

Utilidad de la determinación de endotoxinas en diferentes ambientes laborales como indicador de riesgo por agentes biológicos

Utility of the airborne endotoxins assay in different occupational environments as a risk indicator by biological agents

Área de Laboratorio
Departamento de Salud Laboral
Lagun-Aro S. Coop.

Iriarte M. J.
Ugarte J. C.
Salazar L.

RESUMEN

Las endotoxinas, complejas moléculas de la pared de las bacterias de las Gram negativas, son el origen de síntomas pulmonares y alteraciones en la función respiratoria así como de sintomatología más general. El presente trabajo mide el nivel de endotoxinas (LAL test QCL-1000 de Biowhittaker) en diferentes ambientes laborales, así como el nivel de viables presentes en dichos ambientes por si pudiera establecerse una relación entre ambas medidas. También para estimar este riesgo biológico en los lugares mencionados.

Nuestros resultados evidencian la necesidad de estandarizar la medida de endotoxinas, empezando por las unidades de medida (EU/mL vs. EU/m³). Con aquellos autores con los que pudimos comparar los valores obtenidos, constatamos que las granjas de cerdos están entre los ambientes con mayor nivel de endotoxinas (media de 8.090 EU/m³), mientras que en los de oficina muestreados el nivel fue indetectable. Por otro lado, no parece existir correlación entre la concentración de viables y de endotoxinas, aunque a niveles muy bajos de viables, los de endotoxinas también lo son.

Palabras clave: *Endotoxinas, viables, riesgo ocupacional.*

Iriarte M J, Ugarte J C, Salazar L
Utilidad de la determinación de endotoxinas en diferentes ambientes laborales como indicador de riesgo por agentes biológicos
Mapfre Medicina, 2001; 12: 234-240

ABSTRACT

Endotoxins, complex molecules of the cell wall of Gram negative bacteria, cause respiratory symptoms and alteration of the respiratory function and also general symptoms. In this paper, we quantified airborne endotoxin level (LAL test QCL-1000, Biowhittaker) in different occupational environments, as well as the culturable bacteria concentrations in these environments, looking for a possible relationship between them. Also, we estimate this biological hazard in the mentioned locations.

Our results highlight the need of standardization of the endotoxin assay, beginning with the measurements units (EU/mL vs. EU/m³). Agree with the authors we could compare, we found the swine buildings among the highest endotoxin level environments (average 8.090 EU/m³); and in the indoor sampled environments the levels were undetectable. In the other hand, it seems that there is no relation between the culturable bacteria concentrations and endotoxins levels, although with low levels of «colonies», low levels of the endotoxins.

Key words: *Endotoxins, culturable bacteria, occupational hazard.*

Iriarte M J, Ugarte J C, Salazar L
Utility of the airborne endotoxins assay in different occupational environments as a risk indicator by biological agents
Mapfre Medicina, 2001; 12: 234-240

Correspondencia:

Lorena Salazar Ibáñez
Lagun-Aro S.Coop.
Pº José M.^a Arizmendiarieta
20500 Mondragón (Guipúzcoa)
E-mail: lsalazar@lagunaro.es

Fecha de recepción: 18 de septiembre de 2000

INTRODUCCIÓN

Las toxinas microbianas pueden causar un tipo de daño sumamente específico en un tejido de un huésped. Por el término toxina nos referimos a componentes microbianos que producen efectos tóxicos en el huésped.

Las toxinas bacterianas se dividen en:

- Exotoxinas: moléculas de naturaleza proteica que son liberadas al medio por las bacterias
- Endotoxinas: componentes derivados de las capas externas de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas, que se liberan al medio tras la lisis bacteriana. Aunque se ha observado que se desprenden cantidades significativas de endotoxina durante la multiplicación de las bacterias.

Las endotoxinas son, por tanto, complejos lipopolisacárido-proteína, aunque es el lipopolisacárido el responsable de la mayoría de los efectos biológicos atribuibles a las endotoxinas.

El lipopolisacárido (LPS) contiene un material lipídico complejo, el lípido A, anclado en la membrana y responsable de la toxicidad y pirogenia; un carbohidrato complejo polisacárido basal o *core* y finalmente en la parte externa de la capa se encuentran cadenas de polisacáridos que penetran en el medio, éstas son las cadenas específicas O (antígeno O), que confieren propiedades antigénicas específicas de la cepa a ciertas bacterias.

Los lipopolisacáridos aislados son muy activos y 10^{-6} g producen fiebre en un caballo de 700 Kg de peso.

Las endotoxinas provocan la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Asimismo provocan fiebre, fijan el complemento y activan el factor XII (factor Hageman) del sistema de coagulación.

Por todo lo dicho, la estimulación de la respuesta inflamatoria puede ser la causa de la patología ampliamente descrita en los trabajos relacionados con el ámbito laboral. Se relaciona con la inhalación de endotoxinas: alteraciones de la función respiratoria, síndromes asmáticos y obstrucción del flujo aéreo, sintomatología catarral, etc.

Se ha implicado a las endotoxinas en enfermedades respiratorias debidas al aire acondicionado (síndrome del edificio enfermo), en las halladas en agricultores, en trabajadores de plantas depuradoras de aguas, plantas de tratamiento de residuos domésticos, en empleados de explotaciones ganaderas y agrícolas, etc.

Por otro lado, la bibliografía consultada refleja la necesidad de estandarizar el método de cuantificación, así como la fase de muestreo ambiental

y preanalítica, razón por la que muchos resultados publicados no son comparables y, en consecuencia, dificultan su utilización práctica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Quantificación e identificación de la carga microbiana (bacterias y hongos)

Por impactación, método basado en la retención de los microorganismos presentes en el aire en placas petri con un medio de cultivo adecuado. El equipo utilizado es el Sampl'Air®, cuyo fundamento consiste en la aspiración de aire gracias a una turbina radial, y hacerlo pasar a través de una superficie perforada situada unos milímetros por encima del agar. El flujo que se consigue es de unos 100 L/min.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Agar de recuento no selectivo (PCA)
- Agar con extracto de malta para levaduras y hongos.
- Agar para el aislamiento de actinomyces.

Se probaron asimismo:

- Agar Sabouraud para recuento de hongos y levaduras.
- Agar MacConkey, agar selectivo para bacterias entéricas.

Tiempo de muestreo: tras varias pruebas se optaron por los siguientes tiempos de muestro:

- Para áreas de servicios y oficinas: entre tres y cinco minutos.
- Para zonas donde se espera encontrar una alta carga microbiana, como las explotaciones porcinas y bovinas: unos 30 segundos.

Endotoxinas

Aunque entendemos que el muestreo personal caracteriza mejor el nivel de endotoxinas al que está expuesto el trabajador, se ha realizado solamente muestreo estático o ambiental, debido a:

1. La necesidad de identificar primero las fuentes o áreas de exposición a endotoxinas en cada ambiente laboral estudiado.
2. Las dificultades técnicas del muestreo personal, que ha de resultar cómodo y no interferir en la actividad del trabajador.

Para el muestreo de endotoxinas se utilizaron filtros de fibra de vidrio, que eran previamente apirógenizados en estufa a 180 °C durante cuatro horas. Se colocaban en un portafiltros Millipore de acero inoxidable que era tratado de la misma manera. El sistema, a su vez, se acopla a una bomba de vacío cuyo flujo es conocido (aproximadamente 2 L/min).

Transporte y almacenamiento

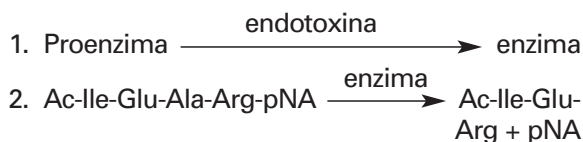
El filtro era retirado del sistema con pinzas apirógenas e introducido en tubos de vidrio apirógenos. Éstos eran congelados a -20 °C nada más llegar al laboratorio.

Extracción y análisis

La extracción se realizó en agua apirógena con Tween 80 al 0,05%. Tras una hora de agitación vigorosa y posterior centrifugación a 1.000 g, las muestras que no iban a ser procesadas inmediatamente se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para la determinación de endotoxinas se empleó el test cromogénico LAL, cuantitativo a punto final (BioWhittaker QCL-1000). El test está basado en la activación de un proenzima presente en el lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus Polyphemus* por parte de la endotoxina de la muestra.

El enzima, una vez activado, es capaz de hidrolizar un sustrato peptídico liberando p-nitroanilina, que se mide espectrofotométricamente a 405 nm:



Tiempos de muestreo

Los tiempos de muestreo fueron desde 15 minutos en aquellos lugares donde se esperaba que la contaminación por endotoxinas fuese alta (explotación porcina), hasta 60 minutos en áreas correspondientes al sector servicios, donde tal y como se esperaba la concentración de endotoxinas resultó muy baja.

Lugares de muestreo para viables y endotoxinas

Se tomaron muestras en 78 puntos pertenecientes a diferentes empresas que se pueden agrupar en:

- Sector primario e industrial:
 - Una empresa de *catering* en dos plantas sitas en lugares distintos.
 - Una explotación de ganado vacuno.
 - Una explotación porcina.
 - Una empresa productora de piensos.
- Sector servicios:
 - Oficinas de una empresa de distribución.
 - Oficinas bancarias.
 - Oficinas de una empresa de servicios.

A la hora de escoger los puntos concretos de muestreo se trató de elegir las zonas más representativas del desarrollo de la actividad laboral de los trabajadores, y donde procediese se tomaron también muestras de viables en el exterior como referencia.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos, distribuidos en seis tablas que corresponden a los seis ambientes ocupacionales muestreados (Tablas I-VI).

Los resultados se expresan en el caso de los microorganismos viables como «unidades formadoras de colonias por m³ de aire muestreado» (UFC/m³).

La concentración de endotoxinas se expresa como EU (unidades de endotoxina) por m³ de aire muestreado.

**TABLA I. Sector servicios.
Empresa de servicios**

Muestra	Viables	Endotoxinas
1	104	< 3,65
2	70	< 3,79
3	43	< 3,79
4	77	< 8,33
5	50	< 7,25
6	43	< 8,33
7	23	∅
Exterior	220	< 3,79

**TABLA II. Sector servicios.
Empresa de distribución**

Planta	Muestra	Viables	Endotoxinas
Planta A	1	125	< 8,19
	2	30	< 8,19
	3	160	< 7,25
	4	40	< 7,25
	Exterior	220	∅
Planta B	1	104	< 8,06
	2	207	< 7,81
	3	140	< 7,81
	4	200	< 8,90
	5	157	< 7,81
	Exterior	180	∅
	7	63	< 7,69
	8	73	< 7,81
	9	56	< 7,81
	10	107	< 7,69
	11	110	< 7,81
	12	134	< 7,69
	13	176	< 7,69
	14	110	< 7,81
	Exterior	463	∅

∅: no se tomó muestras de endotoxinas.

Viables: recuento de placas de PCA + agar con extracto de malta.

Empresa de *catering*

Aquí tan sólo se tomaron muestras de aire para el análisis del número de viables, en 15 puntos de la nave más dos puntos en el exterior.

El nivel más alto se encontró en una zona de pelado automático de patata con 580 UFC/m³.

Los otros 14 puntos del muestreo exhiben una media de 142 UFC/m³.

En otra planta de *catering* se muestreó en siete puntos más el exterior. El valor más alto corresponde al obrador de frutas y verduras con 880 UFC/m³, el resto presenta una media de 175 UFC/m³. En el exterior se encontró 99 UFC/m³.

Puede llamar la atención el hecho de que aparezcan valores de endotoxinas «menor de» diferentes cifras. Evidentemente el límite de detección de la técnica no es variable, estableciéndose éste en 0,1 EU/mL. La diferencia aparece cuando trans-

**TABLA III. Sector servicios.
Oficinas bancarias**

Edificio	Muestra	Viables	Endotoxinas
Edificio A	1	17	< 7,94
	2	200	< 7,57
	3	123	< 7,94
	4	206	< 7,57
	5	53	< 7,94
	6	210	< 7,57
	Exterior	696	∅
	7	200	< 8,06
	8	320	< 7,69
	9	100	< 7,69
	10	76	< 8,06
	11	157	< 8,06
Edificio B	1	160	∅
	2	220	∅
	3	157	∅
	Semiexterior	683	∅
Edificio C	1	60	< 8,33
	2	163	< 7,25
	3	90	< 8,33
Edificio D	1	33	< 7,25
	2	23	< 7,25
	3	140	< 8,33

**TABLA IV. Sector primario.
Empresa productora de piensos**

Muestra	Viables	Endotoxinas
1	231	17
2	864	102
3	651	560
4	∅	697
5	622	60
6	757	36
Exterior 1*	140	∅
Exterior 2**	1.273	∅

* Aire que por la dirección del viento, aún no había pasado por la planta.

** Aire que sí había pasado por la planta.

ENDOTOXINAS

Rango: 17-697

Media: 245

**TABLA V. Sector primario.
Explotación porcina**

Muestra	Viables	Endotoxinas
1	> 50.000	13.709
2	"	10.869
3	"	5.000
4	"	6.000
5	"	1.785
6	"	2.173
7	"	5.000
8	"	1.562
9	"	22.666
10	"	9.666
11	"	8.666
12	"	9.975

ENDOTOXINAS

Rango: 1.562-22.666

Media: 8.090

formamos nuestros resultados de EU/mL a EU/m³, considerando que el volumen muestreado no es siempre el mismo.

DISCUSIÓN

- El papel de las endotoxinas en la patología pulmonar, inmunógena, fiebre, etc. justifica el interés en el desarrollo de una metodología adaptada para la medida de este parámetro en ambientes laborales, así como la valoración del nivel de las mismas en este entorno para establecer el riesgo biológico que representan para el trabajador.

- En una primera aproximación hay que establecer qué ambientes son de riesgo en nuestro entorno, comparándolo con la medida de viables en el aire, un parámetro más clásico y conocido.

- En ambientes de oficina el nivel de endotoxinas fue indetectable y el de viables muy bajo también. De hecho, había una mayor concentración de viables en el exterior de los edificios muestreados.

En cuanto al sector industrial, el panorama cambia dependiendo del tipo de industria analizada.

- La literatura consultada indica que son las explotaciones porcinas y las de aves de corral las que presentan típicamente las concentraciones

**TABLA VI. Sector primario.
Explotación bovina**

Planta	Muestra	Viables	Endotoxinas
Planta A	1	3.785	3.427
	2	1.100	384
Planta B	1	4.105	543
	2	2.250	543
	3	4.885	1.210
Planta C	1	1.330	937
	2	8.810	2.292
	3	2.490	31
	4	870	187
	5	2.610	517
Planta D	1	1.700	284
	2	5.940	194
	3	2.460	193
	4	3.210	34
	5	3.610	448
	6	2.710	210

ENDOTOXINAS

Rango: 31-3.427

Media: 715

más altas de endotoxinas (1). Efectivamente, nosotros encontramos en la granja de cerdos estudiada niveles de endotoxinas diez veces superior a la encontrada en la explotación bovina.

- A la hora de comparar nuestros valores con los de otros autores, topamos con la falta de estandarización ya mencionada. Trabajos realizados hace una década (2, 3) expresaban sus resultados en µg/m³ y son difícilmente comparables. Las enzimas son siempre medidas por sus actividades catalíticas, los resultados de tales determinaciones se expresan en términos de número de unidades de actividad en un cierto volumen o masa, y no hay que olvidar que estamos midiendo actividad enzimática. Por lo tanto, dado que idénticos «pesos» de endotoxinas pueden tener diferentes potencias con distinta capacidad para crear reacciones pirogénicas, la FDA desarrolló en 1987 «unidades de endotoxina/mL» para estandarizar la potencia de endotoxina (estándar EC-5).

- En **explotación porcina**, nosotros obtuvimos una media de 8.090 EU/m³ con un rango de 1.562 EU/m³ a 22.666 EU/m³ en un total de 12 puntos muestreados.

Estos resultados son asimilables a los obtenidos por Simpson *et al.* en 1999 (4), media de

6.600 EU/m³ con un rango de 4.000 a 10.000 EU/m³ utilizando muestreo personal. A este respecto, nosotros hemos llegado a la conclusión de que dado el alto nivel de endotoxinas encontrado en todos los puntos de las distintas naves muestreadas, no merece la pena realizar muestreo personal.

En la misma línea están los resultados de Zejda *et al.* en 1994 (5), que en un estudio más amplio que abarcó a 46 granjas de cerdos en Canadá, obtuvo una media de 11.443 EU/m³ con un rango de 438 a 41.307 EU/m³.

En concordancia con los niveles de endotoxinas está el número de viables/m³ que en todos los casos superan las 50.000 UFC/m³.

- Con respecto a la **explotación bovina**, nosotros obtuvimos unos valores de endotoxinas que oscilaban entre 31 y 3.427 EU/m³, con una media de 715 EU/m³.

Caroline Duchaine *et al.*, en 1999 (6), midió, entre otros parámetros, los niveles de endotoxinas en 37 granjas de vacas. Aunque su estudio iba enfocado en otro sentido y su metodología de análisis también es diferente (ya se ha comentado aquí la falta de estandarización existente), sus resultados pueden resultar orientativos.

Ella obtiene cifras que van desde 349 EU/m³ hasta 8.350 EU/m³ con medias cercanas a 1.500 EU/m³. Los autores del mencionado trabajo encuentran estos valores muy altos y lo atribuyen al manejo y manipulación del heno y la paja durante el muestreo, y no creen que representen los niveles medios durante el día, sino más bien picos de contaminación.

Nuestros resultados corresponden a muestras que fueron tomadas en diferentes zonas, muchas de ellas no relacionadas con el manejo de heno o paja. Por lo tanto, nuestros resultados así como los de otros autores (Kullman *et al.*, 1998 [7] media de 647 EU/m³ con un rango de 25,4 a 34.800 EU/m³; Andersen *et al.*, 1989 [8] media de 740 EU/m³ en 28 vaquerías suecas) corroboran las cifras encontradas por Caroline Duchaine y nosotros mismos como habituales en este tipo de explotación.

Por otro lado, dependiendo de las zonas y actividades, los niveles de endotoxinas en algunas ocasiones no superan los límites descritos, aún con la variabilidad existente (30 ng/m³ para Deschamps *et al.*, 1994 [9]; 10 ng/m³ para Castellan *et al.*, 1987 [10]; 90 EU/m³ se cita en dos trabajos: Cinkotai *et al.*, 1977 [11] y Smid *et al.*, 1994 [12]; 45 EU/m³ para Milton *et al.*, 1996 [13], por citar algunos) en cuanto al margen tolerable para la salud, por lo que en este tipo de explotaciones estaría indicado un muestreo personal.

Además el número de viables/m³ no nos sirve de indicativo de lo que nos vamos a encontrar en niveles de endotoxinas (ejemplo: punto 2_ 1.100 UFC/m³ con 384 EU/m³; punto 3_ 2.490 UFC/m³ endotoxinas 31 EU/m³).

- En lo que a la **fábrica de piensos** se refiere, se tomaron seis muestras para análisis de endotoxinas. La media obtenida fue de 245 EU/m³ con un rango de 17 a 697 EU/m³.

La muestra con mayor nivel de endotoxinas corresponde a una zona junto a la ensacadora donde más se remueve el pienso.

En 1999 Simpson (4) *et al.*, en un muestreo personal, obtienen valores muy equiparables, con una media en torno a 300 EU/m³ y un rango de 110 a 800 EU/m³.

Por otro lado, y aunque no aparezcan en los resultados de viables (que son la suma de lo obtenido con las placas de PCA y Agar con extracto de malta), se midieron también las viables que crecían en las placas de actinomyces. Los resultados obtenidos son lo suficientemente altos como para ser considerados en muestreos de viables realizados en este tipo de industria.

- Los valores de viables obtenidos en la **empresa de catering** son los suficientemente bajos como para hacernos pensar que no encontraremos niveles significativos de endotoxinas

- A la vista de los resultados obtenidos se podría decir que aunque no existe correlación entre los resultados de viables y los de endotoxinas, sí se puede afirmar que con cifras bajas de viables (orientativamente por debajo de 500 UFC/m³) no se considera la búsqueda de endotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ZEJDA J E, DOSMAN J A. Respiratory disorders in agriculture. *Tuber Lung Dis*, 1993; 74: 74-86.
2. CLARK S, RYLANDER R, LARSSON L. Airborne bacteria, endotoxin, fungi in dust in poultry and swine confinement buildings. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1983; 44 (7): 537-541.
3. DONHAM K, HAGLIND P, PETERSON Y, RYLANDER R, BELIN L. Environmental and health studies of farm workers in Swedish swine confinement buildings. *Br J Ind Med*, 1989; 46: 31-37.
4. SIMPSON J C G, NIVEN R M, PICKERING C A C, ODHAM L A, FLETCHER A M, FRANCIS H C. Comparative personal exposures to organis dusts and endotoxin. *Am Occup Hyg*, 1999; 43 (2): 107-115.
5. ZEJDA J E, BARBER E, DOSMAN J A, OLENCHOCK S A, MCDUFFIE H H, RHODES C, HURST T. Respiratory health status in swine producers relates to endotoxin exposure in the presence of low dust levels. *J Occup Med*, 1994; 36 (1): 49-56.

6. DUCHAINE C, MÉRIAUX A, BRUCHU G, CORMIER Y. Air-borne microflora in Québec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1999; 60: 89-95.
 7. KULLMAN G J, THORNE P S, WALDRON P F, MARX J J, AULT B, LEWIS D M, SIEGEL P D, OLENCHOCK S A, MERCHANT J A. Organic dust exposures from work in dairy barns. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1998; 59: 403-413.
 8. ANDERSEN A R, MALMBERG P, LUNDHOLM M. Endotoxin levels in farming: absence of symptoms despite high exposure levels. *Br J Ind Med*, 1989; 46: 412-416.
 9. DESCHAMPS S, MOMAS I, FESTY B. Quelques aspects du risque professionnel lié à l'inhalation d'endotoxines. *Arch mal prof*, 1994; 55 (5): 327-333.
 10. CASTELLAN R M, OLENCHOCK S A, KINSLEY K B, HANKINSON J L. Inhaled endotoxin and decreased spirometric values. *N Engl J Med*, 1987; 317 (10): 605-610.
 11. CINKOTAI F F, LOCKWOOD M G, RYLANDER R. Airborne microorganisms and prevalence of byssinotic symptoms in cotton mills. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1977; 38: 554-559.
 12. SMID T, HEEDERIK D, HOUBA R, QUANJER P H. Dust and endotoxin related acute lung function changes and work-related symptoms in workers in the animal feed industry. *Am J Ind Med*, 1994; 25: 877-888.
 13. MILTON D K, WYPIJ D, KRIEBEL D, WALTERS M D, HAMMOND S K, EVANS J S. Endotoxin exposure-response in a fiberglass manufacturing plant. *Am J Ind Med*, 1996; 29 (1): 3-13.
-