main clinical manifestations in asthma, rhinitis, nasal polyposis, bronchopulmonary mycosis and hypersensitivity pneumonitis<sup>3,4</sup>.

Aerobiology studies allow the calculation of fungal spore concentrations in the atmosphere<sup>5</sup>. This research has been developed in various countries<sup>5-17</sup>. The variety of fungi present in the atmosphere depends, fundamentally, on meteorological factors and/or other aspects such as topography and existing vegetation type<sup>6-8,11,16</sup>.

Either airborne fungi or those that colonise the human species can cause allergic reactions. The most common allergens belong to the class of imperfect fungi (*deuteromycetes*), particularly *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* and yeasts. The fungal antigens are capable of stimulating production of specific IgE in atopic individuals with a family predisposition

para a produção de IgE, o que, geralmente, desencadeia ou agrava os sintomas clínicos de doenças atópicas respiratórias, como a sinusite alérgica<sup>3</sup> ou a asma brônquica<sup>18</sup>. Os fungos podem, também, causar reacções alérgicas independentes de IgE, através da produção de IgG e deposição local de complexos antígeno-anticorpo, ou estimulando os mecanismos de hipersensibilidade de tipo celular<sup>19,20</sup>.

As doenças alérgicas têm vindo a aumentar nas áreas urbanas, em parte devido à presença de poluentes (PM, óxidos de enxofre, óxidos de azoto, monóxido de carbono, ozono, metais pesados, compostos orgânicos voláteis, etc.) associados às partículas biológicas e com efeito deletério nas vias respiratórias, aumentando a sensibilidade aos alergénios.

Apesar da sua relevância, os estudos de identificação de esporos fúngicos são raros no nosso país. O objectivo deste trabalho é apresentar os resultados da frequência e concentração dos esporos de fungos presentes na atmosfera da cidade do Porto durante dois anos (2003 e 2004). Neste estudo avaliou-se, também, a influência dos factores meteorológicos, e discute-se o seu potencial alergológico para a espécie humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem diária dos esporos fúngicos

A distribuição sazonal da concentração de esporos fúngicos, na área metropolitana do Porto, foi estudada, continuamente, entre 1 de Janeiro de 2003 e 31 de Dezembro de 2004. A amostragem foi feita utilizando um captador volumétrico tipo Hirst (LanzoniVPPS2000), situado no telhado do centro de informática da Universidade do Porto (20 metros acima do nível de solo), no centro urbano do Porto (41°11' N, 8°39' W) (Figura 1).

O captador, equipado com uma bomba de vácuo, faz uma aspiração de um fluxo de dez litros de ar por minuto, simulando a inalação humana. As partículas presentes na atmosfera, ficam retidas numa fita de Melinex®, previamente revestida por uma fina película de silicone. Estas fitas são substituídas semanalmente e, em laboratório, cortadas em tiras de 48 mm

on to production of IgE, which generally triggers or aggravates clinical symptoms of atopic respiratory illnesses, such as allergic sinusitis<sup>3</sup> and bronchial asthma<sup>18</sup>. Fungi can also cause IgE independent reactions through production of IgG and local deposition of antigen antibody complexes or stimulation of cellular type hypersensitivity mechanisms<sup>19,20</sup>.

Allergic illnesses have increased in urban areas, in part due to the presence of pollutants (PM, sulphur oxides, nitrate oxides, carbon monoxide, ozone, heavy metals, volatile organic compounds, etc) associated to biological particles, exerting a harmful effect on the respiratory tract, increasing sensitivity to allergens.

Despite their relevance, studies identifying fungal spores are rare in Portugal. This research aims to demonstrate the frequency and concentration of fungal spores present in the atmosphere of the city of Oporto over two years (2003 and 2004). This study also evaluated the influence of meteorological factors and discusses the allergological potential of fungal spores.

## METHODS

### Daily sample of fungal spores

The seasonal distribution of concentration of fungal spores in Greater Oporto was studied continuously from January 1, 2003 - 31 December, 2004. Air sampling was performed with a volumetric Hirst-type trap (Lanzoni VPPS2000) located on the roof of Oporto University's IT Centre (20 meters above ground level) in central Oporto (41°11' N, 8°39' W) (Figure 1).

The vacuum pump trap aspirated 10 litres of air per minute to simulate human inhalation. Atmospheric particles were captured on a Melinex® tape covered with a thin film of silicone. These strips were replaced weekly and, in the laboratory, cut into 48mm strips representing 24 hours of exposure, stained with



**Figura 1** – Localização do captador situado no Centro de Informática da Universidade do Porto (CIUP) e na estação meteorológica do Instituto Geofísico da Universidade do Porto (MS), na cidade do Porto (imagem aérea obtida através do programa GoogleEarth)

**Figure 1.** Location of the trap at the Oporto University IT Department (CIUP) and the meteorological station of the Oporto University Geophysical Institute (MS) in the city of Oporto. (aerial image obtained from Google Earth)

representando 24 horas de exposição, coradas com fucsina básica e montadas em lâminas de microscópio. A identificação e quantificação diária dos esporos fúngicos são determinadas recorrendo a um microscópio óptico (Figura 2).

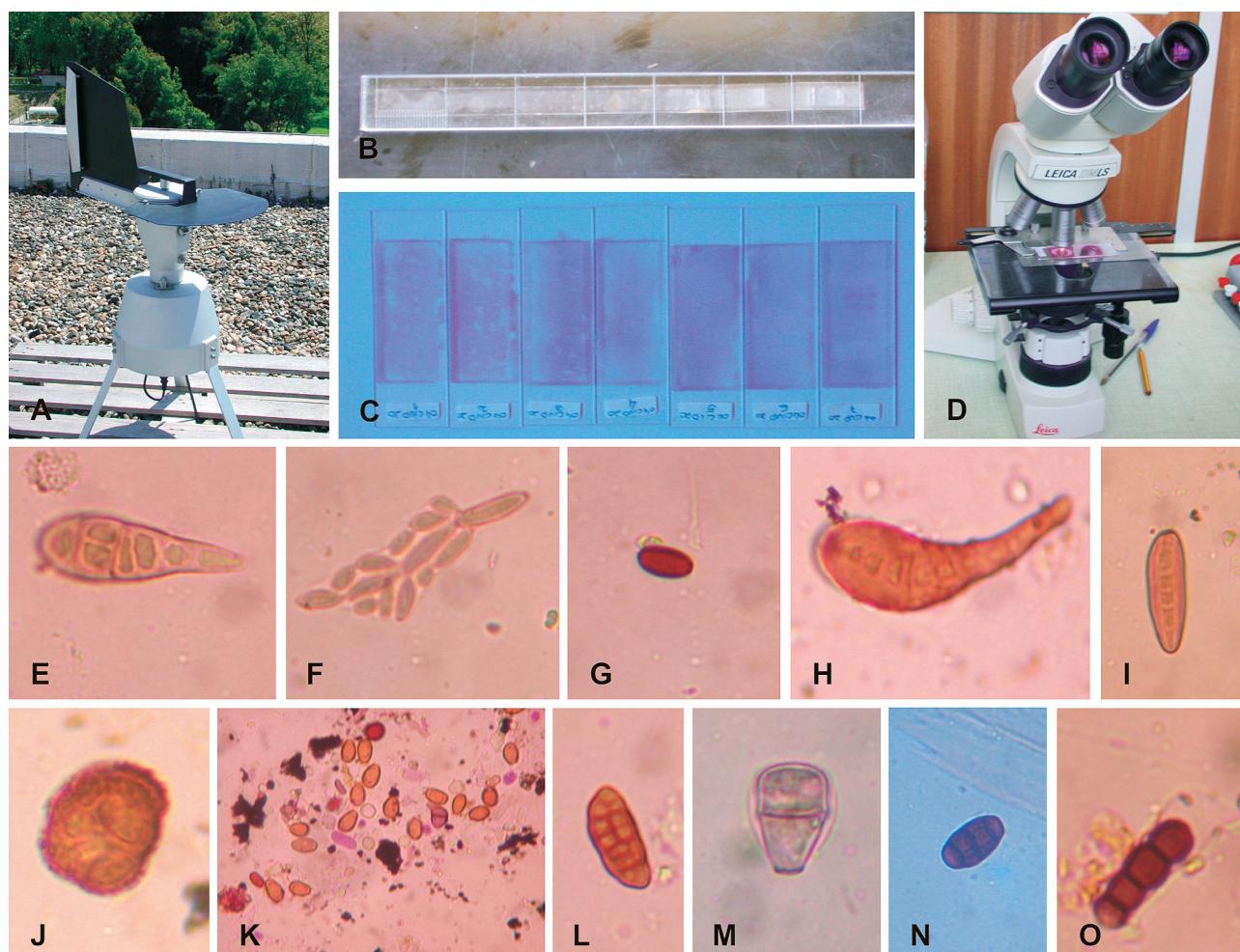
Os dados meteorológicos (temperatura, humidade relativa, precipitação e velocidade do vento) foram recolhidos pelo Instituto Geofísico da Universidade do Porto (Serra do Pilar – 41°08' N, 8°36' W) (Figura 3). Os dados relativos às contagens de esporos foram normalizados através de uma transformação logarítmica que possibilita minimizar erros relacionados com o método de amostragem.

Os resultados quantitativos obtidos são apresentados, de uma forma descritiva, correlacionando as variações ao longo

basic fuchsin and mounted on microscope slides. Identification and daily quantification of fungal spores were carried out with the use of an optical microscope (Fig. 2).

Meteorological data (temperature, relative humidity, precipitation and wind speed) were gathered by the Geophysical Institute of Oporto University (Serra do Pilar - 41°08' N, 8°36' W) (Fig. 3). Data relating to spore counts were normalized using logarithmic transformation that allowed minimization of errors related to the sampling method.

The results are presented in a descriptive form, correlating variations throughout the year in fungal spore

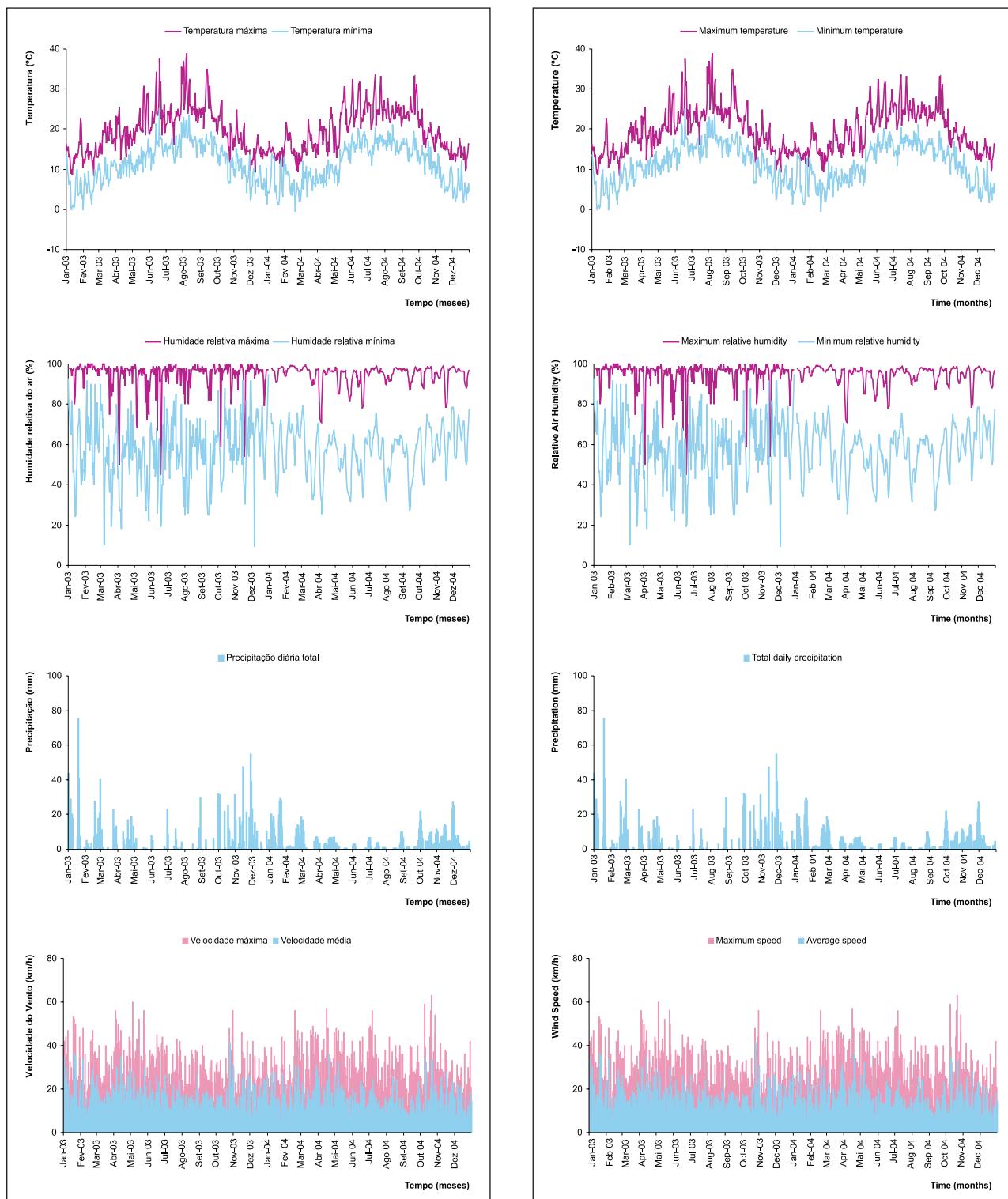


**Figura 2.** Amostragens dos esporos presentes na atmosfera do Porto (**A** – captador tipo Hirst, localizado no telhado do Centro de informática da Universidade do Porto; **B** – Fita de Melinex® após uma semana de exposição; **C** – Lâminas diárias; **D** –Microscópio óptico utilizado; **E** – *Alternaria*; **F** – *Cladosporium*; **G** – *Coprinus*; **H** – *Corynespora*; **I** – *Drechslera*; **J** – *Epicoccum*; **K** – *Ganoderma*; **L** – *Pleospora*; **M** – *Polythrinicum*; **N** – *Pithomyces*; **O** – *Torula*). A identificação dos esporos fúngicos foi efectuada com base nas suas características morfológicas (tamanho, forma e cor) em microscopia óptica.

**Figure 2.** Samples of airborne spores present in Porto (**A** – Hirst-type trap located on the roof of the CIUP IT Department, Porto; **B** – Melinex® strip after week of exposure ; **C** – Daily slides; **D** – Optical microscope used; **E** – *Alternaria*; **F** – *Cladosporium*; **G** – *Coprinus*; **H** – *Corynespora*; **I** – *Drechslera*; **J** – *Epicoccum*; **K** – *Ganoderma*; **L** – *Pleospora*; **M** – *Polythrinicum*; **N** – *Pithomyces*; **O** – *Torula*). Identification of fungal spores was made based on their morphological characteristics (size, shape and colour) observed by optical microscope.

do ano das concentrações de esporos fúngicos presentes na atmosfera com os dados meteorológicos (temperatura, humidade relativa, precipitação e velocidade do vento), através dos coeficientes de correlação de Pearson, com os níveis de significância de 1% e 5%. Este coeficiente foi utilizado para

concentrations in the atmosphere with meteorological data using the Pearson correlation coefficients, with levels of significance of 1% and 5%. This equation was used to verify the degree of association between the variables.



**Figura 3.** Variação das condições meteorológicas ao longo do período de estudo

**Figure 3.** Variations in meteorological conditions over the period of study

verificar o grau de associação existente entre as variáveis. A concentração diária de esporos fúngicos foi transformada logaritmicamente de modo a normalizar os dados obtidos.

## RESULTADOS

### Esporos fúngicos atmosféricos

Durante o período de estudo, foram identificados 42 tipos diferentes de esporos fúngicos presentes na atmosfera urbana, dos quais 21 apresentam características alergizantes (Quadro 1). *Cladosporium* foi o esporo mais frequente (67 a

## RESULTS

### Airborne fungal spores

Forty-two different types of fungal spores were identified in the urban atmosphere during the period of the study, of which 21 presented allergenic characteristics (Table 1). *Cladosporium* was the most frequent spore (67-75%), approximately seven times more abundant than *Ganoderma* (12-16%), the second most common (Figure 3). *Alternaria*, Aspergillaceae (including the types *Aspergillus* and *Penicillium*), *Botrytis*, *Coprinus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Ferrugens* and *Ustilago*

**Quadro 1.** Principais esporos fúngicos com impacto na saúde, presentes na atmosfera do Porto nos anos de 2003 e 2004

Eспорос fúngicos	Eспорос frequentes							
	Total (esporos/m <sup>3</sup> /dia)		Máximo (esporos/m <sup>3</sup> /dia)		Médias (esporos/m <sup>3</sup> /dia)		Valores máximos Datas	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
<i>Alternaria</i>	1114	784	49	31	3	2	9-Set	7-Out
<i>Aspergillaceae</i>	2485	2195	169	74	7	6	3-Set	11-Fev
<i>Botrytis</i>	1114	1839	34	46	3	5	15-Out	18-Ago
<i>Cladosporium</i>	63948	63005	1786	1438	175	172	9-Set	16-Ago
<i>Coprinus</i>	1218	1963	30	140	3	5	22-Abr	25-Ago
<i>Epicoccum</i>	503	334	27	10	1	1	4-Set	30-Jun
<i>Ganoderma</i>	10024	14939	386	719	27	41	16-Out	17-Set
<i>Ferrugens</i>	508	1539	16	38	1	4	12-Ago	5-Fev
Eспорос esporádicos								
<i>Corynespora</i>	46	113	7	7	0	0	22-Abr	27-Jun
<i>Didymella</i>	56	170	13	21	0	0	17-Dez	23-Jan
<i>Drechslera</i>	120	16	16	2	0	0	15-Out	17-Mai
<i>Fusarium</i>	868	323	174	38	2	1	25-Abr	3-Ago
<i>Leptosphaeria</i>	160	142	12	19	0	0	20-Dez	18-Jan
<i>Oidium</i>	13	8	2	2	0	0	1-Abr	30-Jun
<i>Periconia</i>	12	179	4	12	0	0	18-Abr	2-Jul
<i>Pithomyces</i>	167	78	14	6	0	0	8-Ago	6-Jul
<i>Pleospora</i>	294	331	12	17	1	1	9-Set	12-Mar
<i>Polythrincium</i>	68	45	8	4	0	0	28-Out	24-Mar
<i>Rhizopus</i>	151	139	10	7	0	0	3-Ago	24-Ago
<i>Torula</i>	75	352	5	12	0	1	5-Mai	23-Fev
<i>Ustilago</i>	2172	337	123	9	6	0	22-Jan	2-Jul
<b>Total</b>	149260	151973	2198	2298	402	416	18-Out	24-Ago

75%), sendo aproximadamente sete vezes mais abundante do que *Ganoderma* (12 a 16%), o segundo esporo mais frequente (Figura 4). Os esporos de *Alternaria*, *Aspergillaceae* (incluindo os géneros *Aspergillus* e *Penicillium*), *Botrytis*, *Coprinus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Ferrugens* e *Ustilago* representam cerca de 10% do total de esporos presentes na atmosfera.

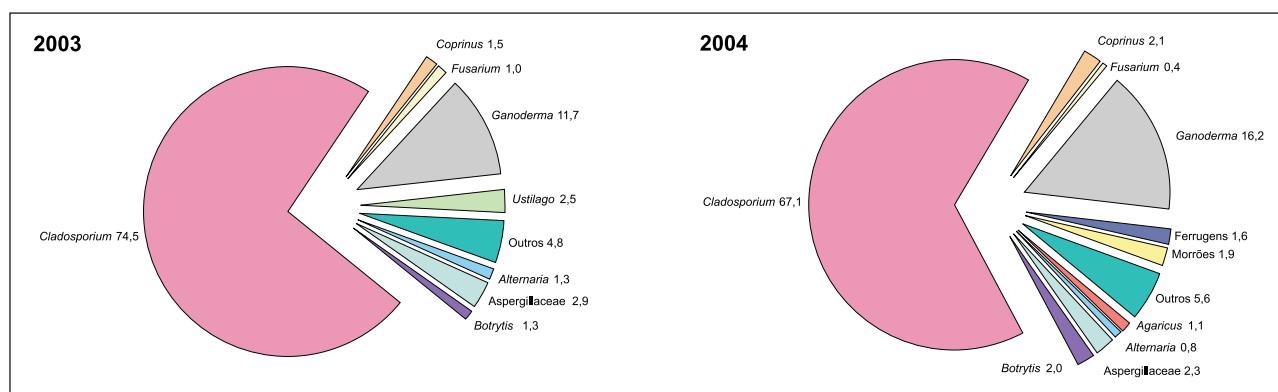
Nos anos em que decorreu este estudo (2003 e 2004), registaram-se dois padrões distintos de dispersão dos diferentes tipos de esporos fúngicos: i) esporos presentes na atmosfera de forma contínua durante todo o ano – *Alternaria*, *Aspergillaceae*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Epicoccum*, *Ganoderna* e *Ferrugens*; ii) esporos com comportamento

go represented about 10% of the total spores present in the atmosphere.

During the period in which this study was carried out (2003 and 2004) two distinct dispersal patterns of different fungal spore types were registered: i) spores present continuously in the atmosphere during the whole year – *Alternaria*, *Aspergillaceae*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Epicoccum*, *Ganoderna* and *Ferrugens* –; ii) spores present sporadically for one to 13 consecutive days and usually occurring in low concentrations (1-50 spores/m<sup>3</sup> of air) – *Corynespora*, *Didymella*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Oidium*, *Periconia*,

**Table I.** Main airborne fungal spores with health impact present in Porto in 2003 and 2004

Fungal spores	Frequent spores							
	Total (spores/m <sup>3</sup> /day)		Maximum (spores/m <sup>3</sup> /day)		Average (spores/m <sup>3</sup> /day)		Date of maximum values	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
<i>Alternaria</i>	1114	784	49	31	3	2	9-Sep	7-Oct
<i>Aspergillaceae</i>	2485	2195	169	74	7	6	3-Sep	11-Feb
<i>Botrytis</i>	1114	1839	34	46	3	5	15-Oct	18-Aug
<i>Cladosporium</i>	63948	63005	1786	1438	175	172	9-Sep	16-Aug
<i>Coprinus</i>	1218	1963	30	140	3	5	22-Apr	25-Aug
<i>Epicoccum</i>	503	334	27	10	1	1	4-Sep	30-Jun
<i>Ganoderna</i>	10024	14939	386	719	27	41	16-Oct	17-Sep
<i>Ferrugens</i>	508	1539	16	38	1	4	12-Aug	5-Feb
Sporadic spores								
<i>Corynespora</i>	46	113	7	7	0	0	22-Apr	27-Jun
<i>Didymella</i>	56	170	13	21	0	0	17-Dec	23-Jan
<i>Drechslera</i>	120	16	16	2	0	0	15-Oct	17-Mai
<i>Fusarium</i>	868	323	174	38	2	1	25-Apr	3-Aug
<i>Leptosphaeria</i>	160	142	12	19	0	0	20-Dec	18-Jan
<i>Oidium</i>	13	8	2	2	0	0	1-Apr	30-Jun
<i>Periconia</i>	12	179	4	12	0	0	18-Apr	2-Jul
<i>Pithomyces</i>	167	78	14	6	0	0	8-Aug	6-Jul
<i>Pleospora</i>	294	331	12	17	1	1	9-Sep	12-Mar
<i>Polythrincium</i>	68	45	8	4	0	0	28-Oct	24-Mar
<i>Rhizopus</i>	151	139	10	7	0	0	3-Aug	24-Aug
<i>Torula</i>	75	352	5	12	0	1	5-May	23-Feb
<i>Ustilago</i>	2172	337	123	9	6	0	22-Jan	2-Jul
<b>Total</b>	149260	151973	2198	2298	402	416	18-Oct	24-Aug



**Figura 4.** Principais esporos fúngicos presentes na atmosfera do Porto (A. valores observados em 2003; B. valores observados em 2004)

**Figure 4.** Main airborne fungal spores present in Porto (A. levels observed in 2003; B. levels observed in 2004)

esporádico presentes durante 1 a 13 dias consecutivos e ocorrendo, usualmente, em baixas concentrações (1-50 esporos/m<sup>3</sup> de ar) – *Corynespora*, *Didymella*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Oidium*, *Periconia*, *Pithomyces*, *Pleospora*, *Polythrinicum*, *Rhizopus*, *Torula* e *Ustilago*.

#### Variação sazonal

No ano de 2003, a concentração total de esporos presentes no ar flutuou entre 2 e 2198 esporos/m<sup>3</sup>, sendo a média diária de 403 esporos/m<sup>3</sup>. No ano de 2004, a concentração total de esporos variou entre dois e 2299 esporos/m<sup>3</sup>, sendo a média diária de 412 esporos/m<sup>3</sup>.

As concentrações mais elevadas de esporos na atmosfera do Porto foram observadas durante o Verão e o Outono e as mais baixas registadas durante o Inverno e o início da Primavera (Figura 5).

Os diversos esporos fúngicos apresentaram comportamentos diferentes. O *Cladosporium* foi encontrado em concentrações elevadas ao longo de todo o ano, atingindo valores máximos no Verão (1786 esporos/m<sup>3</sup> a 9 de Setembro de 2003 e 1438 esporos/m<sup>3</sup> a 16 de Agosto de 2004).

No entanto, outros esporos apresentaram um único pico anual. Assim, as concentrações máximas de esporos de *Corynespora*, *Fusarium*, *Oidium* e *Periconia* foram encon-

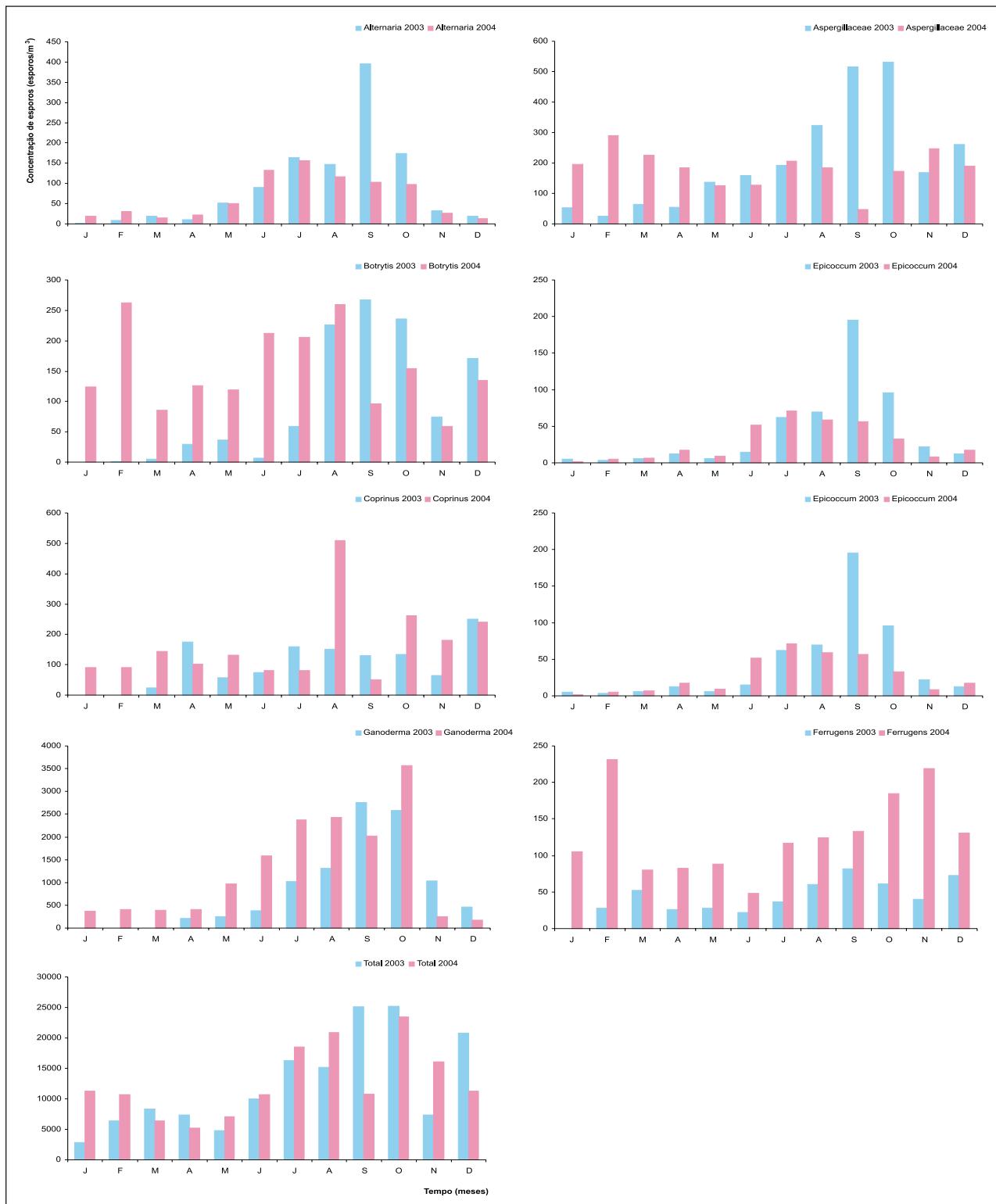
*Pithomyces*, *Pleospora*, *Polythrinicum*, *Rhizopus*, *Torula* and *Ustilago*.

#### Seasonal variation

The total concentration of airborne spores during 2003 varied between 2 and 2198 spores/m<sup>3</sup>, with a daily average of 403 spores/m<sup>3</sup>. In 2004, the total concentration of spores fluctuated between 2 and 2299 spores/m<sup>3</sup>, with a daily average of 412 spores/m<sup>3</sup>. The highest concentrations of airborne spores in Oporto occurred during Summer and Autumn and the lowest during Winter and early Spring (Figure 5).

The various fungal spores presented different behaviour. *Cladosporium* was found in high concentrations throughout the whole year, reaching maximum levels in Summer (1786 spores /m<sup>3</sup> on September 9, 2003 and 1438 spores /m<sup>3</sup> on August 16, 2004).

However, other spores had a single yearly peak. Thus, maximum concentrations of the spores of *Corynespora*, *Fusarium*, *Oidium* and *Periconia* were found at the end of Spring and beginning of Summer (for example *Fusarium* reached maximum annual levels in April 2003 and August 2004). The spores of *Epicoccum*, *Pithomyces*, *Rhizopus*, *Aspergillaceae* and *Ferrugens*



**Figura 5.** Distribuição mensal dos diferentes tipos de esporos fúngicos mais frequentes na atmosfera, ao longo do período de estudo

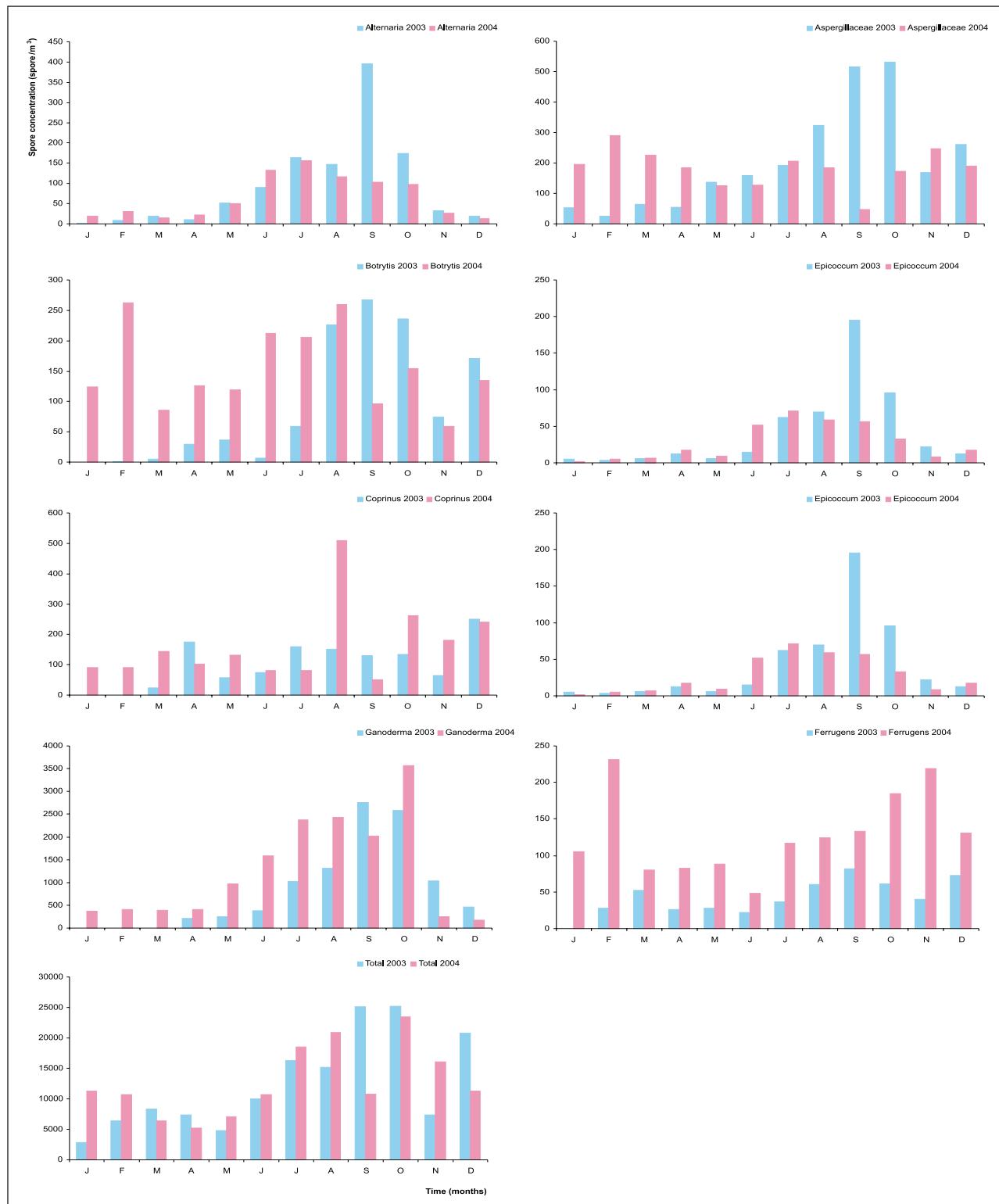


Figure 5. Monthly distribution of different types of most common airborne fungal spores during the period of the study

tradas no final da Primavera e início do Verão (por exemplo, *Fusarium* atingiu os valores máximos anuais em Abril de 2003 e em Agosto de 2004). Os esporos de *Epicoccum*, *Pithomyces*, *Rhizopus*, *Aspergillaceae* e *Ferrugens* atingem os valores máximos anuais durante o Verão. Enquanto que os três primeiros tipos têm picos coincidentes na mesma estação do ano, no período em estudo (por exemplo, *Rhizopus* nos dias 3 de Agosto de 2003 e 24 de Agosto de 2004), no caso dos *Aspergillaceae* e *Ferrugens* ambos tiveram um pico esporádico em Fevereiro de 2004.

Durante o fim do Verão e o início do Outono registaram-se os valores máximos dos esporos de *Alternaria* e *Ganoderma*, de uma forma coincidente nos dois anos: *Alternaria*, a 9 de Setembro de 2003, atingiu o valor máximo de 49 esporos/m<sup>3</sup> e, no ano seguinte, o pico foi de 31 esporos/m<sup>3</sup> a 7 de Outubro; *Ganoderma*, 386 esporos/m<sup>3</sup> a 16 de Outubro de 2003 e de 719 esporos/m<sup>3</sup> no dia 17 de Setembro de 2004. Finalmente, os esporos de *Pleospora* predominaram durante o Outono, enquanto *Torula* e *Ustilago* estiveram maioritariamente presentes durante o Inverno (Quadro I).

Algumas espécies apresentaram dois máximos, de valores semelhantes, durante o ano. Assim, no ano de 2003, os máximos de *Polyhthrinicum* foram encontrados na Primavera, desaparecendo no Verão e voltando a apresentar valores elevados no Outono; os máximos de *Coprinus* foram observados durante a Primavera e novamente no Verão. Num quarto tipo de esporos, como *Dydimella*, *Drechslera* e *Leptosphaeria*, as concentrações flutuaram esporadicamente durante todo o ano.

### Correlação com os factores meteorológicos

Como se observou uma diferença de ocorrência entre fungos presentes ao longo do ano e fungos de presença esporádica, a análise de correlação entre os factores meteorológicos e as concentrações de esporos foi efectuada de dois modos distintos. Assim, nos fungos presentes ao longo do ano, estabeleceram-se correlações entre a concentração diária destas biopartículas e os factores meteorológicos. Nos fungos de ocorrência esporádica, procedeu-se à análise dos

pores hit their highest levels during Summer. While the three first types had peaks coinciding with the same season of the year during the period of study (for example *Rhizopus* on August 3, 2003 and August 24, 2004), both *Aspergillaceae* and *Ferrugens* spores had a sporadic peak in February 2004.

During Summer and early Autumn, maximum levels of the *Alternaria* and *Ganoderma* spores were recorded similarly both years running. *Alternaria* reached a maximum level of 49 spores /m<sup>3</sup> on September 9, 2003 and in the following year the peak was 31 spores/m<sup>3</sup> on October 7. *Ganoderma* had 386 spores/m<sup>3</sup> on October 16, 2003 and 719 spores/m<sup>3</sup> on September 17, 2004. Finally, the spores of *Pleospora* were predominant during Autumn, while *Torula* and *Ustilago* were mainly present in Winter (Table I).

Some species presented two maximum levels, of similar values, during the year. Thus in 2003, *Polyhthrinicum* was found in Spring, disappearing in Summer and returning with high levels in Autumn; maximum *Coprinus* levels were observed in Spring and again in Summer. In a fourth spore type, such as *Dydimella*, *Drechslera* and *Leptosphaeria*, airborne concentrations fluctuated sporadically throughout the year.

### Correlation with meteorological factors

As variation was observed in occurrence between fungi present all year and those appearing sporadically, analysis of correlation between meteorological factors and spore concentrations was undertaken in two distinct ways. Thus, in the year-long present fungi, correlations were established between daily concentrations and meteorological factors. In sporadically occurring fungi, evaluation of meteorological factors was carried out daily and on an average of three days prior to verify if the influence of weather conditions in preceding days was important to the development and liberation of those spore types.

During the two years of study, positive correlations were observed between average temperature and daily

factores meteorológicos diários e à média dos três dias anteriores, a fim de verificar se a influência das condições meteorológicas dos dias anteriores seria importante para o desenvolvimento e libertação destes tipos.

Nos dois anos em estudo, verificou-se a existência de correlações positivas entre a temperatura média e as concentrações diárias dos esporos de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Ganoderma* (Quadro 2). Relativamente aos outros factores meteorológicos estudados, como a humidade relativa média e a precipitação, observou-se uma influência negativa destes na concentração dos esporos; no entanto, os valores do coeficiente

concentrations of the spores *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* and *Ganoderma* (Table 2). In relation to other meteorological variables, such as average relative humidity and precipitation, a negative influence of these factors was observed on spore counts, however, the correlation coefficient values are mainly insignificant, or of very low values (between  $r=-0.12$  and  $r=-0.38$ ). The wind speed parameter was found to have no significant relation to spore distribution and, when significant correlation existed, was not consistent over the two years of the study.

**Quadro 2.** Correlações observadas entre a concentração total de esporos presentes ao longo de todo o ano na atmosfera do Porto e os principais factores meteorológicos, nos anos de 2003 e 2004. As correlações significativas estão representadas a negrito e as assinaladas com \* a um coeficiente significativo a 1%.

	Temperatura do ar		Humidade relativa		Precipitação		Velocidade do vento	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
<i>Alternaria</i>	<b>0,685*</b>	<b>0,307*</b>	<b>-0,272*</b>	-0,098	<b>-0,380*</b>	<b>-0,130</b>	<b>-0,173*</b>	-0,044
<i>Aspergillaceae</i>	0,047	<b>-0,129</b>	-0,091	0,052	-0,044	0,004	-0,023	0,019
<i>Botrytis</i>	<b>0,239*</b>	0,018	-0,015	<b>-0,143*</b>	-0,041	-0,075	<b>-0,166*</b>	0,085
<i>Cladosporium</i>	<b>0,692*</b>	<b>0,171*</b>	<b>-0,236*</b>	-0,097	<b>-0,297*</b>	<b>-0,120</b>	<b>-0,176*</b>	-0,005
<i>Coprinus</i>	<b>0,248*</b>	<b>-0,124</b>	-0,034	0,017	<b>-0,193*</b>	-0,016	<b>-0,222*</b>	-0,026
<i>Epicoccum</i>	<b>0,486*</b>	<b>0,355*</b>	<b>-0,156*</b>	<b>-0,127</b>	<b>-0,237*</b>	<b>-0,172*</b>	<b>-0,187*</b>	-0,021
<i>Ganoderma</i>	<b>0,567*</b>	<b>0,348*</b>	-0,034	0,008	-0,219*	-0,098	<b>-0,310*</b>	<b>-0,121</b>
<i>Ferrugens</i>	0,125	<b>-0,132*</b>	-0,019	-0,056	-0,045	0,041	-0,055*	0,035
<b>Total</b>	<b>0,354*</b>	0,048	0,045	0,048	-0,034	0,006	<b>-0,163*</b>	-0,084

**Table 2.** Correlations observed between the total concentration of airborne spores throughout the year in Porto and the main meteorological factors in 2003 and 2004. Significant correlations are indicated in bold and a significant coefficient of 1% marked with \*.

	Air temperature		Relative humidity		Precipitation		Wind speed	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
<i>Alternaria</i>	<b>0,685*</b>	<b>0,307*</b>	<b>-0,272*</b>	-0,098	<b>-0,380*</b>	<b>-0,130</b>	<b>-0,173*</b>	-0,044
<i>Aspergillaceae</i>	0,047	<b>-0,129</b>	-0,091	0,052	-0,044	0,004	-0,023	0,019
<i>Botrytis</i>	<b>0,239*</b>	0,018	-0,015	<b>-0,143*</b>	-0,041	-0,075	<b>-0,166*</b>	0,085
<i>Cladosporium</i>	<b>0,692*</b>	<b>0,171*</b>	<b>-0,236*</b>	-0,097	<b>-0,297*</b>	<b>-0,120</b>	<b>-0,176*</b>	-0,005
<i>Coprinus</i>	<b>0,248*</b>	<b>-0,124</b>	-0,034	0,017	<b>-0,193*</b>	-0,016	<b>-0,222*</b>	-0,026
<i>Epicoccum</i>	<b>0,486*</b>	<b>0,355*</b>	<b>-0,156*</b>	<b>-0,127</b>	<b>-0,237*</b>	<b>-0,172*</b>	<b>-0,187*</b>	-0,021
<i>Ganoderma</i>	<b>0,567*</b>	<b>0,348*</b>	-0,034	0,008	-0,219*	-0,098	<b>-0,310*</b>	<b>-0,121</b>
<i>Ferrugens</i>	0,125	<b>-0,132*</b>	-0,019	-0,056	-0,045	0,041	-0,055*	0,035
<b>Total</b>	<b>0,354*</b>	0,048	0,045	0,048	-0,034	0,006	<b>-0,163*</b>	-0,084

de correlação são, maioritariamente, não significativos ou apresentam valores muito baixos (entre  $r=-0,12$  e  $r=-0,38$ ). Quando se estabeleceram correlações com a velocidade do vento, verificou-se que este parâmetro não se correlaciona com a distribuição dos esporos e, quando existem correlações significativas, não são consistentes nos dois anos em estudo.

Observou-se a inexistência de correlações consistentes entre os esporos fúngicos de ocorrência esporádica e os factores meteorológicos dos três dias anteriores à amostragem (Quadro 3). O mesmo se verificou quando se efectuaram as correlações entre a concentração destes esporos e os dados meteorológicos do mesmo dia e do dia anterior (dados omitidos).

## DISCUSSÃO

A identificação e quantificação dos grãos de pólen presentes na atmosfera na cidade do Porto tem sido desenvolvida pelo nosso grupo de trabalho desde Novembro de 2002<sup>21,22</sup>. Mais recentemente, e devido ao crescente interesse pela relevância dos esporos fúngicos em epidemi-

No correlations were observed between sporadically occurring fungal spores and meteorological data in the three days prior to the sample (Table 3). The same applied to correlations between concentrations of these spores and meteorological data on the same day and the preceding day (data omitted).

## DISCUSSION

Identification and quantification of airborne pollen grains in the city of Oporto was undertaken by our working group from November 2002<sup>21,22</sup>. More recently, and owing to increasing interest in the relevance of fungal spores in epidemiology, we have carried out studies on the characterisation of these bioparticles.

More than 40 different types of fungal spores were identified during this study, based on their morphological characteristics under microscope examination, from airborne samples derived from a Hirst-type volumetric trap. The most frequently used methods to identify airborne fungal spores are culture and visual identifi-

**Quadro 3.** Correlações observadas entre a concentração total de esporos esporádicos presentes na atmosfera do Porto e os principais factores meteorológicos dos três dias anteriores à ocorrência dos esporos, nos anos de 2003 e 2004. As correlações significativas estão representadas a negrito e as assinaladas com \* a um coeficiente significativo a 1%.

	Temperatura do ar		Humidade relativa		Precipitação		Velocidade do vento	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
<i>Corynespora</i>	0,133	0,207	-0,201	<b>-0,311</b>	-0,127	-0,176	0,234	-0,155
<i>Didymella</i>	<b>-0,412</b>	0,094	0,268	0,219	0,356	<b>0,318</b>	0,169	-0,031
<i>Drechslera</i>	0,127	0,371	0,145	-0,371	-0,054	-0,133	0,371	0,124
<i>Fusarium</i>	<b>0,513*</b>	0,180	0,031	0,308	0,098	<b>0,447</b>	0,065	-0,269
<i>Leptosphaeria</i>	<b>-0,475*</b>	-0,191	<b>0,325</b>	0,017	0,234	-0,169	-0,004	-0,004
<i>Oidium</i>	-0,342	-0,207	0,114	0,207	0,342	–	0,207	0,414
<i>Periconia</i>	-0,171	-0,001	0,312	-0,027	0,235	-0,030	-0,039	-0,028
<i>Pithomyces</i>	<b>0,429*</b>	0,108	-0,182	0,035	<b>-0,219</b>	0,130	0,126	0,248
<i>Pleospora</i>	0,072	<b>-0,194</b>	0,118	-0,071	<b>0,234*</b>	0,008	-0,010	-0,155
<i>Polythrincium</i>	-0,141	<b>-0,372</b>	-0,051	-0,164	0,197	-0,028	0,187	0,191
<i>Rhizopus</i>	0,034	-0,057	0,045	0,023	-0,077	-0,065	0,127	0,158
<i>Torula</i>	-0,017	-0,127	-0,246	-0,051	-0,177	-0,008	0,053	0,084
<i>Ustilago</i>	<b>-0,430*</b>	<b>0,309</b>	0,163	-0,009	0,082	-0,060	0,072	0,106

**Table 3.** Correlations observed between the total concentration of airborne spores throughout the year in Oporto and the main meteorological factors in 2003 and 2004 on the three days preceding spore occurrence. Significant correlations are indicated in bold and a significant coefficient of 1% marked with \*.

	Air temperature		Relative humidity		Precipitation		Wind speed	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
<i>Corynespora</i>	0.133	0.207	-0.201	<b>-0.311</b>	-0.127	-0.176	0.234	-0.155
<i>Didymella</i>	<b>-0.412</b>	0.094	0.268	0.219	0.356	<b>0.318</b>	0.169	-0.031
<i>Drechslera</i>	0.127	0.371	0.145	-0.371	-0.054	-0.133	0.371	0.124
<i>Fusarium</i>	<b>0.513*</b>	0.180	0.031	0.308	0.098	<b>0.447</b>	0.065	-0.269
<i>Leptosphaeria</i>	<b>-0.475*</b>	-0.191	<b>0.325</b>	0.017	0.234	-0.169	-0.004	-0.004
<i>Oidium</i>	-0.342	-0.207	0.114	0.207	0.342	—	0.207	0.414
<i>Periconia</i>	-0.171	-0.001	0.312	-0.027	0.235	-0.030	-0.039	-0.028
<i>Pithomyces</i>	<b>0.429*</b>	0.108	-0.182	0.035	<b>-0.219</b>	0.130	0.126	0.248
<i>Pleospora</i>	0.072	<b>-0.194</b>	0.118	-0.071	<b>0.234*</b>	0.008	-0.010	-0.155
<i>Polythrinicum</i>	-0.141	<b>-0.372</b>	-0.051	-0.164	0.197	-0.028	0.187	0.191
<i>Rhizopus</i>	0.034	-0.057	0.045	0.023	-0.077	-0.065	0.127	0.158
<i>Torula</i>	-0.017	-0.127	-0.246	-0.051	-0.177	-0.008	0.053	0.084
<i>Ustilago</i>	<b>-0.430*</b>	<b>0.309</b>	0.163	-0.009	0.082	-0.060	0.072	0.106

ologia, estamos a realizar estudos de caracterização destas biopartículas.

Ao longo deste trabalho, foram identificados mais de 40 tipos diferentes de esporos fúngicos, com base nas suas características morfológicas, em microscopia óptica, a partir de amostras da atmosfera urbana do Porto, usando um captador volumétrico de tipo Hirst.

Os métodos mais usados para a identificação de esporos fúngicos atmosféricos são o impacto em meio sólido (cultura) e a identificação visual. Segundo o primeiro método, são recolhidas amostras de esporos em placas de Petri com meio nutritivo e, após incubação, identificadas as colónias formadas. Este tipo de estudo encontra-se limitado pelo crescimento dos esporos; assim esporos pertencentes aos Ascomycetes ou Basidiomycetes, são incapazes de se desenvolver no meio de cultura ou, caso cresçam desenvolvem formas anamórficas que não podem ser identificadas. Por isso, e de uma forma geral, este método encontra-se restringido ao estudo dos Deuteromycetes (fungos imperfeitos). As diferentes capacidades competitivas para vários géneros influenciam também o crescimento, apenas podendo ser cultivados esporos viáveis, e

on. In the first method, spore samples are placed on Petri dishes with a nutrient and, after incubation, the colonies formed are identified. This type of study is limited by spore growth and spores belonging to the Ascomycetes or Basidiomycetes group are incapable of developing in culture, or can develop anamorphic forms that cannot be identified. This method, therefore, is generally restricted to the study of Deuteromycetes (imperfect fungi). The different competitive capacities of various types also influence growth and only viable spores can be cultivated. The colonies they develop may derive from hypha fragments and not from spores. The advantage of this method is that it allows distinction between *Aspergillus* and *Penicillium* spores, impossible by visual identification method.

Visual identification is based on morphological characteristics (colour, size and shape) of the fungal spores collected in the volumetric trap. Disadvantages are the fact that many spores are morphologically similar and cannot be differentiated in this way. Many spores, especially Ascomycetes and Basidiomycetes, are small and crystalline and thus extremely difficult to

as colónias que se desenvolvem podem ter derivado de fragmentos de hifas e não de esporos. A vantagem deste método é permitir distinguir os esporos de *Aspergillus* e *Penicillium*, o que é impossível recorrendo ao método de identificação visual.

A identificação visual baseia-se nas características morfológicas (cor, tamanho e forma) dos esporos fúngicos recolhidos por um captador volumétrico. As desvantagens relacionam-se com o facto de muitos esporos serem morfologicamente semelhantes, não podendo ser identificados, a nível do género. Muitos esporos, particularmente de *Ascomycetes* e *Basidiomycetes*, são pequenos e hialinos, sendo extremamente difíceis de visualizar. As vantagens deste método incluem a quantidade de esporos que podem ser identificados e a capacidade de estudar as distribuições sazonais e mesmo diárias destas biopartículas.

Para estudos onde são requeridos valores precisos da concentração de esporos no ar, é preferível recorrer ao método de identificação visual. Porém, uma situação ideal implicaria o uso dos dois métodos simultaneamente<sup>23</sup>.

Nos resultados obtidos, quando comparados com estudos em regiões mais a sul, na Península Ibérica<sup>24</sup>, verificámos que, no Porto, foram observadas baixas concentrações de esporos. Este facto, pode estar relacionado com as características geográficas desta cidade, principalmente a proximidade do rio Douro e do oceano Atlântico, que influenciam, negativamente, a concentração destas biopartículas presentes no ar.

Os esporos de *Cladosporium* apresentaram um padrão de distribuição semelhante nos dois anos em estudo. A principal diferença reside nas datas dos máximos e nas concentrações registadas. Assim, em 2003, os valores máximos registados foram de 1786 esporos/m<sup>3</sup> em 9 de Setembro e, no ano seguinte, a data do pico destes esporos foi antecipada para 16 de Agosto, com um valor de 1438 esporos/m<sup>3</sup>.

*Cladosporium*, o fungo encontrado mais frequentemente na área de Porto, é a principal fonte de alergénios fúngicos inalados. Ao contrário da *Alternaria*, organismo predominante em climas quentes e húmidos, os esporos de

see. Advantages of this method include the quantity of spores that can be identified and the fact that seasonal and even daily distribution of these bioparticles can be studied.

In studies where precise levels of airborne spore concentrations are needed, it is preferable to use the visual identification method. However, use of the two methods simultaneously is the ideal situation<sup>23</sup>.

When compared with results of research from more southern regions of the Iberian Peninsula<sup>24</sup>, our study found lower concentrations of spores in Oporto. This fact could relate to the geographical characteristics of this city, principally its proximity to the river Douro and Atlantic Ocean, which impact negatively on the airborne concentration of these particles.

*Cladosporium* spores presented a similar distribution pattern in the two years of the study. The main difference lies in the peak and concentration data recorded. Thus, maximum 2003 levels registered were 1786 spores /m<sup>3</sup> on September 9 with the 2004 peak of 1438 spores/m<sup>3</sup> occurring on August 16.

*Cladosporium*, the most frequently encountered fungus in the Oporto area, is the main source of inhaled allergenic fungi. In contrast to *Alternaria*, an organism mainly found in humid and hot climates, *Cladosporium* spores can be found in cooler climates such as ours<sup>25</sup>. *Cladosporium* was present over the whole year and was the dominant type of fungi, in keeping with observations in many countries such as Australia<sup>6</sup>, Chile<sup>11</sup>, the United States<sup>26</sup>, Croatia<sup>17</sup>, Spain<sup>27</sup>, Turkey<sup>28</sup> and Qatar<sup>29</sup>. Nevertheless, the concentration of *Cladosporium* recorded in these studies is higher than in Oporto, where the highest level was observed at the end of Summer (1786 and 1438 spores/m<sup>3</sup>), not reaching the 3000 spores /m<sup>3</sup> considered by some authors as being responsible for inducing allergic symptoms.<sup>14</sup>

Recent studies have shown that despite sensitization to this fungus being low in Europe – between 0.7 and 9.9%

*Cladosporium* podem ser encontrados em climas mais frios, como o nosso<sup>25</sup>. *Cladosporium* esteve presente, ao longo de todo ano, sendo o tipo fúngico dominante, o que está de acordo com o observado em muitos países, como a Austrália<sup>6</sup>, o Chile<sup>11</sup>, os Estados Unidos de América<sup>26</sup>, a Croácia<sup>17</sup>, a Espanha<sup>27</sup>, a Turquia<sup>28</sup> e o Qatar<sup>29</sup>. Não obstante a concentração de *Cladosporium* registada nestes trabalhos foi superior à do Porto, onde a concentração mais elevada foi observada no final do Verão (1786 e 1438 esporos/m<sup>3</sup>), não tendo sido atingido o valor de 3000 esporos/m<sup>3</sup> considerado, por alguns autores, como responsável pela indução de sintomas alérgicos<sup>14</sup>.

Em estudos recentes, tem sido verificado que, apesar de a sensibilização a este fungo ser baixa na Europa – entre 0,7 e 9,9% dos doentes com asma<sup>30</sup> e entre 1,8 e 6,9% em estudos nacionais<sup>31</sup> – esta sensibilização associa-se significativamente com a gravidade da asma<sup>30</sup> e com o risco de asma desencadeada na idade adulta<sup>32</sup>.

A 9 de Setembro de 2003 foi, também, observado o pico dos esporos de *Alternaria*, tendo sido atingido o valor máximo de 49 esporos/m<sup>3</sup>. Em diferentes regiões do mundo, *Alternaria* é um dos principais alergénios presentes na atmosfera. A crescente sensibilidade aos esporos de *Alternaria* foi reconhecida como um factor de risco para o desenvolvimento, persistência de asma e exacerbações potencialmente fatais desta doença<sup>20,30,33,34</sup>.

Os esporos de *Alternaria* podem ser observados na atmosfera do Porto desde o fim da Primavera até ao início do Outono (onde se verificam as concentrações mais elevadas), sendo o mesmo padrão de ocorrência observado em outros países, como a Polónia<sup>7,14</sup> e o Reino Unido<sup>10</sup>. Os valores por nós observados foram semelhantes aos registados por alguns autores em Orense (valor máximo: 62 esporos/m<sup>3</sup>)<sup>35</sup> mas inferiores aos registados em Córdoba e Cáceres (valores máximos: 300 e 100 esporos/m<sup>3</sup>, respectivamente) no fim da Primavera<sup>27,36</sup> e, em Melbourne (Austrália), no Outono (valores máximos: 23 a 1424 esporos/m<sup>3</sup>)<sup>37</sup>.

Os valores máximos dos esporos de *Ganoderma*, 386 esporos/m<sup>3</sup>, foram registados no dia 16 de Outubro de

of asthma patients<sup>30</sup> and between 1.8 and 6.9% in national studies<sup>31</sup> – this sensitization is significantly associated with the severity of the asthma<sup>30</sup> and to the risk of asthma developing in adults<sup>32</sup>.

On September 9, 2003 a peak was also seen in *Alternaria* spores, which reached a maximum level of 49 spores/m<sup>3</sup>. *Alternaria* is one of the main airborne allergens in various parts of the world. Increasing sensitivity to the *Alternaria* spores was recognized as a risk factor for the development and persistence of asthma and potential fatal exacerbations of this disease.<sup>20,30,33,34</sup>.

*Alternaria* spores can be found in the outdoor air in Oporto from the end of Spring until early Autumn (when the highest concentrations are seen), with the same pattern observed in other countries such as Poland<sup>7,14</sup> and the United Kingdom<sup>10</sup>. The levels we recorded were similar to those of another study in Orense, Spain (maximum level 62 spores/m<sup>3</sup>)<sup>35</sup> but less than those recorded in the Spanish cities of Cordoba and Cáceres, at the end of Spring<sup>27,36</sup> (maximum levels 300 and 100 spores /m<sup>3</sup> respectively) and in Melbourne, Australia, in Autumn (maximum levels 23 to 1424 spores/m<sup>3</sup>)<sup>37</sup>.

Maximum levels of the *Ganoderma* (386 spores/m<sup>3</sup>), were registered on October 16, 2003. In the following year, the maximum levels observed were almost double, i.e., 719 spores/m<sup>3</sup> on September 17. This was the second fungal spore encountered (12-15%, Figure 5) during Autumn. These results are in keeping with findings of studies in other countries, in which this fungus constitutes between 6% and 34% of airborne spores<sup>9</sup>. As sensitization by skin prick tests varies from 10-48% in different geographic areas, the spore's role in the development of allergenic symptoms is not well defined. Seasonal distribution of these spores can be related to the presence of decomposing vegetable matter during this season, as *Ganoderma* grow in coniferous plants<sup>9</sup>.

The distribution of *Aspergillaceae* spores was similar in the two years of this study, presenting a cons-

2003. No ano seguinte, os valores máximos observados foram quase o dobro, isto é, 719 esporos/m<sup>3</sup> no dia 17 de Setembro. Este foi o segundo esporo fúngico mais frequente (12 a 15%, Figura 5), essencialmente durante o Outono. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por autores de outros países, em que este fungo constitui entre 6% a 34% dos esporos presentes na atmosfera<sup>9</sup>, podendo a sensibilização por testes cutâneos oscilar entre 10-48% em diferentes áreas geográficas, não estando bem definido o seu papel no desencadear de sintomas alérgicos. A distribuição sazonal destes esporos pode estar relacionada com a presença de material vegetal em decomposição durante esta estação, uma vez que os esporos de *Ganoderma* crescem em material de coníferas<sup>9</sup>.

A distribuição dos esporos de *Aspergillaceae* foi semelhante nos dois anos em que decorreu este estudo, apresentando uma concentração constante com máximos de 169 (3 de Setembro 2003) e 74 esporos/m<sup>3</sup> (11 de Fevereiro 2004). Este grupo de esporos foi o quarto mais abundante na atmosfera do Porto (3%), e resultados semelhantes foram observados no Qatar<sup>29</sup>. Apesar de o nosso estudo analisar os esporos fúngicos no ar exterior, os esporos de *Aspergillus* e *Penicillium* são frequentemente encontrados em habitações<sup>38</sup> e têm sido referenciados como agentes etiológicos da rinite<sup>3,39</sup> e da asma brônquica. Estes fungos estão, também, associados a doenças que podem envolver o pulmão profundo, tal como a aspergilose broncopulmonar alérgica e as pneumonites de hipersensibilidade<sup>19,20,40</sup>. Apesar de a identificação microscópica não permitir distinguir estas duas espécies de fungos (que exigem a identificação por cultura), sabe-se que as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* têm antigenicidade cruzada na sua ligação à IgE<sup>41</sup>.

*Epicoccum purpurascens* (anteriormente designado por *E. nigrum*), um fungo saprófita presente quer em ambientes fechados quer ao ar livre, foi identificado como um importante aeroalergénio, com uma sensibilização de 5-7% da população mundial<sup>42,43</sup>. No que diz respeito à distribuição de esporos de *Epicoccum* (27 esporos/m<sup>3</sup>), os valores máximos ocorreram sempre no Verão.

tant concentration with maximums of 169 (September 3, 2003) and 74 spores/m<sup>3</sup> (February 11, 2004). This family of spores was the fourth most common in the air of Oporto (3%) and similar results were observed in Qatar<sup>29</sup>. Despite our study evaluating outdoor airborne fungal spores, *Aspergillus* and *Penicillium* are frequently found in homes<sup>38</sup> and have been identified as aetiological agents of rhinitis<sup>3,39</sup> and bronchial asthma. These fungi are also associated with illnesses that can develop in the deep lung, such as allergic bronchopulmonary aspergillosis and hypersensitivity pneumonitis<sup>19,20,40</sup>. Despite it not being possible to differentiate between these two species using a microscope (which calls for culture identification) it is known that *Penicillium* and *Aspergillus* have cross-antigenicity in their relation to IgE<sup>41</sup>.

*Epicoccum purpurascens* (previously designated as *E. nigrum*), a saprophyte fungus present both indoors and outdoors, was identified as an important aeroallergen with a 5-7% sensitization among the world's population<sup>42,43</sup>. The maximum distribution of *Epicoccum* spores (27 spores/m<sup>3</sup>) was always in Summer.

*Fusarium solani* is an important allergenic source for around 4% of patients with asthma and / or rhinitis<sup>44</sup>. However, it had scarce and irregular levels in our study with a peak of 174 spores/m<sup>3</sup> (April 25, 2003)

A cross-reactivity has recently been identified between the allergens of *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum purpurascens* and *Fusarium solani*<sup>43</sup>. This fact could be explained by β-1,3-glucans, present in the cellular wall of fungal spores. Additionally, presence of enolases in the cellular wall of spores could contribute to the cross-reactivity observed between the different species of fungus<sup>45</sup>. This cross-reactivity could have implications in the induction of allergic symptoms in patients sensitized and exposed to any of these fungi. Curiously, in our study we saw similar significant correlations between levels of *Cladosporium*, *Alternaria* and *Epi-*

*Fusarium solani* é uma importante fonte alergénica para cerca de 4% dos doentes com asma e/ou rinite<sup>44</sup>. No entanto, durante este estudo apresentou valores escassos e irregulares verificando-se um pico de 174 esporos/m<sup>3</sup> (25 de Abril 2003).

Recentemente, tem sido descrita uma reactividade cruzada entre os alergénios de *Alternaria alternata*, de *Aspergillus fumigatus*, de *Cladosporium herbarum*, de *Epicoccum purpurascens* e de *Fusarium solani*<sup>43</sup>. Este facto poderá ser explicado pelos β-1,3-glucanos, presentes na parede celular dos esporos fúngicos. Também a presença de enolases na parede celular dos esporos poderá contribuir para a reactividade cruzada observada entre as diferentes espécies de fungos<sup>45</sup>. Esta reactividade cruzada poderá ter implicações na indução de sintomas alérgicos em doentes sensibilizados e expostos a qualquer um destes fungos. Curiosamente, no nosso estudo verificámos correlações significativas semelhantes entre os níveis de esporos de *Cladosporium*, *Alternaria* e *Epicoccum* e a temperatura média ambiente (Quadro 2), predominando os três tipos de esporos em períodos semelhantes no Verão.

Embora a maioria de esporos esteja presente na atmosfera ao longo do ano, os tipos mais frequentes podem ser divididos, de acordo com a sua época de ocorrência, em cinco grupos diferentes: os esporos de Primavera (*Corynespora*, *Fusarium*, *Oidium* e *Periconia*), os esporos de Verão (*Aspergillaceae*, *Epicoccum*, *Pithomyces*, *Ferrugens* e *Rhizopus*), esporos predominantes durante o final do Verão e Outono (*Alternaria* e *Ganoderma*), esporos de Outono (*Pleospora*) e de Inverno (*Torula* e *Ustilago*).

Durante o Inverno, foram observadas concentrações muito baixas de esporos, não obstante ter sido registado, em Fevereiro de 2003, um pico de esporos de *Ustilago*. Em Espanha, este pico é, geralmente, observado mais tarde, no começo do Verão<sup>24,27</sup>. Esta diferença temporal pode ser explicada pela falta de campos de cultivo de cereais na nossa área de estudo, em oposição às áreas referidas pelos trabalhos de autores espanhóis. Por outro lado, já relativamente aos esporos de Primavera, foram observados picos semelhantes de *Fusarium*<sup>35</sup> e de *Oidium*<sup>24</sup> em Espanha.

*coccum* spores and the average air temperature (Table 2). These three types of spores were predominant in similar Summer periods.

Although the majority of spores were present in the air throughout the year, the most frequent types can be classified, according to their season of occurrence, into five separate groups: the Spring spores (*Corynespora*, *Fusarium*, *Oidium* and *Periconia*), the Summer spores (*Aspergillaceae*, *Epicoccum*, *Pithomyces*, *Ferrugens* and *Rhizopus*), spores predominant during late Summer and Autumn (*Alternaria* and *Ganoderma*), Autumn spores (*Pleospora*) and Winter spores (*Torula* e *Ustilago*).

Very low spore concentrations were observed during Winter, although a peak of *Ustilago* was registered in February 2003. This peak is generally observed later in Spain, at the beginning of Summer<sup>24,27</sup>. This seasonal difference can be explained by the lack of arable farms around the area of our study, in contrast to the areas referred to by Spanish researchers. Furthermore, and still on the subject of Spring spores, similar peaks of *Fusarium*<sup>35</sup> and *Oidium*<sup>24</sup> were observed in Spain.

A correlation analysis was made to establish which fungi's behaviour is influenced by meteorological factors and which factors are not responsible for liberation and dispersal of spores. The highest airborne concentration of spores was found between the months of July and October, while the lowest concentrations were registered January–February, the coldest and most humid months of the year. In fact, the majority of airborne fungal spores present throughout the year in Oporto were found to have a positive correlation with average air temperature, meaning spore quantities increased during the hottest months of the year (Summer and early Autumn), falling again with the dropping of temperature from the end of Autumn and in Winter. The same occurrence pattern we observed in the city of Oporto<sup>21</sup> was also found in different regions of Spain<sup>5</sup>, Croatia<sup>17</sup> and Qatar<sup>29</sup>.

Para verificar quais os fungos que têm o seu comportamento influenciado pelos factores meteorológicos e quais os factores que não são os principais responsáveis pela libertação e dispersão de esporos recorreu-se a uma análise de correlação.

A concentração atmosférica de esporos fúngicos mais elevada foi encontrada entre os meses de Julho a Outubro, enquanto as concentrações mais baixas foram registadas de Janeiro a Fevereiro, os meses mais frios e húmidos do ano. De facto, a maioria dos esporos fúngicos presentes ao longo de todo o ano na atmosfera do Porto encontra-se correlacionada positivamente com a temperatura média do ar; ou seja, a quantidade de esporos aumenta durante os meses mais quentes do ano (Verão e início do Outono), voltando a baixar com a diminuição das temperaturas registadas durante o final do Outono e todo o Inverno. Este mesmo padrão de ocorrência que temos observado na cidade do Porto<sup>21</sup> foi também descrito em diferentes regiões de Espanha<sup>5</sup>, da Croácia<sup>17</sup> e do Qatar<sup>29</sup>.

A influência da humidade relativa não foi tão notória como a da temperatura, podendo este facto ser explicado pela homogeneidade dos valores observados (valores médios em 2003: 79±12%, valores médios em 2004: 77±13%) ao longo ao ano, na cidade do Porto. Esta homogeneidade foi, também, observada na velocidade do vento, o que explica a influência nula deste parâmetro na concentração dos esporos atmosféricos (valores médios em 2003: 16±6 km/h, valores médios em 2004: 15±6 km/h) e indica que a eficiência de captação não foi diminuída ao longo do período em estudo devido à ausência ou forte presença de vento (2003: mínimo=6 km/h e máximo=41 km/h; 2004: mínimo=4 km/h e máximo=36 km/h).

No que diz respeito aos fungos de ocorrência esporádica, observou-se que os factores meteorológicos não são os mais determinantes na sua distribuição interanual, quer analisando o dia da contagem ou agregando os três dias anteriores. A sua ocorrência poderá estar mais associada a outros factores, como, por exemplo, o desenvolvimento vegetativo das plantas e a existência de matéria morta vegetal que poderá funcionar como substrato ao desenvolvimento destes esporos. De facto, o Porto é uma área urbana com vários

Influence of relative humidity was not as notable as that of air temperature and this fact can be explained by the similarity of levels observed (average levels in 2003 79±12%, average levels in 2004 77±13%) during the year in the city of Oporto. This similarity was also observed in wind speeds, which explains the lack of influence of this parameter in the concentration of airborne spores (average levels in 2003 16±6 km/h, average levels in 2004 15±6 km/h) and indicate that trapping efficiency did not decrease during the period of study because of lack of wind or high wind speeds (2003 minimum=6 km/h and maximum=41 km/h; 2004 minimum=4 km/h and maximum=36 km/h).

As regards sporadic occurrence fungi, it was observed that meteorological factors are not the most determining factors on the inter-annual distribution, both in the evaluation made daily or over the three preceding days. Their occurrence could be more associated to other factors such as, for example, vegetative development of plants and the existence of decomposing vegetable matter, which could function as a substrate to the development of these spores. Oporto is, as it happens, a city with parks and gardens adorned with many trees and these plants could have an influence on the presence of some airborne fungal spores.

The highest concentration levels of some spore types coincided with peaks in the concentrations of some species of allergenic pollens in the city of Oporto. The peak of spores observed in June and July occurred at the same period as the highest counts of *Poaceae* and *Urticaceae*<sup>46</sup>. Likewise, high spore levels recorded in September and October corresponded to maximums of *Plantago* and *Chenopodiaceae-Amaranthaceae*<sup>47</sup>. This temporal coincidence between fungal spores and pollen grains could be due to the existence of weather conditions favourable to development of fungi and plants responsible for the liberation of both these bioparticles. So there is a possibility that fungal spores could play a role in triggering and/or worsening allergic-type respiratory diseases in sensitized patients.

jardins que possuem árvores ornamentais, podendo alguns dos esporos fúngicos presentes na atmosfera estar relacionados com a presença destas plantas.

Os valores mais elevados da concentração de alguns tipos de esporos foram coincidentes com os picos da concentração de alguns tipos de pólen alergizante, na cidade do Porto. O pico de esporos observado em Junho-Julho ocorreu na mesma altura dos picos de *Poaceae* e *Urticaceae*<sup>46</sup>. Também os valores observados em Setembro-Outubro correspondem aos máximos de *Plantago* e *Chenopodiaceae-Amaranthaceae*<sup>47</sup>. Esta coincidência nas datas de incidência de esporos fúngicos e grãos de pólen pode dever-se à ocorrência de condições meteorológicas favoráveis ao desenvolvimento dos fungos e das plantas responsáveis pela libertação destas biopartículas. Assim, possivelmente, os esporos fúngicos podem ter um papel coadjuvante no desencadeamento e/ou agravamento de doenças respiratórias do foro alergológico em doentes polissensibilizados.

Em Portugal, observa-se um aumento dos sintomas alérgicos relacionados com a exposição aos grãos de pólen durante a Primavera e o final do Verão. De forma interessante, isto acontece quando as biopartículas mais abundantes na atmosfera começam a ser os esporos fúngicos, principalmente *Cladosporium*, que podem interagir com a exposição polínica, agravando os sintomas alérgicos em doentes atópicos co-sensibilizados.

Futuramente, pretende-se seleccionar alguns dos esporos fúngicos mais representativos, nomeadamente *Alternaria* e *Cladosporium*, e, posteriormente, prever a data da sua ocorrência na atmosfera. Para tal, tentar-se-á encontrar padrões anuais de distribuição e averiguar as possíveis variáveis que poderão influenciar o comportamento destes esporos, testando diferentes métodos de previsão (como por exemplo: regressão linear, análise de séries temporais, *general linear models*), uma vez que ainda existem grandes lacunas nesta área de estudo.

De igual modo, estes estudos revestem-se de interesse no campo alergológico, permitindo, a médio prazo, elaborar calendários da ocorrência destes esporos, possibilitando não só

In Portugal, increased allergic symptoms have been observed in relation to exposure to pollen grains during Spring and late Summer. Interestingly, this occurs at a time when the most profuse airborne bioparticles begin to be fungal spores, mainly *Cladosporium*, which can interact with pollen exposure to worsen allergic symptoms in co-sensitized atopic patients.

In the future, we aim to select some of the most representative fungal spores, namely *Alternaria* and *Cladosporium* and predict the time of their appearance in the air. To do this, an attempt will be made to find annual distribution patterns and isolate possible variables that could influence the behaviour of these spores, testing different prediction methods (such as linear regression, temporal series analysis and general linear models), as major knowledge gaps exist in this area of study.

These studies are of equal interest to the allergological field, allowing, in the medium term, the creation of calendars for these spores to facilitate not only implementation of suitable preventative medical treatment, but also better interpretation by clinicians of acute respiratory conditions in sensitized allergic patients and planning of outdoor activities for people with allergies.

## CONCLUSION

Fungal spores make up a significant proportion of airborne bioparticles found in the city of Oporto. Among the 42 types of fungal spores identified during 2003 and 2004 *Cladosporium* was the most common, followed by the spores of *Ganoderma*, *Aspergilaceae*, *Coprinus*, *Alternaria*, *Botrytis* and *Fusarium*. The average density of airborne fungal spores was 403 spores/m<sup>3</sup> in 2003 and 412 spores /m<sup>3</sup> in 2004, varying with the season of the year, with the highest levels in Summer and early Autumn. The lowest spore concentrations were found during Winter and early Spring.

implementar tratamentos médicos preventivos adequados mas, também, auxiliar os clínicos numa melhor interpretação de agudizações respiratórias em doentes alérgicos sensibilizados e planear as actividades ao ar livre dos doentes com alergias.

## CONCLUSÃO

Os esporos fúngicos constituem uma fracção significativa das biopartículas presentes na atmosfera da cidade do Porto e, entre os 42 tipos de esporos fúngicos identificados, durante os anos de 2003 e 2004, *Cladosporium* foi o esporo mais frequente, seguido dos esporos de *Ganoderma*, *Aspergillaceae*, *Coprinus*, *Alternaria*, *Botrytis* e *Fusarium*. A densidade de esporos fúngicos atmosféricos foi em média de 403 esporos/m<sup>3</sup> em 2003 e de 412 esporos/m<sup>3</sup> em 2004, variando de acordo com a época do ano, com valores mais elevados durante o Verão e início do Outono. Por outro lado, os valores mais baixos foram registados durante o Inverno e o início da Primavera.

Os esporos fúngicos apresentaram comportamentos distintos. Esporos dos géneros *Alternaria*, *Aspergillaceae*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Epicoccum*, *Ganoderna* e *Ferrugens* foram identificados ao longo de todo o ano, embora em concentrações variáveis; os esporos dos géneros *Corynespora*, *Didymella*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Oidium*, *Periconia*, *Pithomyces*, *Polythrincium*, *Pleospora*, *Rhizopus*, *Torula* e *Ustilago* apresentaram comportamento esporádico, surgindo em baixas concentrações (1 a 50 esporos/m<sup>3</sup>).

A maioria dos esporos fúngicos presentes ao longo de todo o ano encontra-se correlacionada positivamente com a temperatura, não se correlacionando com a humidade relativa, precipitação ou velocidade do vento.

Este trabalho sublinha a necessidade de se proceder à monitorização dos esporos fúngicos presentes na atmosfera e efectuar estudos do seu potencial alergológico, designadamente avaliando, na nossa população, a prevalência de sensibilização aos tipos encontrados na atmosfera de forma contínua durante todo o ano e com potencial alergizante (e.g. *Cladosporium*, *Ganoderna*, *Aspergillaceae* e *Alternaria*).

Fungal spores presented distinct behaviour. Spores of the genera *Alternaria*, *Aspergillaceae*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Epicoccum*, *Ganoderna* and *Ferrugens* spores were identified throughout the year, but in varying concentrations. Spores of the genera *Corynespora*, *Didymella*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Oidium*, *Periconia*, *Pithomyces*, *Polythrincium*, *Pleospora*, *Rhizopus*, *Torula* and *Ustilago*, presented sporadic behaviour, appearing in low concentrations (1-50 spores/m<sup>3</sup>).

Most fungal spores present for the whole year had a positive correlation with temperature and did not correlate with relative humidity, precipitation or wind speed.

This study stresses the need to continue monitoring levels of airborne spores and to analyse their allergological potential, as well as the need for evaluation among our population of prevalence of sensitivity to the airborne types with allergic potential and found during the whole year and (e.g. *Cladosporium*, *Ganoderna*, *Aspergillaceae* and *Alternaria*).

## Agradecimentos

A primeira autora agradece a Bolsa de Doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/18765/2004). Os dados meteorológicos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Doutor Manuel de Barros, do Instituto Geofísico da Universidade do Porto.

## Acknowledgments

The first author gratefully acknowledges the Fundação para a Ciência e Tecnologia / The Foundations for Science and Technology (SFRH/BD/18765/2004) Doctoral Scholarship. The meteorological data were kindly supplied by Professor Manuel de Barros of the Oporto University Geophysical Institute.

## REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Jones A, Harrison R. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Sci Total Environ* 2004; 326:151-80.
2. Rodríguez V, Fernández I, Rodríguez M. *Atlas de polen alergógeno*. Xunta de Galicia 2001.
3. Asero R, Bottazzi G. Nasal polyposis: a study of its association with airborne allergen hypersensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:283-5.
4. Kurup V, ShenH-D, Banerjee B. Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect* 2000; 2:1101-10.
5. Aira MJ, La-Serna I, Dopazo A. Identification of fungal spores of the atmosphere of Santiago de Compostela (NW Spain) in the winter period. *Polen* 2003; 12:65-76.
6. Mitakakis T, O'Meara T, Tovey E. The effect of sunlight on allergen release from spores of the fungus *Alternaria*. *Grana* 2005; 42:43-6.
7. Myszkowska D, Stepalska D, Obtuowicz K, Porebski G. The relationship between airborne pollen and fungal spore concentrations and seasonal pollen allergy symptoms in Cracow in 1997-1999. *Aerobiologia* 2004; 18:153-61.
8. Çolakoglu G. Airborne fungal spores at the Belgrad forest near the city od Istanbul (Turkey) in the year 2001 and their relation to allergic diseases. *J Basic Microbiology* 2003; 43:376-84.
9. Craig R, Levetin E. Multi-year study of *Ganoderma* aerobiology. *Aerobiologia* 2000; 16:75-81.
10. Corden J, Millington W. The long-term trends and seasonal variation of the aeroallergen *Alternaria* in Derby, UK. *Aerobiologia* 2001; 17:136.
11. Henríquez V, Villegas G, Nolla J. Airborne fungi monitoring in Santiago, Chile. *Aerobiologia* 2001; 17:137-42.
12. Abdel-Hafez S, El-Said A. Seasonal variations of airborne fungi in Wadi Qena, Estern Desert, Egypt. *Grana* 1989; 28:193-203.
13. Hawke P, Meadows M. Winter airspore spectra and metereological conditions in Cape Town, South Africa. *Grana* 1989; 28:187-92.
14. Stepalska D, Harmata J, Kasprzyk I, Myszkowska D, Stach A. Occurrence of airborne Cladosporium and Alternaria spores in Southern and Central Poland in 1995-1996. *Aerobiologia* 1999; 15:39-47.
15. Larsen E. A three-year survey of microfungi in the outdoor air of Copenhagen 1977-79. *Grana* 1981; 20:197-8.
16. Munk L. Dispersal of *Erysiphe graminis* conidia from winter barley. *Grana* 1981; 20:215-17.
17. Pepelnjak S, Šegvi M. Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croatia. *Aerobiologia* 2003; 19:11-9.
18. Al-Mousawi M, Lovel H, Behdhan N, Woodcock A, Custovic A. Asthma and sensitization in a community with low indoor allergen levels and low pet-keeping frequency. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1389-94.
19. Winick JC, Delgado JL. Doença Respiratória na Indústria da Cortiça. *Rev Port Imunoalergologia* 1999; 7:107-9.
20. Winick JC, Delgado JL, Murta R, Lopez M, Marques J. Antigen characterization of major cork moulds in Suberosis (cork worker's pneumonitis) by immunoblotting. *Allergy* 2004; 59:739-45.
21. Oliveira M, Ribeiro H, Abreu I. Annual variation of fungal spores in the atmosphere of Porto: 2003. *Ann Agric Environ Med* 2005; 12:309-15.
22. Oliveira M, Abreu I. Effects of some meteorological factors on fungal spore distribution in Porto Atmosphere. *Annalen der Meteorologie* 2005; 41:162-5.
23. Mandrioli P, Comtois P, Levizzani V (eds). *Methods in Aerobiology*. 1 ed. Bolonha: Pitagora Editrice 1998.
24. Paredes M, Martínez J, Muñoz A, Tormo R, Silva I. Presencia de esporas de *Ustilago* (Basidiomycetes) en el aire de Badajoz. *Polen* 1998; 8:35-42.
25. Kurup V. Fungal allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003; 3:416-23.
26. Katial R, Zhang Y, Jones R, Dyer P. Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. *Int J Biometeorol* 1997; 41:17-21.
27. Bustos I, Angulo J, Domínguez E. Caracterización aeromicológica de la atmósfera del parque natural de la sierra de Hornachuelos (Córdoba), relación com los parámetros meteorológicos. 61-66. 2001. XIII Simposio de la Asociación de Palinólogos en Lengua Española (APLE).
28. Sen B, Asan A. Airborne fungi in vegetable growing areas of Edirne, Turkey. *Aerobiologia* 2004; 17:69-75.
29. Al-Subai A. Air-borne fungi at Doha, Qatar. *Aerobiologia* 2002; 18:175-83.
30. Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Sensitization to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ* 2006; 325.

31. Loureiro A, Loureiro G, Tavares B, Carrapatoso I, Chieira C. Sensibilização a fungos. *Rev Port Imunoalergologia* 1999; 7:131.
32. Jaakkola M, Ieromnimou A, Jaakkola J. Are atopy and specific IgE to mites and molds important for adult asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:642-8.
33. Karihaloo C, Tovey Mitakakis T, Duffy D, Britton W. Evidence for the genetic control of immunoglobulin E reactivity to the allergens of *Alternaria alternata*. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1316-22.
34. Black P, Udy A, Brodie S. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy* 2005; 55:501-4.
35. Méndez J, Iglesias M, Jato M, Aira M. Variación del contenido en espora de *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium* en la atmósfera de la ciudad de Ourense (años 1993-1994). *Polen* 1997; 8:79-88.
36. Pérez G, Molina R, Palacios I, Rodríguez A. Esporas de *Cladosporium* y *Alternaria* en la atmósfera de la ciudad de Cáceres. *Palinología: diversidad y aplicaciones* 2001; 277-86.
37. Mitakakis T, Clift A, McGee P. The effect of local cropping activities and weather on the airborne concentration of allergenic *Alternaria* spores in rural Australia. *Grana* 2004; 41:230-9.
38. Shen H, Han S. Characterization of allergens of *Penicillium* and *Aspergillus* species. *Microbiol Immunol* 1998; 31:141-5.
39. Stark P, Celedon J, Chew G, Ryan L, Burge H, Muilenberg M et al. Fungal levels in the home and allergic rhinitis by 5 years of age. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1405-9.
40. Moss R. Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 3):S203-6.
41. Shen H, Tam M, Chou H, Han S. The importance of serine proteinases as aeroallergens associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:259-64.
42. Bisht V, Arora N, Singh B, Gaur S, Sridhara S. Purification and characterization of a major cross-reactive allergen from *Epicoccum purpurascens*. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:217-24.
43. Bisht V, Singh B, Arora N, Gaur S, Sridhara S. Antigenic and allergenic cross-reactivity of *Epicoccum nigrum* with other fungi. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89:285-91.
44. Verma J, Sridhara S, Singh B, Pasha S, Gangal S, Arora N. *Fusarium solani* major allergen peptide IV-I binds IgE but does not release histamine. *Clin Exp Allergy* 2006; 31:920-7.
45. Kurup V, Shen H, Vijay H. Immunobiology of fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:181-8.
46. Abreu I, Ribeiro H, Cunha M. An Aeropalynological study of the Porto region (Portugal). *Aerobiologia* 2003; 19:235-40.
47. Abreu I, Ribeiro H. Allergenic pollen in the city of Porto (Portugal). *Allergy* 2005; 60:1452-3.