

# Metodología de evaluación de riesgos laborales por exposición a endotoxinas (\*)



## SUMARIO

*Ante la necesidad de evaluar la exposición a agentes biológicos en ambientes laborales, las endotoxinas aparecen como un importante parámetro a medir, dado que es innegable su relación con patología pulmonar y alérgica, y que, por otra parte, está presente en muchos ambientes distintos (explotaciones agrarias, porcinas, bovinas, aves de corral, empresas de mecanizado, ambientes de oficinas, etc.).*

*El reto para los investigadores en este campo consiste en lograr estandarizar el estudio de endotoxinas (muestreo, procesamiento y análisis).*

*El objetivo del presente estudio es aportar datos en la fase preanalítica que ayuden a estandarizar esta parte de su estudio, así como presentar resultados en una gran variedad de ambientes laborales.*

**Palabras clave:** Endotoxinas, preanalítica, ambientes laborales.

LORENA SALAZAR  
JUAN CARLOS UGARTE  
MARISA SECO  
VICENTE PABLO  
MARÍA JESÚS IRIARTE

*Área de Laboratorio. Departamento de Salud Laboral. Lagunaro. Mondragón Servicios S. Coop. (Guipúzcoa)*

## INTRODUCCIÓN

La relación entre las endotoxinas, complejas moléculas de la pared de las bacterias gramnegativas, tipo polisacárido-proteínas, y el desarrollo de efectos respiratorios adversos, así como de reacciones alérgicas ocupacionales, como la bisinosis, está cada

(\*) Este artículo es el resumen del trabajo presentado a la Fundación MAPFRE como resultado final de la investigación desarrollada a raíz de una beca concedida por la Fundación en la Convocatoria 1999-2000.

vez más establecido por los investigadores (1-4).

La base fisiológica de esta relación parece estar en la liberación intrapulmonar de citoquinas (como el factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina (IL) - 1 $\beta$  e IL - 8) tras la inhalación de lipopolisacáridos, que a su vez atraen al alvéolo pulmonar a neutrófilos (5-7).

Estos efectos negativos sobre la salud han motivado la preocupación de la comunidad científica ligada a estudios en ambientes laborales por establecer unos límites en los niveles ambientales de endotoxinas (8-11).

Sin embargo, la falta de estandarización, que ya se apuntaba en varios artículos (12-14), es hoy una triste realidad a tenor de los resultados presentados por Chun *et al.*, 2000 (15) y Chun *et al.*, 2002 (4). En un estudio interlaboratorios, en el que participaron laboratorios de Canadá, Estados Unidos, Suecia, Finlandia, Bélgica y Dinamarca, que «habitualmente» realizan análisis de endotoxinas, ni siquiera utilizando el mismo protocolo de extracción y el mismo kit de ensayo (Kinetic-QCL de BioWhittaker), se obtuvieron resultados comparables entre los distintos laboratorios (4).

Por lo tanto, mientras no se consiga estandarizar el estudio de endotoxinas, difícilmente podremos hablar de límites tolerables para la salud.

En el estudio multilaboratorio mencionado, los investigadores parten de filtros ya cargados, con aproximadamente la misma cantidad de polvo de algodón. Antes de llegar al filtro para analizarlo hay que pasar por una fase preanalítica con una gran cantidad de factores que son fuente de variabilidad. Es aquí donde nuestro estudio trata de aportar datos que puedan resultar de utilidad. Asimismo presentamos los datos obtenidos en las mediciones ambientales de endotoxinas en 12 empresas diferentes, valorando de esta manera un gran número de ambientes laborales distintos.

Tratamos de respondernos a preguntas tales como:

- Si se puede sustituir el portafiltros de acero inoxidable, apirogenizable pero incómodo, por los habituales casetes de estireno utilizados en higiene.
- Cómo se comportará este soporte.
- ¿Se puede utilizar este mismo soporte para el transporte al laboratorio?
- ¿Podemos sustituir en el transporte los tubos de vidrio, apirogenizables pero más fácilmente rompibles, por tubos de polipropileno?
- Cuando manipulamos un filtro «cargado» de endotoxinas con unas pinzas (por ejemplo, para meterlo en

un tubo de vidrio para su extracción), ¿existe *carryover* o arrastre entre una muestra y la siguiente vehiculizado por dichas pinzas?

Para poder obtener réplicas de una muestra utilizamos en el punto de muestreo un trípode con dos soportes para dos bombas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Filtros

Nosotros optamos por filtros de fibra de vidrio (Millipore Corp., Estados Unidos). En varios estudios parecen obtenerse mejores resultados con este tipo de filtro (16, 17). En cualquier caso es un tipo de filtro escogido por muchos laboratorios (18).

### Portafiltros

Utilizamos tanto casetes de estireno como portafiltros de acero inoxidable apirogenizables, ambos de la casa Millipore.

### Bombas

Las bombas de muestreo se calibraron a un flujo de 2 l/min. En todos los casos, antes y después del mues-

treo, se verificó el caudal de las bombas mediante un calibrador de flujo.

### Tiempos de muestreo

Los tiempos de muestreo oscilaron entre 15 minutos y una hora, dependiendo del nivel de endotoxinas que esperábamos encontrar.

### Transporte del filtro al laboratorio

Dicho transporte se realizó o bien en el propio casete de estireno, o bien en tubos de vidrio previamente apirogenizados. Como parte de las pruebas realizadas, también transportamos los filtros en tubos de polipropileno.

Cuando la extracción no se realizaba nada más llegar al laboratorio, los filtros eran congelados en tubos de vidrio apirogenizados.

### Solución extractante y extracción

Consistió en agua apirógena con Tween 80 al 0,05 por ciento, 5 ml por filtro. Para la extracción probamos con agitación vigorosa durante 1 hora a temperatura ambiente en unos casos, y en otros, baño de ultrasonidos durante 1 hora evitando el calentamiento excesivo en otros. A continuación se centrifugó durante quince minutos a 1.000 g.

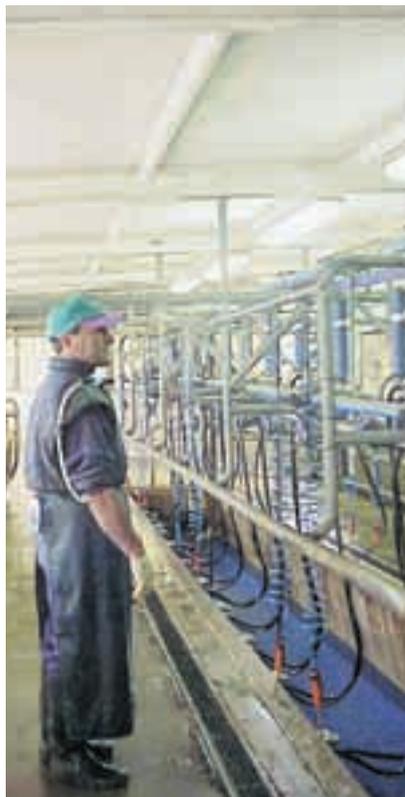
### Análisis

Se utilizó el test cromogénico LAL a punto final (QCL-1000 BioWhittaker, Inc.). El estándar que proporcionaba el kit estaba valorado frente al EC-6. Los resultados se expresaron como EU (unidades de endotoxina) por m<sup>3</sup> de aire muestreado (12, 15).

### Lugares de muestreo

Los ambientes laborales escogidos para la toma de muestras fueron (ver Tablas 1 a 10):

- Una explotación porcina.
- Una explotación de conejos.
- Una explotación bovina.
- Dos plantas de mecanizado.
- Una planta productora de piensos.
- Un vivero de marisco.
- Una conservera de anchoas.
- Un matadero de reses.
- Un matadero de aves.
- Una granja de gallinas ponedoras.



**TABLA 1. Explotación porcina.**

Muestra	Endotoxinas
1	874
2	959
3	1.822
4	2.216
5	1.106
6	1.187
7	1.762
8	2.396
9	711
10	454
11	564
12	922
13	8.359
14	7.661
15	15.198
16	13.596
17	3.081
18	6.400
19	4.700
20	5.943

**TABLA 2. Explotación de conejos.**

Muestra	Endotoxinas
1	30
2	18
3	72
4	23
5	140
6	125
7	3.184
8	3.476

**TABLA 3. Explotación bovina.**

Muestra	Endotoxinas
1 (*)	272
2 (*)	303
3	82
4	34
5	7.390
6	6.433

(\*) Corresponden a muestreos personales.

**RESULTADOS**

La primera prueba que nos planteamos fue si podríamos sustituir el portafiltras metálico (apirrogenizable pero más pesado e incómodo) por casetes de estireno habitualmente utilizados en higiene.

En principio, aunque no se indica que el material sea apirógeno, por las características de fabricación y empaque, es de esperar que sea un material libre de endotoxinas. Para verificar esto, cargamos varios casetes de es-

**TABLA 4. Mecanizado de piezas.**

Muestra	Endotoxinas
Planta A	
1	662
2	401
3	1.641
4	1.044
5	741
6	544
7	390
8	245
Planta B	
1	1.074
2	1.310
3	4.469
4	2.348
5	3,4
6	3,1
7	272
8	269

**TABLA 5. Empresa productora de piensos.**

Muestra	Endotoxinas
1	7.753
2	1.042
3 (*)	680
4	1.017
5	644

(\*) Corresponde a muestreo personales.

**TABLA 6. Viveros de marisco.**

Muestra	Endotoxinas
1	25
2	24
3	15
4	17
5	26
6	28
7	21

**TABLA 7. Conservera de anchoas.**

Muestra	Endotoxinas
1	9
2	38
3	14
4	11
5	5
6	5
7	159

tireno con los filtros de fibra de vidrio y los dejamos veinticuatro horas a temperatura ambiente, simulando lo que ocurre en la realidad, es decir, que se

**TABLA 8. Matadero de reses.**

Muestra	Endotoxinas
1	552
2	443
3	758
4	809
5	466
6	944
7	102
8	172
9	167
10	133
11	23
12	31

**TABLA 9. Matadero de aves.**

Muestra	Endotoxinas
1	21.809
2	13.333
3	1.333
4	363
5	50.000
6	>50.000

**TABLA 10. Granja de gallinas ponedoras.**

Muestra	Endotoxinas
1	176
2	205
3	712
4	653
5	439
6	627

deja el día anterior al muestreo todo el material preparado. Posteriormente los pasamos a tubos de vidrio para su procesamiento.

*Resultados:* en todos los casos, el nivel de endotoxinas detectado fue inferior a 0,1 EU/ml.

Una vez demostrado que el portafiltras de plástico no aporta endotoxinas, nos preguntamos cómo se comporta este soporte frente al de acero inoxidable. Para responder a esta cuestión se obtuvieron varias muestras emparejadas (en un soporte sobre el mismo trípode); en un extremo colocamos el portafiltras de plástico, y en el otro, el de acero inoxidable.

Conviene apuntar que nunca partimos de dos filtros con exactamente la misma concentración, aun estando muy cercanas las muestras. Esto es aplicable a todas las muestras comparadas del mismo modo.

*Resultados:* Los valores obtenidos fueron:

Muestra	P.P. (EU/m <sup>3</sup> )	P.M. (EU/m <sup>3</sup> )
1	25	24
2	11	14
3	23	31

P.P.: portafiltras de plástico.  
P.M.: portafiltras de metal.

La siguiente cuestión lógica en el desarrollo de un muestreo es el **transporte del filtro al laboratorio**. Sería interesante saber si estos mismos portafiltras, cargados con el filtro utilizado en el muestreo, podrían ser el medio de transporte (tapados con sus propios tapones), sin tener que pasar el filtro a un tubo de vidrio en el punto de muestreo.

Utilizamos el mismo sistema del trípode para obtener muestras emparejadas. Una se pasó a un tubo de vidrio apirogenizado, y la otra se transportó en el propio portafiltras de plástico.

**Resultados:** los valores obtenidos fueron:

Muestra	P.P. (EU/m <sup>3</sup> )	T.V. (EU/m <sup>3</sup> )
1	28	26
2	5	5
3	944	466
4	13.333	21.809

P.P.: portafiltras de plástico.  
T.V.: tubo de vidrio.

También nos planteamos la posibilidad de utilizar **tubos de plástico (polipropileno) estériles para el transporte** en lugar de tubos de vidrio, apirogenizables pero más fácilmente rompibles.

Para ello era preciso demostrar primero que los tubos estériles de polipropileno no aportaban contaminación de endotoxinas. Para ello se pasaron cuatro filtros apirogenizados a sendos tubos de plástico. Se les tuvo media hora a temperatura ambiente y se les pasó a tubos de vidrio para su procesamiento.

**Resultados:** En todos los casos el nivel de endotoxinas detectado fue inferior a 0,1 EU/ml.

Tras el muestreo, un filtro de un extremo del trípode se pasó a un tubo de plástico, y el otro, a uno de vidrio apirogenizado.

**Resultado:** Los valores obtenidos fueron:

Muestra	T.P. (EU/m <sup>3</sup> )	T.V. (EU/m <sup>3</sup> )
1	17	15
2	anulada	anulada
3	809	758

T.P.: tubo de plástico.  
T.V.: tubo de vidrio.

Para la manipulación de los filtros (por ejemplo, para pasar los filtros a un tubo de vidrio apirogenizado para su extracción) empleamos pinzas de acero inoxidable también apirogenizadas.

Nos interesó averiguar si, tras manipular un filtro «cargado» de endotoxinas, las pinzas podían contaminar la muestra siguiente, es decir, si existe *carryover* o arrastre entre una muestra y la siguiente vehiculizado por las pinzas.

Tras manipular filtros obtenidos en el muestreo de la explotación porcina (alto nivel de endotoxinas), manipulamos seguidamente filtros blancos, que fueron procesados para su análisis.

**Resultados:** Los valores obtenidos oscilaron entre 3,37 y 3,5 EU/filtro.

Se trataría ahora de saber si flameando las pinzas tras la manipulación eliminamos la contaminación, o si se debería optar por algún sistema desechable.

Se utilizaron cinco filtros procedentes de una granja de gallinas ponedoras, pero debido a problemas con uno de ellos finalmente valoramos 4. Tras pasar cada filtro a un tubo de vidrio, se flameaba la pinza y se manipulaba otro filtro «blanco», que también era almacenado para su procesamiento.

**Resultados:** Los valores obtenidos fueron:

Muestra	Filtro sucio (EU/m <sup>3</sup> )	Filtro blanco (EU/filtro)
1	176	<0,5
2	205	<0,5
3	712	<0,5
4	627	<0,5

Con respecto a la fase de extracción de las endotoxinas del filtro, también probamos si había diferencias entre procesarlas en un tubo de vidrio frente al tubo de plástico. Para ello se emplearon muestras que se habían recogido y transportado de igual manera hasta el momento de su procesamiento.

**Resultados:** Los valores obtenidos fueron:

Muestra	T.P. (EU/m <sup>3</sup> )	T.V. (EU/m <sup>3</sup> )
1	1.074	1.310
2	4.469	2.348
3	3,4	3,1
4	272	269
5	102	172

Finalmente, resultaba muy laborioso el proceso de extracción de las en-

dotoxinas del filtro con agitación vigorosa de una hora. La casa que nos suministra el kit de endotoxinas nos comentó la posibilidad de usar un baño de ultrasonidos para este proceso. Ahora bien, tiene el inconveniente de que se calienta el tubo, lo que es contraproducente.

Probamos a comparar muestras emparejadas y solventamos el problema del calentamiento del tubo en el baño de ultrasonidos cambiando periódicamente el agua del baño.

**Resultados:** Los valores obtenidos fueron:

Muestra	Agitación	Ultrasonidos
1	1.822	2.216
2	1.106	1.187
3	1.762	2.396
4	30	18
5	72	23
6	140	125
7	3.184	3.467
8	82	34
9	7.390	6.433

## DISCUSIÓN

– Con respecto a la posibilidad de utilizar los casetes de Poliestireno como portafiltras, podemos decir, a la vista de los resultados, que:

- Los Portafiltras de poliestireno Millipore no aportan ninguna contaminación de endotoxinas.
- Se pueden preparar los portafiltras cargados con los filtros al menos veinticuatro horas antes.

– Como se puede deducir de los resultados obtenidos comparando el soporte de acero inoxidable con el casete de poliestireno, no hay diferencias significativas entre el uso de uno y otro material.

– En lo que se refiere a utilizar el mismo casete del muestreo para el transporte de filtro al laboratorio, los resultados de las cuatro muestras no fueron concluyentes.

– La utilización de tubos de polipropileno estériles para el transporte en lugar de tubos de vidrio apirogenizables parece factible a la vista de los resultados. De hecho, este tipo de tubos son usados en el estudio de Chun *et al.* 2000 (15).

– Resulta novedoso en nuestro estudio apuntar la existencia de *carryover* o arrastre entre un filtro «cargado» de endotoxinas y el siguiente filtro manipulado por las mismas pinzas, que inicialmente estaban apirogenizadas.

Ahora bien, la pregunta siguiente sería si supone mucha interferencia

esas 3,5 EU por filtro. No hay que olvidar que los resultados se expresan referenciando las EU al volumen de aire muestreado. Con las bombas que utilizamos, que dan unos 2 l/min, en un muestreo estándar de quince minutos (tiempo empleado para lugares con previsible alta carga de endotoxinas), esas 3,5 EU supondrían unas 100 EU/m<sup>3</sup>. Esta cifra en algunos ambientes (como explotaciones porcinas, bovinas, etc.) no supone mucho, pero no es así entre otros casos, como oficinas, por ejemplo.

De la misma manera, resulta muy interesante comprobar que un gesto tan simple como es el flamear las pinzas elimina el problema de dicha contaminación.

– Con respecto a procesar el filtro en el propio tubo de polipropileno en lugar del tubo de vidrio apirogenizado, decir que los resultados no resultan concluyentes, como tampoco lo son los referentes al proceso de extracción (agitación vs. ultrasonidos).

– Con respecto a los resultados obtenidos en los muestreos de diferentes ambientes laborales, podemos ver resultados muy dispares en la **explotación bovina**. Los resultados de las muestras 5 y 6 son considerablemente más altos que el resto. Corresponde a tomas ambientales en el momento en el que estaban realizando una carga de pienso (alfalfa, pulpa de remolacha, algodón) desde un almacén a una mezcladora. Podemos afirmar, por lo tanto, que este proceso es uno de los de mayor exposición a endotoxinas, y podría resultar interesante que, mientras dura dicha maniobra, los operarios llevaran mascarilla.

– En la **explotación porcina**, encontramos, en general, valores más bajos que los encontrados por nosotros (19) en un estudio anterior en la misma explotación porcina. La explicación podría estar en que en esta ocasión, y a diferencia de la anterior, existía personal contratado exclusivamente para realizar labores de limpieza.

– En la **explotación de conejos** no encontramos valores altos (exceptuando las muestras emparejadas 7 y 8, donde no encontramos una explicación que justifique valores tan altos). En general, éste es un tipo de actividad que requiere un gran cuidado de los animales y del entorno.

– El matadero de aves, tal y como aparece en la bibliografía existente (14, 20), se confirma como uno de los ambientes con mayor nivel de endotoxinas. También aparecen con niveles apreciables el matadero de reses y la granja de gallinas ponedoras.



– Nuestro estudio es el primero que presenta resultados en ambientes diferentes de los habitualmente estudiados, como son los viveros de marisco y una conservera de pescado. Los resultados obtenidos indican, como podía suponerse, que no son ambientes de riesgo en cuanto a endotoxinas se refiere.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) WOSKIE, S. R.; ABBAS VIRJI, M.; KRIEBEL, D.; SAMA, S. R.; EBERIEL, D.; MILTON, D. K.; HAMMOND, S. K. y MOURE-ERASO, R.: «Exposure assessment for a field investigation of the acute respiratory effects of metalworking fluids. I. Summary of findings», *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1996; 57: 1154-1162.
- (2) RYLANDER, R.; BAKE, B.; FISCHER, J. J. y HELANDER, I. M.: «Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin», *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989; 140: 981-986.
- (3) KENNEDY, S. M.; CHRISTIANI, D. C.; EISEN, E. A.; WEGMAN, D. H.; GREAVES, I. A.; OLENCHOCK, S. A.; YE, T. T. y LU, P. L.: «Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers», *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1987; 135: 194-200.
- (4) CHUN, D. T. W.; CHEW, V.; BERLETT, K.; GORDON, T.; JACOBS, R. R.; LARSSON, B. M.; LEWIS, D. M.; LIESIVOURI, J.; MICHEL, O.; RYLANDER, R.; THORNE, P. S.; WHITE, E. M.; GUNN, V. C. y WÜRTZ, H.: «Second inter-laboratory study comparing endotoxin assay results from cotton dust», *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2002, 9: 49-53.
- (5) WESSELIUS, L. J.; NELSON, M. E.; BEILEY, K. y O'BRIEN-LADNER, A.: «Rapid lung cytokine accumulation and neutrophil recruitment after lipopolysaccharide inhalation by cigarette smokers and nonsmokers», *J. Lab. Clin. Med.*, 1997; 129 (1): 106-114.
- (6) CLAPP, W. D.; BECHER, S.; QUAY, J. y WATT, J. L.: «Grain dust-induced airflow obstruction and inflammation of the lower respiratory tract», *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1994; 150: 611-617.
- (7) JAGIELO, P. J.; THORNE, J. L.; WATT, J. L. y FREES, K. L.: «Grain dust and endotoxin inhalation produce similar physiologic

and inflammatory responses in normal subjects», *Chest*, 1966; 110: 263-270.

- (8) RYLANDER, R.; HAGLIND, P. y LUDHOLM, M.: «Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton workers in an experimental card room», *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985; 131: 209-213.
- (9) CASTELLAN, R. M.; OLENCHOCK, S. A.; KINSLEY, K. B. y HANKINSON, J. L.: «Inhaled endotoxin and decreased spirometric values», *N. Engl. J. Med.*, 1987; 317 (10): 605-610.
- (10) DESCHAMPS, S.; MOMAS, I. y FESTY, B.: «Quelques aspects du risque professionnel lié à l'inhalation d'endotoxines», *Arch. mal. prof.*, 1994; 55 (5): 327-333.
- (11) MILTON, D. K.; WYPIJ, D.; KRIEBEL, D.; WALTERS, M. D.; HAMMOND, S. K. y EVANS, J. S.: «Endotoxin exposure-response in a fiberglass manufacturing plant», *Am. J. Ind. Med.*, 1996; 29 (1): 3-13.
- (12) THORNE, P. S.; REYNOLDS, S. J.; MILTON, D. K.; BLOEBAUM, P. D.; ZHANG, X.; WHITTEN, P. y BURMEISTER, L. F.: «Field evaluation of endotoxin air sampling assay methods», *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1997; 58: 792-799.
- (13) MILTON, D. K.; JOHNSON, D. K. y PARK, J.: «Environmental endotoxin measurement: interference and sources of variation in the Limulus Assay of house dust», *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1997; 58: 861-867.
- (14) SIMPSON, J. C. G.; NIVEN, R. M.; PICKERING, C. A. C.; ODHAM, L. A.; FLETCHER, A. M. y FRANCIS, H. C.: «Comparative personal exposures to organic dusts and endotoxin», *Am. Occup. Hyg.*, 1999; 43 (2): 107-115.
- (15) CHUN, D. T. W.; CHEW, V.; BARLETT, K.; GORDON, T.; JACOBS, R. R.; LARSSON, B. M.; LARSSON, L.; LEWIS, D. M.; LIESIVOURI, J.; MICHEL, O.; MILTON, D. K.; RYLANDER, R.; THORNE, P. S.; WHITE, E. M. y BROWN, M.: «Preliminary report on the result of the second phase of a round-robin endotoxin assay study using cotton dust», *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 2000; 15 (1): 152-157.
- (16) DOUWES, J.; VERSLOOT, P.; HOLLANDER, A.; HEEDERIK, D. y DOEKES, G.: «Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin», *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61 (5): 1763-1769.
- (17) LAITINEN, S. K.: «Importance of sampling, extraction and preservation for the quantitation of biologically active endotoxin», *Am. Agric. Environ. Med.*, 1999; 6: 33-38.
- (18) CHUN, D. T. W.; HARRISON, R. E. y CHEW, V.: «Second collection of card-generated, vertically elutriated dust for comparison endotoxin assays», *J. Cot. Sci.*, 1999; 3: 177-182.
- (19) IRIARTE, M. J.; UGARTE, J. C. y SALAZAR, L.: «Utilidad de la determinación de endotoxina en diferentes ambientes laborales como indicador de riesgo por agentes biológicos», *Mapfre Medicina*, 2001; 12: 234-240.
- (20) CALRK, S.; RYLANDER, R. y LARSSON, L.: «Airborne bacteria, endotoxin, fungi in dust in poultry and swine confinement buildings», *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1983; 44 (7): 537-541.