

Monitorização de grãos de pólen e de esporos de fungos atmosféricos para redes de aerobiologia ligadas à alergia com uso do método volumétrico de Hirst: Procedimentos segundo a Norma Europeia EN 16868:2019

Airborne pollen grains and fungal spores monitoring for aerobiology networks allergy-related using the volumetric Hirst method: procedures according to European Norm EN 16868:2019

Data de receção / Received in: 16/12/2024

Data de aceitação / Accepted for publication in: 17/03/2025

Rev Port Imunoalergologia 2025; 33 (3): 149-162

Elsa Caeiro^{1,2} , Carlos Nunes³ , Mário Morais-Almeida⁴ , Irene Câmara Camacho⁵ 

¹ SPAIC – Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica, Lisboa, Portugal.

² MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

³ Centro de Imunoalergologia do Algarve, Portimão, Portugal

⁴ Centro de Alergia, Hospital CUF Descobertas, Lisboa, Portugal

⁵ Faculdade das Ciências da Vida, Universidade da Madeira, Funchal, Portugal

Contribuições dos autores: Elsa Caeiro – concetualização, metodologia, análise formal, redação do rascunho original, redação – revisão e edição; Carlos Nunes – concetualização, redação – revisão e edição; Mário Morais-Almeida – concetualização, redação – revisão e edição; Irene Câmara Camacho – concetualização, metodologia, análise formal, redação – revisão e edição. Todos os autores contribuíram na revisão e aprovação da versão final do manuscrito.

RESUMO

A relação entre pólen e alergia foi reconhecida somente nos finais do séc. XIX, tendo-se assistido, desde então, a um desenvolvimento de métodos, técnicas e procedimentos para deteção e análise de partículas biológicas presentes no ar. A nível mundial, existem inúmeras redes de aerobiologia e diversos protocolos operacionais e análise a serem utilizados, conduzindo a problemas de standardização universal e de comparabilidade das medições. Para colmatar esta lacuna no contexto europeu, foi elaborado um documento técnico padronizado que, em 2019, passou a norma

<http://doi.org/10.32932/rpia.2025.06.166>

européia, com as especificações técnicas contudentes à amostragem e análise de grãos de pólen e esporos de fungos aerotransportados, baseadas no método volumétrico de *Hirst*. Este protocolo descreve a metodologia apresentada pela EN 16868:2019 que uma rede de aerobiologia ligada à alergia deve adotar. A Norma EN 16868:2019 encontra-se oficialmente escrita em quatro idiomas (inglês, francês, alemão e espanhol), não existindo a sua adaptação e tradução em português. Este documento descreve as especificações técnicas publicadas na Norma Europeia EN 16868:2019. O seu uso garantirá a qualidade e a fiabilidade das informações aerobiológicas resultantes divulgadas e usadas pela população, médicos e agências governamentais, visando melhorar a saúde e a qualidade de vida dos doentes com doença alérgica respiratória. Ética e divulgação: Neste trabalho não foram utilizadas amostras biológicas de natureza humana ou animal. A norma EN 16868:2019, atualmente aplicada na Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA), pode assim ser adaptada em outros países de língua portuguesa.

Palavras-chave: Alergia, esporos de fungos, grãos de pólen, monitorização de grãos de pólen e de esporos de fungos, norma europeia, procedimentos de amostragem e análise, rede de aerobiologia.

© 2025 Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Published by Publicações Ciência e Vida.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ABSTRACT

The relationship between pollen and allergy was recognized at the end of the XIX century and since then there has been a development of methods, techniques and procedures for detecting and analyzing biological particles in the air. Worldwide, there are several aerobiology networks and different operational and analysis protocols being used, leading to problems of universal standardization and comparability of measurements. To fill this gap in the European context, a standardized European technical document was elaborated, which passed to European Norm in 2019, with technical specifications for the sampling and analysis of pollen grains and airborne fungal spores based on Hirst's volumetric method. This document aims to describe the methodology presented by the European Standard EN 16868:2019 and which must be adopted by any aerobiology network related to allergies. The Standard EN 16868:2019 is officially written in four languages (English, French, German, and Spanish), with no adaptation or translation into Portuguese. This document describes the technical specifications published in the European standard EN 16868:2019. Its use will guarantee the quality and reliability of aerobiological information disseminated and used by the population, physicians, and government agencies, with the purpose to improve the health and quality of life of patients with allergic respiratory disease. Ethics and Disclosure: This work did not involve the use of biological samples of human or animal nature. The EN 16868:2019 standard, currently applied in the Portuguese Aerobiology Network (RPA), can therefore be adapted in other Portuguese-speaking countries.

Keywords: Aerobiology network, allergy, european norm, fungal spores, pollen grains, monitoring of pollen grains and fungal spores, proceedings of sampling and analysis.

© 2025 Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Published by Publicações Ciência e Vida.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Pontos fortes e potenciais limitações

- Descrição detalhada da metodologia de amostragem e análise dos grãos de pólen e esporos de fungos atmosféricos – Método volumétrico de Hirst segundo a Norma Europeia EN 16868:2019 adaptada à RPA e a outras redes de aerobiologia ligadas à alergia.
- Possibilidade de aplicação da norma em outros países de expressão portuguesa.
- O uso da norma garante uma metodologia padronizada das monitorizações aerobiológicas, permitindo a harmonização, a validação, a confiabilidade e a comparabilidade dos dados obtidos.

INTRODUÇÃO

Entre as partículas biológicas presentes no ar encontram-se os grãos de pólen e os esporos de fungos que acabam por ter impactos na saúde (1,2). Alergias e doenças respiratórias associadas representam um sério desafio de saúde de importância crescente em muitos países (2,3). As alergias ao pólen afetam até 40% da população em países industrializados e tornaram-se num problema global; 30% dos indivíduos atópicos apresentam sensibilização a um ou mais alérgenos fúngicos (2). Alguns Estados-Membros europeus consideram os grãos de pólen e os esporos de fungos como poluentes atmosféricos, bem como as partículas $PM_{10, 2,5}$ suspensas no ar (1).

Atualmente, a monitorização de grãos de pólen e esporos de fungos do ar é assegurada por estações e/ou redes de aerobiologia dotadas de equipamentos fixos de captação de biopartículas (4).

O captador volumétrico de Hirst é o mais utilizado em todo o mundo para a monitorização de pólen e esporos do ar (4). Contudo, têm sido usadas diferentes metodologias na amostragem e análise dessas partículas biológicas (5). Como tal, e com o aumento global do número de redes relacionadas com a alergia, surgiu a necessidade de haver uma metodologia padronizada de monitorização, visando a harmonização, a validação e a confiabilidade dos dados aerobiológicos. Adicionalmente,

tal padronização permite a comparação de dados de estações biogeográficas distintas e definir tendências de variação das épocas e intensidades polínicas/fúngicas. Além disso, permite a construção de modelos de previsão, rastrear a resposta das plantas num clima em mudança e inferir a sua gravidade numa perspetiva clínica.

A RPA – Rede Portuguesa de Aerobiologia – não foi exceção, tendo adotado uma metodologia padronizada, com vista a garantir a qualidade dos dados aerobiológicos e da informação que transmite à população, residente e turística, que sofre de alergias (rinite, conjuntivite, asma e outras) e aos profissionais de saúde.

Em 2005 foi elaborado um documento técnico padronizado europeu que passou em 2019 a norma europeia, estando Portugal representado pelo Instituto Português da Qualidade. A referida norma, EN 16868:2019 (1) especifica os procedimentos de amostragem contínua e análise das concentrações de grãos de pólen e de esporos de fungos presentes no ar ambiente usando o método volumétrico de tipo Hirst (6,7,8) para propósitos de redes ligadas à alergia.

Este trabalho visa descrever a metodologia que uma rede de aerobiologia ligada à alergia deve adotar, quanto à amostragem, análise de amostras, controlo de qualidade interno/externo e expressão de resultados das concentrações de grãos de pólen e/ou de esporos de fungos presentes no ar atmosférico tendo por base a atual Norma EN 16868:2019.

METODOLOGIA DE MONITORIZAÇÃO DE BIOAEROSSÓIS (GRÃOS DE PÓLEN E ESPOROS DE FUNGOS): MÉTODO VOLUMÉTRICO DE HIRST

Recolha da amostra

Segundo a Norma Europeia 16868:2019 (1), para a monitorização de grãos de pólen e/ou esporos de fungos com capacidade alérgica, as redes de âmbito alergológico devem utilizar o captador volumétrico de Hirst e a

metodologia associada, basicamente o recomendado pela IAA – International Association for Aerobiology – e pela EAS – European Aerobiology Society (7,9,10) – e que a RPA segue (3,11,12).

O coletor utilizado é um captador volumétrico de tipo Hirst, um coletor de sucção baseado no princípio básico de impacto. A Figura 1 mostra um desses coletores da versão comercial BURKARD, Rickmansworth, Herst., Reino Unido. Existem comercialmente outros (fabricados pela Lanzoni s.r.l., Itália: VPPS 2000 e VPPS 2021 e fabricado pela Burkard scientific Co, Ltd, UK, o Burkard Scientific 2000). Existem 2 (duas) versões de coletores do tipo Hirst, de 7 dias e de 24 horas de amostragem (1).

O coletor (Figura 1) é um aparelho de metal constituído essencialmente por três unidades: 1) motor, a bom-

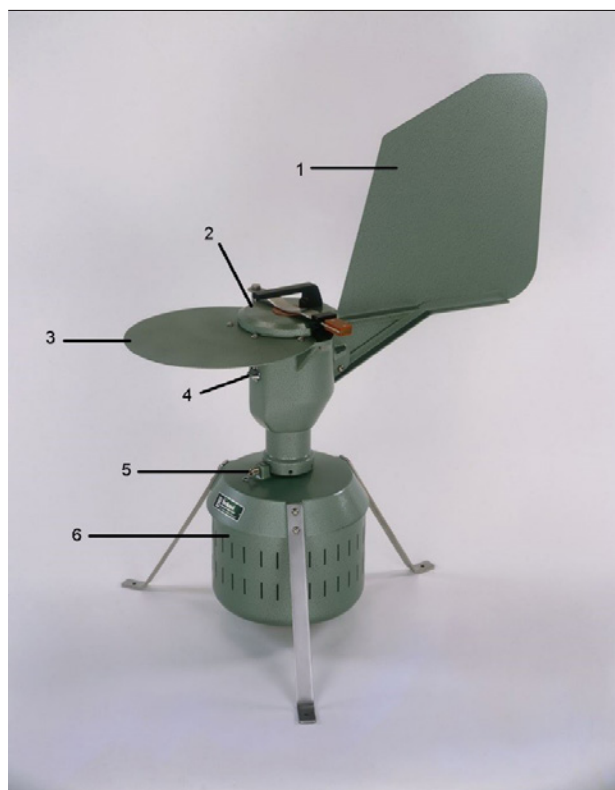


Figura 1. Coletor do tipo Hirst um Burkard 7-Day Volumetric spore trap (1 catavento; 2 tampa; 3 protetor de chuva; 4 orifício; 5 bloqueio de rotações; 6 localização do motor) (13 modificado).

ba de vácuo; 2) unidade ou secção de impacto (“cabeça” do coletor); e 3) catavento. Este sistema completo de amostragem ou coletor terá de ser resistente à corrosão, bem preso (resistente ao vento) e sempre horizontal (ao nível da cabeça). Para fins alergológicos (1), os seguintes requisitos e condições de posicionamento do coletor devem ser cumpridos:

- a) O coletor deve ser colocado numa superfície horizontal, plana e de fácil acesso. Deve estar no topo de um edifício e afastado da borda do edifício para reduzir o efeito da turbulência;
- b) Garantir que os edifícios adjacentes não protegem o coletor ou influenciam o fluxo de ar. O aparelho deve ser colocado idealmente na cobertura de um edifício a mais de 2 m da bordadura; a altura acima do nível do solo depende da localidade e da altura dos edifícios vizinhos;
- c) O coletor deve ser elevado entre 1 m e 1,5 m do solo do topo do edifício, para evitar o atrito entre as camadas de ar e a possível ressuspensão e/ou contaminação de partículas do solo;
- d) O coletor não deve ser colocado próximo de fontes fixas ou móveis de emissão em massa de partículas biológicas ou não biológicas (neste caso, pode favorecer a presença maciça de resíduos nas amostras, dificultando a identificação).

O aparelho tem uma bomba de vácuo, de sucção motorizada que funciona 24 horas por dia, durante todo o ano, com a mesma taxa de fluxo. O fluxo é ajustado para 10 l/min (± 1 l/min), quantidade similar à inspirada pelo pulmão humano, sendo verificada a cada recolha da amostra com um medidor de fluxo adaptado, um fluxímetro fornecido pelo fornecedor do captador.

A unidade de impacto compreende o orifício, um mecanismo rotativo (sistema de relojoaria, onde se insere um tambor rotativo) e uma estrutura em forma de meia-lua que protege o orifício das intempéries. O orifício consta de uma abertura retangular de 14 mm

($\pm 0,1$ mm) \times 2 mm ($\pm 0,1$ mm), com uma profundidade > 19 mm e de uma distância ao tambor sem fita de 0,70 mm ($\pm 0,1$ m). Nestas condições, é garantido que não ocorre turbulência do fluxo laminar, a mistura de ar e partículas é direcionada para o suporte revestido e a impactação é eficiente. O tambor rotativo é a unidade do aparelho onde é colocada uma fita transparente (ex.: fita de Melinex) previamente impregnada com uma substância adesiva, através da qual são obtidas as amostras. Segundo a EN16868:2019 (1), a fita tem de cumprir os seguintes requisitos: 1) ser insolúvel na água; 2) a sua espessura não deve sofrer alterações ao longo do tempo e não deverá ser afetada pelas condições operacionais (com a temperatura entre -20°C e 50°C ou com a humidade entre 20% e 100%); 3) deverá ser perfeitamente transparente à luz do microscópio; e 4) o comprimento superior a 336 mm.

O ar ao ser aspirado penetra pelo orifício, sofre impacto na superfície da fita e todas as partículas orgânicas e inorgânicas do ar aderem a esta, por esta estar impregnada pela solução adesiva; no caso a EAS e a IAA (9,10) recomendam o uso de uma solução de silicone (silicone n.º CAS [90337 93 2] solubilizado com um solvente específico). Outra alternativa, segundo a EN16868 (1), é o uso de vaselina solubilizada ou pura (solubilizar a vaselina com tolueno; vaselina n.º CAS [108 88 3]). A solução de silicone é a recomendada pelas características físicas que permanecem inalteráveis entre -20° e 150°C , e por conseguinte, se adequa à maioria das zonas bioclimáticas. A fita está colocada num tambor rotativo que gira a uma velocidade de 2 mm/h ($\pm 0,01$ mm/h) por estar ligado a um mecanismo de relojoaria. A fita está exposta ininterruptamente 7 dias seguidos, findos os quais é substituída por outra. Esta troca deve ser simples e rápida para prevenir eventuais contaminações. O catavento permite a rotação permanente da “cabeça” do coletor, orientando o orifício na direção da proveniência do vento. Assim, o uso deste coletor possibilita a obtenção de amostras, quer diariamente, quer semanalmente, possibilitando a realização de contagens horárias e diárias (11).

O tambor rotativo tem um diâmetro de 110 mm a 112 mm, nele é enrolada uma fita transparente com 345 mm \pm 0,5 mm a 350 mm \pm 0,5 mm de comprimento. Aquando da fixação da fita ao tambor, este deverá ser limpo com álcool etílico (70%) para se retirar toda a sujidade e/ou partículas biológicas, e só depois se fixa a fita a este. A fita que reveste o tambor, no caso de não estar previamente revestida ou impregnada com a solução adesiva, deverá sê-lo. Dever-se-á aplicar uma fina e homogênea camada da solução adesiva e este processo deverá ser efetuado numa *hotte* e o operador deverá usar luvas de proteção/vestuário/equipamento de proteção ocular/proteção facial).

O tambor deve ser protegido do ar ambiente durante o transporte do laboratório até ao coletor, e seu retorno deve permanecer em caixa metálica própria para proteção contra choques (Figura 2). A conservação em temperatura ambiente da fita no tambor impregnada em substância adesiva não deve exceder 12 (doze) meses no caso do uso da solução de silicone e um mês para a vaselina (petróleo geleia).

Na recolha e substituição do tambor são vários os passos a cumprir. A fim de auxiliar essa tarefa, o então Centro de Coordenação da Rede Portuguesa de Aerobiologia da Universidade de Évora elaborou um documento, semelhante ao usado pela rede francesa RNSA – Réseau National de Surveillance Aerobiologique –, descrevendo os passos a efetuar (Figuras 2A-D e 3).

Importa destacar que para facilitar o tratamento laboratorial, o indivíduo responsável pela troca do tambor deverá marcar o início e o fim do período de amostragem na fita, com o auxílio de um instrumento pontiagudo através do orifício do coletor (Figura 2A). Ainda, caso o caudal do último período de amostragem esteja abaixo da especificação, o responsável pelas leituras/contagens deverá considerar a validade/relevância dos dados.

O tambor é substituído semanalmente e sempre à mesma hora, e findo esse período ocorrerá sobreposição da amostra.

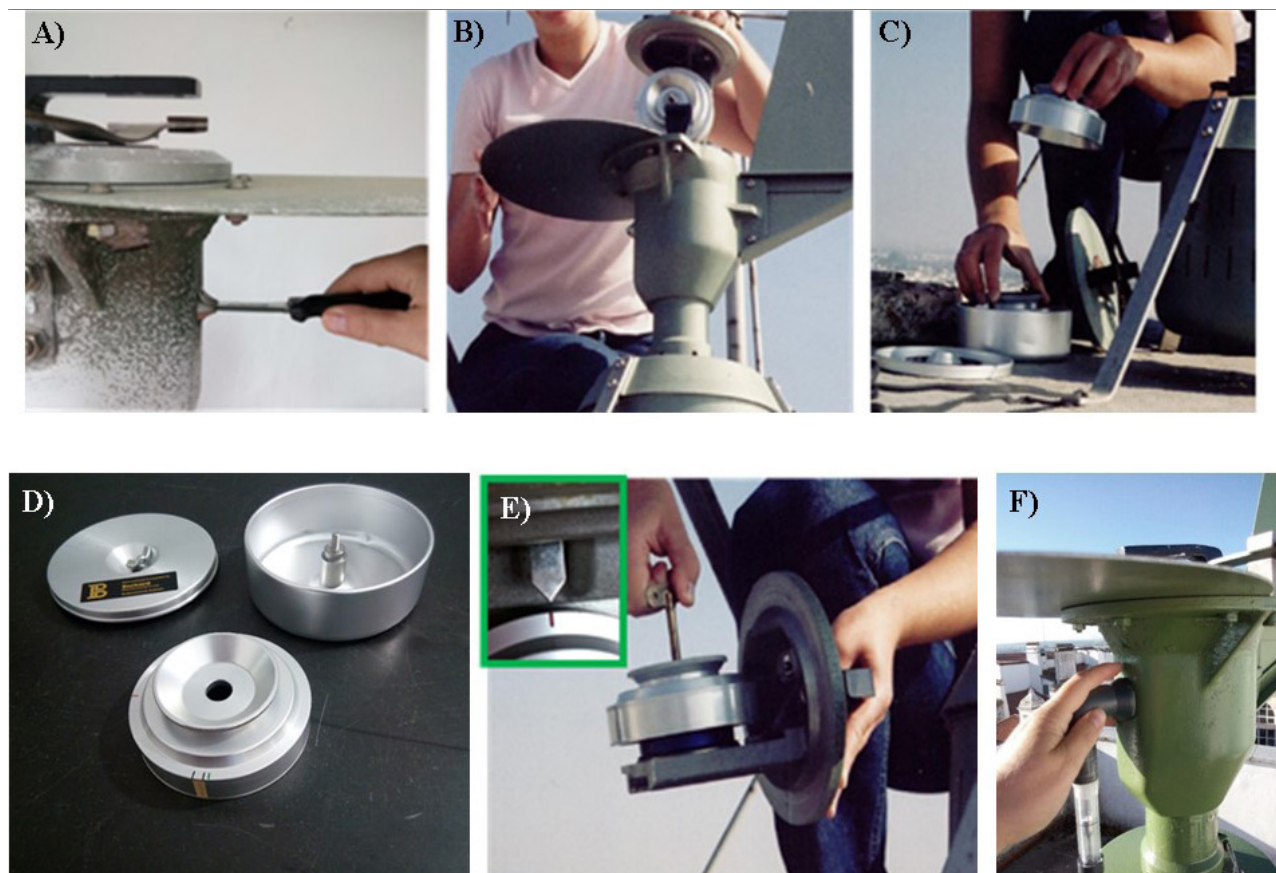


Figura 2. A) Marcação do fim/início da amostragem; B), Operador a substituir o tambor; C) Operador a retirar da caixa o tambor de substituição e a colocar em seu lugar o tambor com amostra que foi retirado do coletor para transporte até ao laboratório onde se efetuará o processamento e análise do respetivo; D) Tambor com fita e caixa de proteção ou “porta-tambor”; E) Ato de dar corda ao sistema de relojoaria do coletor para assegurar a amostragem para o período seguinte; F) Medição/verificação do fluxo do coletor

PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Processamento das amostras

No laboratório, o procedimento de preparação das amostras para análise (1,11,12) realiza-se da seguinte forma:

- Limpar a bancada, a placa de aquecimento e os utensílios antes do seu uso (pinças, bisturi ou X-ato, régua) com álcool etílico a 70%;
- Colocar o meio de montagem (solução corante e de fixação) em fusão (no forno, na placa de aquecimento ou micro-ondas);

- Colocar numa folha de papel absorvente, por exemplo, 7 lâminas de vidro para microscopia (de dimensão $\geq 76 \text{ mm} \times 26 \text{ mm}$ limpa, desengordurada e de uso único), identificando-as, colocando uma etiqueta com o nome da estação de monitorização e data correspondente no lado esquerdo da lâmina;
- Retirar o tambor da caixa de transporte e fixá-lo no suporte de enrolamento para que a fita possa ser retirada (Figura 4A);
- Descolar ou cortar a fita na zona de junção;
- Com o auxílio das pinças, pegar nas extremidades da fita, sem a tocar com os dedos e colocá-la na régua de corte (Figura 4B);

R.P.A.	Ficha de Substituição do Tambor
Estação de Monitorização: _____	
Data de colocação: ____/____/____ Hora: _____	
Data de recolha: ____/____/____ Hora: _____	
Operador da substituição: _____	
Fluxo do polinómetro (+/-10L/min): SIM _____ NÃO _____	
Observações:	
<p>Operações a efetuar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Medir o fluxo do polinómetro. Desligar o colector da corrente eléctrica. Bloquear a zona giratória do colector. Marcar o final da amostragem com objecto pontiagudo. Abrir a “cabeça” do colector. Retirar o tambor que se encontra colocado no coletor (esta operação e as restantes que se seguem deverão ser rápidas, para evitar contaminações, e numa posição contrária à direção do vento) 7. Limpar o orifício e o interior do polinómetro. Colocar o novo tambor. Verificar que a marca vermelha fica na direção da seta da “cabeça” do colector. Dar corda ao relógio. Colocar a “cabeça” do colector. marcar o início da amostragem com objecto pontiagudo. Desbloquear a zona giratória do colector. Ligar o colector à corrente eléctrica. Escutar o funcionamento do motor. 16. Medir o fluxo do polinómetro. <p>NOTA: Se o fluxo do polinómetro não for o correto deve ser ajustado.</p>	

Figura 3. Ficha de substituição do tambor

- Fazer corresponder o início da amostragem com uma das marcações da régua de corte;
- Cortar a fita em 7 fragmentos iguais. Cada fragmento mede cerca de 48 mm de comprimento e constitui uma amostra diária;
- Colocar 3 gotas (0,05 ml/gota) ou uma linha de meio de montagem líquido (0,15 ml) na lâmina de vidro.
- Depositar delicadamente, com auxílio da pinça, o fragmento da fita no centro da lâmina de vidro sobre o meio de montagem. O início da amostragem deverá estar do lado da etiqueta;
- Colocar 3 gotas (0,05 ml/gota) ou uma linha (0,15 ml) de meio de montagem com corante sobre o fragmento da fita ou na lamela (Figura 4C-D). No caso, utiliza-se uma solução corante de glicerogelatina ou

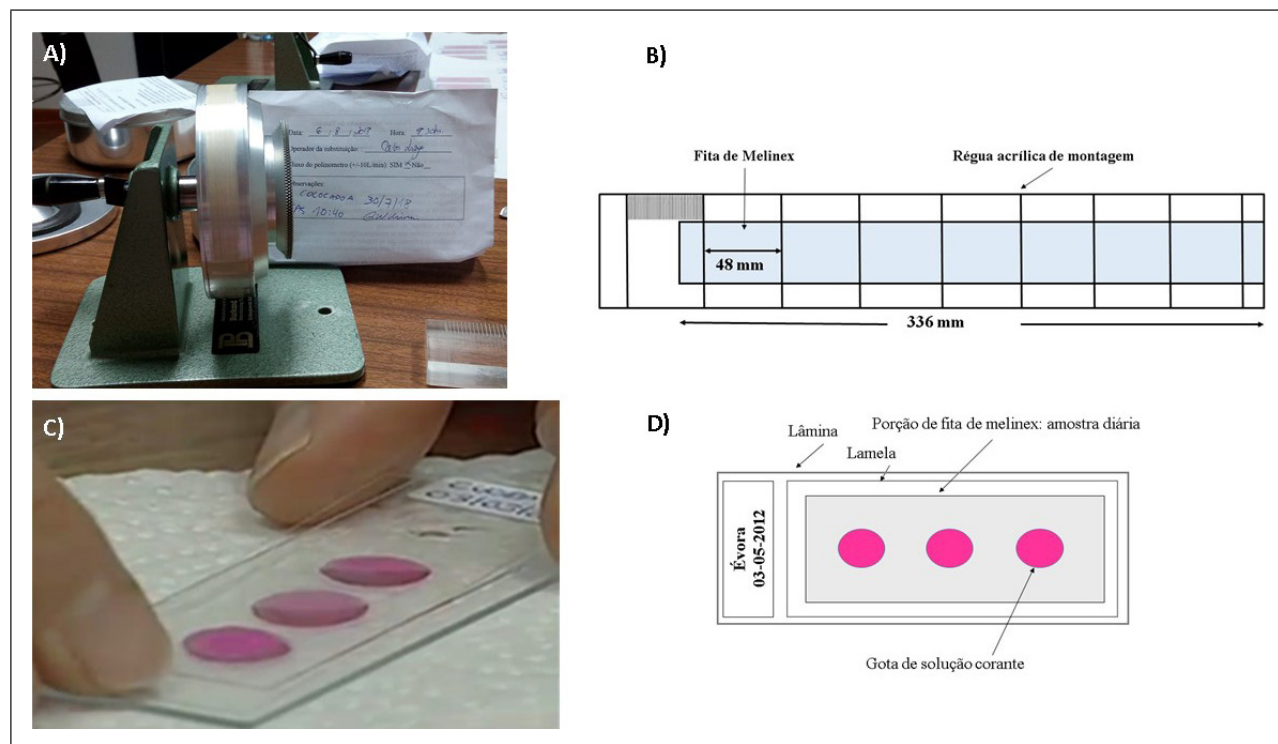


Figura 4. A) Tambor no suporte de enrolamento; B) Fita na régua de corte; C) Preparação (amostra diária); D) e correspondente ilustração esquemática

glicerina simples com fucsina básica (nº CAS [632 99 5]) ou safranina (nº CAS [477-74 6]). De acordo com a EN 16868:2019 (1), podem ser utilizadas misturas específicas contendo gelvatol/mowiol ou outros produtos prontos a usar. O objetivo da solução corante é corar a parede dos grãos de pólen presentes na amostra para que se possa proceder à sua identificação (identificar a fonte vegetal de proveniência) com base na morfologia. A solução é específica para grãos de pólen, dado os esporos de fungos não corarem.

- Em seguida, colocar lentamente a lamela na preparação, para evitar a formação de bolhas e movimento de partículas. A lamela deve ser maior do que o tamanho da fração da fita que está sob a lamela (exemplo de uma lamela de dimensão apropriada: 22 mm x 64 mm), tem de ser transparente e de uso único;

- Deixar a preparação na placa de aquecimento de 50°C a 60°C para remoção de eventuais bolhas de ar e posteriormente deixar a lâmina arrefecer à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos.
- Repetir o procedimento para os restantes fragmentos da fita (amostras diárias).

Findo o processo de preparação das amostras, limpar o tambor e a caixa metálica ou “porta-tambor” com álcool etílico 70% para eliminar eventuais partículas atmosféricas que possam ter aderido a estas estruturas, prevenindo assim uma eventual contaminação da amostra seguinte. Posteriormente, coloca-se uma nova fita no tambor para nova amostragem e impregna-se com a solução adesiva. Aplica-se uma fina e homogénea camada da solução em ordem a reter as partículas.

A preparação das lâminas para a análise microscópica deve ser realizada à temperatura ambiente e em menos de

14 dias após a retirada do tambor do coletor (para manter a migração dos grãos de pólen o mais baixo possível).

ANÁLISE DAS AMOSTRAS AO MICROSCÓPIO ÓTICO

Metodologia de contagem (leitura das amostras)

As amostras (preparações) são examinadas ao microscópio ótico, identificando-se e quantificando os grãos de pólen e/ou esporos de fungos presentes na preparação. Em rotina, deve-se usar uma ampliação de pelo menos 400x. As objetivas vão desde 20x a 100x e as oculares de 8x a 12,5x. Uma ampliação menor pode aumentar o erro de identificação, mas uma ampliação maior requer uma área de leitura não inferior a 10% da área do depósito (1).

A identificação deve ser feita por um operador especializado (especificamente treinado) com formação (1).

Análise quantitativa da amostra

Dado que a leitura da preparação (identificação e quantificação das partículas polínicas) consome muito tempo, normalmente realiza-se uma subamostragem na preparação. Conhecem-se vários sistemas de leitura das lâminas com amostras. Segundo a EN16868:2019 (1) podem-se utilizar varrimentos horizontais paralelos ou verticais. O número de varrimentos necessários terá que ver com a área da lâmina a examinar, e depende do tamanho do campo de visão do microscópio e da ampliação. A área observada deverá ser no mínimo 10%. O recomendado é o sistema das 4 (quatro) linhas longitudinais (desenvolvido pela Rede Espanhola de Aerobiologia) (7) e consiste em percorrer na horizontal 4 linhas no centro da lâmina, na ampliação de 400x (ocular de 10x e objetiva de 40x), correspondendo a aproximadamente 12-13 % da preparação.

O procedimento utilizado (1,11,12) é o seguinte:

- 1) recorta-se um segmento da folha de acetato da dimensão de uma lâmina de microscópio.

- 2) Traçam-se, a azul, 24 linhas transversais no segmento da folha de acetato separadas entre si por 2 mm;
- 3) Coloca-se o segmento sob a lâmina, o primeiro intervalo de 2 mm entre as primeiras 2 linhas representa a hora do dia em que se inicia a análise das partículas transportadas pelo ar. O intervalo entre as linhas corresponde a uma hora de amostragem;
- 4) Assumindo-se que as partículas polínicas estão uniformemente distribuídas ao longo da fita, marcam-se 4 pontos a azul ao centro, próximos da primeira linha do segmento de acetato;
- 5) Coloca-se a objetiva sobre um dos pontos e percorre-se 48 mm de cada amostra diária ao longo da lâmina (como se se traçasse uma linha longitudinal com a objetiva) e repete-se este processo para os três outros pontos marcados;
- 6) Por cada 2 mm (uma hora de amostragem) da linha percorrida registam-se os grãos de pólen e/ou esporos de fungos identificados e a respetiva quantidade numa tabela com separação horária (registo manual);
- 7) Após a leitura, calculam-se os totais de cada tipo polínico encontrado, sendo os dados obtidos estimativas dos verdadeiros valores;
- 8) As contagens de grãos de pólen ou de esporos de fungos devem ser expressas como contagens médias diárias de grãos de pólen ou esporos de fungos por metro cúbico de ar. No final, o número total de grãos de pólen ou esporos de fungos contados (n) é multiplicado por um fator de conversão (FC, em inglês *correction factor*), que tem em consideração o volume de ar amostrado (10L/min), a área de amostragem e o tamanho do campo de visão do microscópio ótico usado na ampliação utilizada (7,11,14).

A fórmula para conversão dos valores obtidos para número de partículas por metro cúbico de ar é a seguinte:

N.º de partículas por metro cúbico de ar = $n \times FC$

n = número total de grãos de pólen ou esporos de fungos contados

FC = fator de conversão

CÁLCULO DO FATOR DE CONVERSÃO (FC)

O primeiro passo é medir o campo de visão do microscópio ótico na ampliação 400x.

Exemplo: para o diâmetro do campo de visão igual a 0,45 mm:

$$FC = \frac{\text{Comprimento da fita} \times \text{largura da fita}}{(\text{Medida do campo ótico} \times \text{comprimento da fita} \times n.º \text{ de linhas}) \times \text{fluxo de ar}}$$

$$FC = (48\text{mm} \times 14\text{mm}) / [(0,45\text{mm} \times 48\text{mm} \times 4) \times 14,4 \text{ m}^3]$$

$$FC = 0,54$$

FC = Fator de conversão

Comprimento da fita = comprimento do segmento da fita = 48 mm

Largura da fita = largura do segmento da fita = 14 mm

Medida do campo ótico = 0,45 mm

N.º de linhas = 4

Fluxo de ar = 10L/ min = 600 L/hora = 14400 L/dia = 14,4 m³

Por exemplo, se n = número total de grãos de pólen em quatro varrimentos = 250

N.º de partículas por metro cúbico de ar =

$$= 250 \times 0,54 = 135 \text{ grãos de pólen/m}^3$$

De acordo com as necessidades, também é possível expressar os resultados em dados bi-horários/m³ de ar. Os dados diários acumulados, nomeadamente as contagens anuais, sazonais, mensais ou semanais de pólen ou esporos de fungos são expressos como um índice com a mesma unidade. O índice é calculado somando-se as concentrações diárias durante o período estudado.

Análise qualitativa da amostra

A identificação baseia-se na estrutura e morfologia do grão de pólen, ou seja, no tamanho, forma, polarida-

de, número, tipo de aberturas e sua disposição na superfície e na ornamentação (escultura) da exina (15). Para a identificação dos tipos polínicos recorre-se à bibliografia da especialidade, por exemplo Smith (16,17), Reille (18), Arias et al. (19), Lacey e West (20), Trigo et al. (21), Caeiro (12), Camacho e Camacho (22), à palinoteca (coleção de grãos de pólen de referência provenientes de vários taxa devidamente identificados e recolhidos a partir da flora da região) e a um documento digital, a *Identification key for the pollen content of the air* da RNSA e da IAA (23). A RNSA produziu o documento também na versão inglesa com os principais tipos polínicos que podem ocorrer no ar. Contém uma chave de identificação que permite a identificação de amostras frescas, sem tratamentos com ácidos, e dos principais tipos de pólen habitualmente presentes na atmosfera, e de outros grãos de pólen de interesse palinológico.

Para a terminologia polínica também se pode consultar a documentada, por exemplo, no *The Air Spora* de Lacey e West (20), no *Glossary of Pollen and Spore Terminology* de Punt et al. (24,25), no *Polen y Esporas* de Saenz de Rivas (26), *Glosario de términos palinológicos* de Laín (27), na dissertação de Caeiro (11) e no *Guia ilustrado dos pólenes da Região da Madeira* de Camacho e Camacho (22).

O documento da EN 16868:2019 (1) também contém a referência de vários outros manuais que podem auxiliar na identificação de grãos de pólen e de esporos de fungos, como: Charpin e Surinyach (28), Nilsson et al. (29), Jensen e Gravesen (30), Ellis e Ellis (31), Mulcahy e Mulcahy (32), Iwanami et al. (33), Iversen e Faegri (34), Miskovsky e Petzold (35), Falagiani (36), Reille (18) e a referência aos websites de Internet das associações EAS e IAA. Ainda neste âmbito existe em Portugal um guia de Camacho (37).

Registo de dados

O registo de dados é feito manualmente (Figura 5), constando informações como a localização da estação de monitorização, data da amostra (o dia, mês e ano), o nome do operador de leitura e uma tabela com separação horária para registo dos tipos de grãos de pólen e espo-



Figura 5. Leitura da amostra diária ao microscópio ótico com auxílio de um contador manual e folhas de registo de dados.

ros de fungos identificados e o seu número em cada linha de leitura. Para auxílio na contagem é utilizado um contador de células.

Segundo a EN16868 (I), outro possível registo é através de gravação semiautomática: por reconhecimento de voz e introdução em base de dados de modo automático (*software* próprio desenvolvido pela RNSA).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As redes de aerobiologia requerem uma metodologia normalizada para garantir a obtenção de dados fidedignos, daí a formulação desta norma (EN 16868:2019), tornando-se necessário existir um controlo de qualidade interno eficaz através da implementação de programas de qualidade.

Um aspeto fundamental para garantir a qualidade da monitorização aerobiológica é avaliar o desempenho dos técnicos especializados nas leituras, os quais contribuem com os dados diários de pólen. Esta avaliação garantirá a fiabilidade das previsões de pólen que são utilizadas diretamente por membros da comunidade, médicos e agências governamentais, visando melhorar a saúde e a qualidade de vida dos indivíduos com doenças alérgicas respiratórias.

Segundo a EN 16868:2019 (I), as características de desempenho serão avaliadas através do cálculo de indi-

cadores de precisão e exatidão. Em aerobiologia, a precisão (em condições de repetibilidade e reprodutibilidade) é geralmente quantificada pelo coeficiente de variação e a exatidão pelo erro absoluto ou pelo erro relativo, o qual depende da dimensão das amostras.

A Norma EN 16868:2019 (I) estabelece requisitos de desempenho e recomendações que se desenvolvem no seguimento.

REQUISITOS DE DESEMPENHO

Repetibilidade

De acordo com a EN 16868:2019 (I), o desempenho de cada técnico especializado na leitura de grãos de pólen e esporos de fungos deve ser controlado uma vez por ano através de medição em condições de repetibilidade de uma amostra (ou seja, uma lâmina de microscópio com amostra) pelo mesmo técnico, usando o mesmo método e um mínimo de três réplicas por técnico.

Os coeficientes de variação (CV) aceitáveis, calculados apenas para taxa com valor verdadeiro > 10 , serão:

- Para um valor verdadeiro aceite entre 10 e 30 grãos de pólen: $CV \leq 30\%$;
- Para um valor verdadeiro aceite entre 30 e 300 grãos de pólen: $CV \leq 20\%$;
- Para um valor verdadeiro aceite > 300 grãos de pólen: $CV < 10\%$.

RECOMENDAÇÕES DE DESEMPENHO

Reprodutibilidade e exatidão

Quando existe mais do que um técnico na equipa do laboratório, recomenda-se a avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial. Os coeficientes de variação aceitáveis são os mesmos da repetibilidade.

Quando o laboratório está envolvido numa rede, recomenda-se também avaliar a reprodutibilidade interla-

boratorial e a precisão. A precisão e exatidão devem ser avaliadas através de exercícios interlaboratoriais seguindo a metodologia proposta por Galán *et al.*(7) e Otero *et al.* (5).

Sensibilidade e especificidade

A sensibilidade mede a proporção de partículas pesquisadas identificadas corretamente. Pode ser expressa como:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{n.º de partículas verdadeiras inspecionadas ou pesquisadas}}{\text{n.º de partículas verdadeiras pesquisadas} + \text{n.º de partículas falsas não pesquisadas}}$$

A especificidade mede a proporção de partículas não pesquisadas que são corretamente identificadas como diferentes das partículas pesquisadas. A especificidade pode ser expressa como:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{n.º de partículas verdadeiras não pesquisadas}}{\text{n.º de partículas verdadeiras não pesquisadas} + \text{n.º de partículas falsamente pesquisadas}}$$

Tanto a sensibilidade como a especificidade dependem da capacidade do técnico em reconhecer de forma adequada um determinado tipo de grão de pólen ou de esporo de fungo na amostra. Assumindo que o técnico está bem treinado, a sensibilidade e a especificidade são consideradas de 1.

De acordo com o contexto biogeográfico, deverão ser analisados os *taxa* mais relevantes que, por exemplo, podem ser: *Alnus*, *Amaranthaceae*, *Ambrosia*, *Artemisia*, *Asteraceae*, *Betula*, *Casuarina*, *Castanea*, *Corylus*, *Cupressaceae*, *Fraxinus*, *Olea*, *Parietaria/Urtica*, *Pinaceae*, *Plantago*, *Platanus*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex*, *Salix* e *Urtica membranacea*.

Neste ponto a norma refere que estudos recentes classificam a família *Chenopodiaceae* como uma nova subfamília da família *Amaranthaceae*.

RESULTADOS ESPERADOS E POSSÍVEIS LIMITAÇÕES

O método volumétrico baseado no sistema de Hirst representa o método de medição mais utilizado em todo o mundo, existindo séries temporais com cerca de 50 anos de amostragem (4). É, habitualmente, utilizado para a realização de estudos de natureza clínica, para a criação e uso de modelos de previsão de pólen e informação aerobiológica divulgada. As principais vantagens deste método são: 1) dado o seu fluxo ser semelhante ao fluxo respiratório do ser humano, permite que as concentrações de pólen e/ou de esporos de fungos possam ser correlacionadas com a sintomatologia de alergia respiratória dos doentes; 2) permite a análise das concentrações de pólen e/ou esporos de fungos horárias e diárias; 3) a estação de monitorização pode cobrir uma região num raio de cerca de 100 km, dependendo da topografia e da sua localização; e 4) o preço deste tipo de coletor é baixo comparativamente com os sistemas automáticos modernos (12).

Algumas das limitações do uso desta metodologia são: 1) a necessidade de técnicos especializados bem treinados para a realização das análises (1); 2) os resultados não são obtidos em tempo real, só são obtidos dias mais tarde, assim como a sua publicação/divulgação.

Este documento será extremamente importante e útil na investigação (aerobiologia e alergologia), na clínica da imunoalergologia, na área de transferência de conhecimento, no ensino ou noutros campos de aplicação (ex.: agronomia, fitopatologia, alterações climáticas, entre outros). O seu uso garantirá a fiabilidade dos dados aerobiológicos e das informações resultantes veiculadas à população, aos profissionais de saúde e agências governamentais, com o intuito de melhorar a saúde e a qualidade de vida dos doentes com doença alérgica respiratória.

ÉTICA E DIVULGAÇÃO

Este trabalho não implicou a utilização de amostras biológicas de natureza humana ou animal, nem suscita

preocupações de índole ética, pelo que não foi submetido a nenhuma comissão de ética. A Norma EN 16868:2019 aqui descrita pode ser adaptada em outros países de língua portuguesa e divulgada em reuniões científicas de âmbito aerobiológico e alergológico.

Agradecimentos

Para a divulgação desta norma europeia foi imprescindível o trabalho, o esforço e dedicação de todos os clínicos, professores e colaboradores responsáveis pelo funcionamento dos captadores de bioaerossóis de cada centro de monitorização da Rede Portuguesa de Aerobiologia-RPA e que mantêm a RPA em funcionamento há mais de duas décadas. Deste modo expressamos aqui o nosso sincero agradecimento a todos, a Maria Luísa Lopes, Ana Todo-Bom, José Ferraz de Oliveira, Ângela Gaspar, Rita Câmara, que fizeram parte da equipa da génese da Rede Portuguesa de Aerobiologia, a todas as Direções da SPAIC e Coordenações do Grupo de Interesse em Aerobiologia da SPAIC, desde a génese da RPA até aos dias de hoje, por todo o apoio e incentivo dado à RPA e, pelo apoio direto e indireto de se estar representado no grupo de trabalho europeu e possibilitado uma intervenção na elaboração de um documento técnico que originou a Norma Europeia EN 16868:2019.

A primeira autora também expressa o seu agradecimento ao IPQ – Instituto Português da Qualidade – e a toda a equipa do grupo de trabalho WG39 do CEN/TC 264.

Conflitos de interesse

Os autores não receberam qualquer apoio financeiro para a descrição destas Normas.

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

ORCID

Elsa Caeiro  0000-0001-8717-4596

Carlos Nunes  0000-0002-7402-4940

Mário Morais de Almeida  0000-0003-1837-2980

Irene Câmara Camacho  0000-0003-0061-905X

Autor correspondente

Elsa Caeiro 

Laboratório de Palinologia e Aerobiologia

Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento

Pólo da Mitra

Universidade de Évora

Apartado 94

7006-554 Évora, Portugal

E-mail: egcaeiro@uevora.pt ou elcaeiro@yahoo.com

REFERÊNCIAS

1. EN 16868: 2019. Ambient air – Sampling and analysis of airborne pollen grains and fungal spores for allergy networks – Volumetric Hirst method. CEN-CENELEC Management Centre: Rue de la Science 23, B-1040 Brussels, European Committee For Standardization 2019. 44p.
2. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 2007 Sep;62(9):976-90. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.
3. Caeiro E, Tavares B, Morais-Almeida M, Câmara-Camacho I. Incidência dos principais tipos polínicos em Portugal (Continente e Ilhas). *Rev Port Imunoalergologia* 2024; 32(3):141-9. doi: 10.32932/rpia.2024.03.127.
4. Buters JT, Antunes C, Galveias A, Bergmann KC, Thibaudon C, Galán C, et al. Pollen and spore monitoring in the world. *Clinical and Translational Allergy* 2018; 8:9. doi: 10.1186/s13601-018-0197-8.
5. Oteros J, Galán C, Alzázar P, Domínguez-Vilches E. Quality control in bio-monitoring networks, Spanish Aerobiology Network. *Sci Total Environ* 2013 Jan 15;443:559-65. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.040.
6. Dupuy N. Lecture de spores fongiques. *Reseau National de Surveillance Aerobiologique*. Lyon, France 2007.
7. Galán C, Cariñanos P, Alcázar P, Domínguez E. Spanish Aerobiology Network (REA): Management and Quality Manual. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba, Spain 2007. 36p.
8. Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. *Ann Appl Biol*. 1952;36:257-65.
9. Jäger S. Methodology for routinely performed monitoring of airborne pollen – recommendations. *Aerobiologia* 1995;11:69-70.
10. Galán C, Smith M, Thibaudon M, Frenguelli G, Oteros J, Gehrig R, Berger U, Clot B, Brandão R, EAS QC – Working Group. Pollen-monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis. *Aerobiologia* 2014;30:385-95. Doi: 10.1007/s10453-014-9335-5.
11. Caeiro E. Aerobiologia do pólen de Poaceae, *Olea europaea* L. e *Platanus hispanica* Miller ex Münchh. e potenciais repercussões na doença alérgica respiratória no Sul de Portugal [dissertation]. Universidade de Évora 2013. 435p.

12. Caeiro E. Estudo aeropalinológico comparativo da atmosfera de Évora e Portimão. [dissertation]. Universidade de Coimbra 2004. 164p.
13. Seven-Day Recording Volumetric Spore Trap. UK and Export Sales Division Woodcock Hill Industrial Estate, Rickmansworth, England: Burkard Manufacturing Company Ltd.
14. Frenguelli G. Basic microscopy, calculating the field of view, scanning of slides, sources of error. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii* 2003;20(4):227-9.
15. Frenguelli G. Pollen structure and morphology. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii* 2003;20(4):200-4.
16. Smith EG. Sampling and identifying allergenic pollens and molds. An illustrated manual for physicians and lab. technicians. San Antonio, Texas: Blewstone Press 1984. 92 p.
17. Smith EG. Sampling and identifying allergenic pollens and molds. An illustrated identification manual for air samplers. Vol. 2. San Antonio, Texas: Blewstone Press 1986. 92 p.
18. Reille M. Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Marseille, France: Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie 1992. 520 p.
19. Arias T, Drago M, Soler J, Maira A, Dahl V, Martínez A. et al. *Polinosis. Polen y Alergia*. mra ediciones, S.L., Laboratorios Menarini, S.A. 2002. 174p.
20. Lacey ME, West JS. *The Air Spora. A manual for catching and identifying airborne biological particles*. The Netherlands, Dordrecht: Springer-Verlag 2006. 156p. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-0-387-30253-9.pdf>
21. Trigo MM, Jato MV, Fernandez D, Galán C. *Atlas aeropalinológico de España*. Secretariado de publicaciones de la Universidad de León 2008. 177p.
22. Camacho IC, Camacho R. *Guia ilustrado dos pólenes da região da Madeira (Portugal). Tipos polínicos com interesse alergológico*. Universidade da Madeira 2022. 63p.
23. Sulmont G, Laine C, Sulmont D, Dupuy N, Lachasse C, Thibaudon M. *The pollen content of the air: Identification Key [CD-ROM]*. Vol.2. France: RNSA and IAA 2006.
24. Punt W, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. *Glossary of pollen and spore terminology*. LPP Contributions Series No. 1. Utrecht: LPP Foundation 1994.
25. Punt W, Hoen PP, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. *Glossary of pollen and spore terminology. Review of Palaeobotany and Palynology* 2007;143 (1-2): 1-81.
26. Sáenz de Rivas. *Polen y Esporas. Introducción a la palinología y vocabulario palinológico*. Madrid: H. Blume Ediciones 1978.
27. Laín CS. *Glosario de términos palinológicos*. *Lazaroa* 2004;25: 93-112.
28. Charpin J, Surinyach R. *Atlas of European allergenic pollens*. Sandoz Editions 1974. 229 p.
29. Nilsson ST, Pragłowski J, Nilsson L. *Atlas of airborne pollen grains and spores in northern Europe*. *Natur och kultur* 1977. 159 p.
30. Jensen KW, Gravesen S. *Atlas of moulds in Europe causing respiratory Allergy*. Foundation for Allergy in Europe; 1984. 110 p.
31. Ellis MB, Ellis JP. *Microfungi on land plants an identification handbook* 1985. 818 p.
32. Mulcahy DL, Mulcahy GB. *Biotechnology and ecology of pollen* 1986. 528p.
33. Iwanami Y, Sasakuma T, Yamada Y. *Pollen: Illustrations and scanning electronmicrographs* 1988. 198 p.
34. Iversen J, Faegri K. *Textbook of pollen analysis*. IV Edition 1989. 328 p.
35. Miskovsky RJ, Petzold M. *Spores et pollen*, Edition La Duraulie 1989. 360 p.
36. Falagiani P. *Pollinosis*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press 1990. 267 p.
37. Camacho IG. *Guia dos fungos da atmosfera da Madeira*. Universidade da Madeira 2011. 48 p.