

La EVALUACIÓN de la CONTAMINACIÓN HONGOS

LOS GLUCANOS Y EL ERGOSTEROL COMO ALTERNATIVA

La inhalación de partículas de origen fúngico puede producir efectos sobre la salud de trabajadores de distintos sectores. Ante la falta de métodos satisfactorios para evaluar la contaminación fúngica del aire, actualmente se ensayan métodos alternativos basados en el uso de marcadores como el ergosterol y los glucanos, que arrojan resultados prometedores.

Por **ROSANA LÓPEZ ARROYO** (TRABAJO PRESENTADO A LA FUNDACIÓN MAPFRE COMO RESULTADO FINAL DE LA INVESTIGACIÓN DESARROLLADA DURANTE EL AÑO 2003 A RAÍZ DE LA BECA CONCEDIDA POR LA FUNDACIÓN MAPFRE EN LA CONVOCATORIA 2003-2004)



FÚNGICA en el TRABAJO EN EL AIRE

A LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN TRADICIONALES

En el aire pueden existir diferentes tipos de contaminantes, entre los que se encuentran los de origen biológico. Estos contaminantes pueden tener graves implicaciones sobre la salud de las personas expuestas, pero son difíciles de evaluar. Por lo general, la metodología empleada actualmente no resulta adecuada, ya que no se ha conseguido establecer una relación satisfactoria entre las concentraciones en aire y los efectos para la salud.

1. INTRODUCCIÓN

Las partículas de origen biológico que se encuentran suspendidas en el aire se conocen como bioaerosoles. Estas partículas incluyen bacterias, hongos, esporas y fragmentos de ambos, metabolitos primarios y secundarios, virus, desechos celulares de mamíferos, polen, etc. Muchas de estas

partículas corresponden a los tamaños de la fracción respirable, es decir, se mantienen en suspensión en el aire y pueden penetrar en el organismo a través del sistema respiratorio. Cuando las personas se exponen a un ambiente con una concentración de bioaerosoles elevada, se pueden llegar a sobrepasar los mecanismos de defensa del organismo, y como consecuencia aparecen respuestas de tipo infeccioso, tóxico y/o alérgico.

Se ha demostrado que los síntomas que aparecen como consecuencia de una exposición a bioaerosoles están bastante relacionados con la contaminación microbiana, por lo que la determinación de microorganismos en aire se utiliza generalmente como una forma de evaluar dicha exposición.

Es muy importante que en la determinación de microorganismos se considere la posible presencia de hongos,

cuyas implicaciones en el desarrollo de enfermedades de tipo alérgico es bien conocida. A su vez, para medir adecuadamente la contaminación fúngica del aire es necesario tener en cuenta todos sus componentes.

2. COMPONENTES DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA

Los hongos son un conjunto de organismos eucariotas caracterizados por depender de fuentes externas de materia orgánica para su desarrollo. Muchos son saprofitos (obtienen nutrientes de la materia orgánica muerta) y necesitan agua, aunque también son capaces de soportar periodos de desecación mediante la formación de estructuras específicas. Estructuralmente puede tratarse de organismos unicelulares, como las levaduras, pero lo más común es →

Los β -glucanos y el ergosterol son dos componentes estructurales de los hongos. Se sospecha que pueden ser los causantes de muchos de los efectos negativos observados en las personas expuestas a un aire contaminado, por lo que deben ser tenidos en cuenta para evaluar la contaminación fúngica.

que presenten un cuerpo vegetativo formado por hifas microscópicas que pueden entrelazarse hasta formar un micelio, que sí resulta visible al ojo humano.

Durante su ciclo de vida los hongos emiten una serie de partículas y sustancias, principalmente esporas, toxinas y compuestos orgánicos volátiles, que contaminan el ambiente y pueden repercutir negativamente sobre la salud de las personas. Las esporas fúngicas tienen una función reproductora y son las principales unidades de dispersión de los hongos, aunque también pueden desarrollar esta función pequeños fragmentos de hifas, denominados propágulos, que aparecen con mucha frecuencia en las muestras de aire. Las micotoxinas y los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son productos derivados del metabolismo de los hongos.

Además de las esporas y los productos

del metabolismo, existen dos componentes estructurales de los hongos que deben ser tenidos en cuenta para evaluar la contaminación fúngica: los B-glucanos y el ergosterol. Los primeros forman parte de la pared celular de los hongos y el ergosterol se localiza en su membrana celular. Se sospecha que estos dos componentes de los hongos pueden ser los causantes de muchos de los efectos negativos observados en las personas expuestas a un aire contaminado.

3. RIESGOS POR EXPOSICIÓN A HONGOS

Las personas estamos continuamente expuestas a diversas especies de hongos a través de la inhalación y la ingestión sin que ello cause efectos sobre nuestra salud. De hecho, algunas especies de hongos se utilizan en la elaboración de alimentos (por ejemplo, quesos), y son la

fuentes de medicamentos tales como la penicilina. Incluso muchos de los agentes anticancerígenos son productos del metabolismo de los hongos (1). Sin embargo, la exposición a aire contaminado por hongos y sus metabolitos puede tener repercusiones en la salud humana. La primera conexión entre la inhalación de bioaerosoles de hongos y el desarrollo de una enfermedad fue descrita por Blackley hacia 1870, cuando diagnosticó la opresión torácica y el «catarro bronquial» como consecuencia de la inhalación de esporas de *Penicillium*. Desde entonces se ha venido demostrando que la inhalación de esporas fúngicas aerosuspendidas, fragmentos de hifas y metabolitos puede causar una serie de enfermedades respiratorias, desde enfermedades de tipo alérgico (rinitis alérgica, asma y neumonitis por hipersensibilidad) hasta infecciones como la histoplasmosis, o la aspergilosis.

También se han descrito diversas afecciones asociadas a la inhalación de micotoxinas, desde intoxicaciones agudas hasta cáncer; por último, cabe mencionar que el crecimiento y degradación de los hongos pueden dar lugar a malos olores (incluyendo el olor a humedad) y otras molestias por el momento poco definidas (2). Entre todos estos efectos destacan por su alta incidencia las enfermedades relacionadas con la hipersensibilidad, bien sean reacciones alérgicas de tipo inmediato o neumonitis por hipersensibilidad.

Las reacciones de hipersensibilidad se producen en personas susceptibles a las proteínas altamente alergénicas o glicoproteínas de los hongos, cuando se dan unas condiciones de exposición propicias. Entre el 10 y el 60% de las personas genéticamente susceptibles (atópicas) desarrollan una hipersensibilidad inmediata (alergia) a los hongos. La exposición a ciertos tipos de

hongos está claramente asociada a síntomas de asma o fiebre del heno, aunque, desgraciadamente, la naturaleza de la exposición que estimula tanto la sensibilización o los síntomas subsecuentes sigue sin conocerse (2).

La neumonitis por hipersensibilidad, o alveolitis alérgica extrínseca, se considera que puede ser consecuencia de la exposición a antígenos fúngicos. Parece ser que el desarrollo de esta enfermedad requiere una exposición repetida a partículas fúngicas de pequeño tamaño, pero todavía no se conocen los factores genéticos que podrían controlar la susceptibilidad individual.

Sin embargo, existe una creciente convicción de que la mayoría de los síntomas causados por exposición al aire contaminado por hongos no tiene un origen de tipo alérgico, sino que corresponde a una inflamación no específica de las vías aéreas. Por tanto, es importante estudiar su capacidad para →

Tabla 1: Niveles de concentración de glucanos en muestras de aire y polvo

LUGAR DE LAS MEDICIONES	TIPO DE MUESTRA	SISTEMA DE MUESTREO	MÉTODO DE ANÁLISIS	RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN DE GLUCANOS	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Zona residencial	aire	Filtros de policarbonato ATTP de 0,8 µm	LAL	0 ng/m ³ - 19 ng/m ³	22
Zona residencial	aire	Filtros de fibra de vidrio	LAL	3,7 ng/m ³	25
Centro de día	aire	Filtros de policarbonato ATTP de 0,8 µm	LAL	1,2 ng/m ³ y 11,4 ng/m ³ (valores medios)	26
Centro de día	aire	Filtros de fibra de vidrio	LAL	5,7 ng/m ³	25
Centro de día	aire	Filtros de policarbonato de 0,8 µm	LAL	0,2 ng/m ³	4
Edificios públicos	aire	Filtros de fibra de vidrio	LAL	3,2 ng/m ³	25
Edificios públicos	aire	Filtros de policarbonato de 0,8 µm	LAL	0,06 ng/m ³	4
Escuela	aire	Filtros de policarbonato de 0,8 µm	LAL	0,49 ng/m ³ y 0,55 ng/m ³	4
Compostaje	aire	Filtros de fibra de cuarzo	LAL	0,12 ng/m ³ - 14,45 ng/m ³	27
Industria maderera	aire	Filtros de policarbonato de 0,8 µm	LAL	0,11 ng/m ³ - 0,76 ng/m ³	28
Recogida de basuras	aire	Filtros de policarbonato de 0,8 µm	LAL	1,3 ng/m ³ - 34,1 ng/m ³	29
Zona residencial	polvo	Aspirador	ELISA	35,1 ng/mg de polvo (valor medio)	26
Zona residencial	polvo	Aspirador	EIA	1.300 µg/g y 1.205 µg/g de polvo	19
Zona residencial	polvo	Aspirador	EIA	182 µg/g - 3.507 µg/g de polvo	20
Granjas	Muestreo personal	Filtros de policarbonato de 0,4 µm	EIA	0,82 µg/m ³ (valor medio)	30

La contaminación fúngica está tomando un interés creciente en relación con la calidad del aire de interior, lo que está dando lugar a su estudio en actividades no industriales, tales como oficinas, edificios públicos e incluso zonas residenciales

inducir este tipo de inflamación y determinar qué sustancias concretas son las que la causan. Hasta la fecha, de todos los agentes sospechosos de producir tales efectos, los (1→3)-β -D-glucanos han sido los más estudiados (3).

En aire de interior, la exposición a hongos se ha asociado también con otra serie de síntomas: irritación del tracto respiratorio, rinitis, tos, ronquera e irritación de los ojos. Algunos autores añaden, además, fatiga, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, de espalda y de articulaciones, así como dificultades de concentración (5).

4. ACTIVIDADES CON RIESGO

Existen industrias que utilizan algunos tipos de hongos o sus productos derivados (biotecnología, industria alimentaria, farmacéutica, etc.) en las que los riesgos de exposición están bien

determinados. Estas actividades no son objeto de este trabajo, que está dirigido hacia las actividades en las que se pueden producir exposiciones no deliberadas. Éstas se asocian principalmente con actividades del sector primario, en particular las relacionadas con la agricultura y la cría de animales (explotaciones porcinas, criaderos de aves, etc.). Los hongos crecen fácilmente sobre diversos sustratos por lo que en los trabajos de manipulación y almacenamiento de grano, heno, etc. se pueden liberar al ambiente partículas de origen fúngico. Los trabajadores del sector maderero también están expuestos a este tipo de contaminantes, ya que la madera es otro sustrato apropiado para el crecimiento de los hongos.

Además de los sectores tradicionales de exposición, en las últimas décadas han surgido nuevos tipos de industrias que están dando lugar a un riesgo importante por exposición a hongos,



como son la recogida y reciclaje de basuras, el compostaje o el tratamiento de agua residuales.

El interés por la contaminación fúngica en relación con la calidad del aire de interior es cada vez mayor, por lo que se están llevando a cabo estudios en actividades no industriales tales como oficinas, edificios públicos e incluso zonas residenciales, que arrojan resultados significativos. Los datos epidemiológicos y experimentales recogidos durante las últimas décadas sugieren que la exposición a hongos (mohos) es el factor más frecuentemente relacionado con diversos síntomas causados por las condiciones ambientales de interior, y se ha asociado con el síndrome del edificio enfermo (4).

En todas las actividades y situaciones mencionadas deberá tenerse en cuenta la posibilidad de un riesgo por la presencia de contaminantes biológicos derivados de los hongos, por lo que será necesario disponer de métodos adecuados para su evaluación.





Las actividades laborales en las que más se puede producir exposición a hongos están relacionadas principalmente con la agricultura, la ganadería y el sector maderero, pero también se ha observado en trabajadores de recogida y reciclado de basuras, compostaje y tratamiento de aguas residuales

5. MEDIDA DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA EN AIRE

Una técnica empleada habitualmente por su sencillez consiste en recoger esporas mediante impactación en agar. Las muestras se cultivan, se cuantifican mediante recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) y se identifican por las características de color, tamaño y textura de las colonias. De esta manera se subestima la concentración de hongos existente, ya que muchas esporas no son viables o no son capaces de crecer en el medio de cultivo que se les proporciona (1). Además, hay otros factores que pueden influir en el resultado, como el tipo

de medio de cultivo, las condiciones de incubación y la densidad de colonias en cada placa, por lo que estos métodos no resultan totalmente satisfactorios. Aunque es la técnica más utilizada, se estima que únicamente es capaz de detectar entre un 0,1 y un 10% del número total de microorganismos que se hayan recogido en las muestras medioambientales (5).

También es frecuente la cuantificación de esporas mediante la utilización de métodos no basados en el cultivo. Estos métodos permiten un recuento del total y su identificación en la mayor parte de los casos. La toma de muestras se realiza por lo general en filtros y las

técnicas empleadas para la cuantificación incluyen microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y recuento de esporas por microscopía electrónica (6).

Como alternativa a estos métodos se han desarrollado otros procedimientos que son especialmente apropiados cuando los efectos sobre la salud humana no se encuentran asociados a géneros o especies concretas de microorganismos. Desde hace casi 10 años ha cobrado un especial interés el análisis de ciertos elementos celulares que ponen de manifiesto la presencia de hongos, y que se emplean como marcadores en bioensayos y en métodos químicos.

5.1. Métodos alternativos: marcadores

Los marcadores son sustancias únicas en las células microbianas, por lo que pueden emplearse para cuantificar microorganismos en el medio ambiente. El muestreo en aire y el análisis de estos marcadores requiere equipos totalmente diferentes a los métodos basados en el cultivo o la microscopía. Estas técnicas tienen la ventaja de prescindir del cultivo de los organismos viables en el laboratorio, y de permitir hidrolizar directamente los filtros utilizados para el muestreo. Por otra parte, presentan el inconveniente de que no discriminan entre especies, además de necesitar un volumen de aire muestreado mucho mayor para recoger cantidades detectables (5).

Durante los últimos años se han empleado diversos marcadores para el estudio del polvo orgánico. Para la cuantificación de biomasa fúngica los marcadores empleados hasta la fecha son los glucanos y el ergosterol, aunque en un estudio de 2003 se propone emplear la beta-N-acetylhexosaminidasa como marcador alternativo al ergosterol (7).

A medida que se han ampliado los conocimientos sobre el ergosterol y los glucanos, se ha hecho patente la necesidad de estudiarlos como contaminantes de origen biológico por sí mismos, ya que se sospecha que pueden ser los causantes de los efectos nocivos asociados a los hongos. Por esta razón, la descripción →

Los (1→3)-β-D-glucanos causan reacciones inflamatorias no específicas y se les considera responsables de los síntomas inducidos por los bioaerosoles, tanto en ambientes laborales como de interior

de los glucanos y el ergosterol, su toxicología y métodos de evaluación merecen un tratamiento más detallado que se presenta en los siguientes apartados.

6. ERGOSTEROL

6.1. Descripción y utilización como marcador químico

El ergosterol es un lípido de membrana común en hongos. Aparece en forma libre o unido a otras estructuras, y es un factor importante en la fluidez de la membrana celular (5). Aparece en la mayoría de los hongos, tanto en forma libre como en forma conjugada, mientras que en plantas superiores es un componente minoritario y poco frecuente.

En 1977 se sugirió que este metabolito podría ser utilizado como indicador de la contaminación fúngica (8), y desde entonces se viene utilizando como tal a pesar de que su concentración depende

de la especie y las condiciones de crecimiento (9). El ensayo de este componente fúngico se ha empleado durante años para detectar al crecimiento de hongos en alimentos, semillas, harina y tomates, e incluso en materia orgánica de origen vegetal en putrefacción, como hojas y madera. En la actualidad, las aplicaciones más destacables del ergosterol como marcador de la contaminación fúngica en aire son el estudio de la contaminación del aire de interior y el de los materiales de construcción que pueden contribuir a dicha contaminación (10).

La utilización del ergosterol como marcador químico está aceptada a pesar de que la cantidad de ergosterol en el tejido de los hongos no es constante. Hay interacciones entre la cantidad de ergosterol y la especie de hongo analizada, edad del cultivo, estado de desarrollo (fase de crecimiento, formación de hifas o esporulación) y condiciones de crecimiento (medio de cultivo, pH y



temperatura); por el momento no se ha encontrado una explicación clara acerca de la influencia de estos factores en el contenido de ergosterol. Se ha sugerido, además, una relación entre el tamaño de la espora y su contenido en ergosterol (10). En todo caso, el contenido en ergosterol de las esporas parece ser muy

■ **Tabla 2: Niveles de concentración de ergosterol en muestras de aire y polvo**

LUGAR DE LAS MEDICIONES	TIPO DE MUESTRA	SISTEMA DE MUESTREO	MÉTODO DE ANÁLISIS	RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN DE GLUCANOS	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Zona residencial	polvo	Aspirador	CG-EM	2 - 16,5 ng/mg polvo	31
Zona residencial	polvo	Aspirador	CG-EM	6 - 45 ng/mg polvo	13
Zona residencial	polvo	Aspirador	CG-EM/EM	2,1 ng/mg polvo(valor medio)	5
Zona residencial	polvo	Aspirador	CG-EM/EM	0,72 - 43,6 ng/mg polvo	12
Zona residencial	polvo	Aspirador	ELISA	0 - 165 mcg/g de polvo	32
Zona residencial	aire	Filtros de policarbonato de 0,45 µm	CG-EM	0,01 - 194 ng/m ³	9
Explotación porcina	aire	Filtros de policarbonato de 0,4 µm	CG-EM	0,2 - 0,3 ng/l	13
Explotación porcina	aire	Filtros de policarbonato de 0,4 µm	CG-EM/EM	46 ng/mg de polvo	5



Los marcadores son sustancias únicas en las células microbianas, por lo que pueden emplearse para cuantificar microorganismos en el medio ambiente. Para la cuantificación de biomasa fúngica, los marcadores empleados hasta la fecha son los glucanos y el ergosterol.

similar para las diferentes especies de hongos que se han estudiado haciendo una ponderación sobre el volumen de la espora y su área superficial (9).

6.2. Toxicología

Hasta el momento no se han descrito correlaciones positivas concluyentes entre la concentración del ergosterol aerosuspendido y efectos sobre la salud, y las opiniones al respecto resultan contradictorias (5), (11).

Existen diversas investigaciones que tratan de cuantificar ergosterol en muestras de aire y polvo para intentar demostrar una asociación entre la inhalación de este compuesto y la aparición de efectos en la salud, referidos principalmente al asma infantil (5), (12). Estos estudios se han realizado sobre todo en

áreas residenciales con humedades donde los niveles de concentración son muy bajos, por lo que ha sido necesario utilizar los métodos de medida basados en la CG-EM/EM que mejoran el límite de detección.

6.3. Métodos para la determinación de ergosterol en aire

La Norma UNE-EN 13098 «Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire», de mayo de 2001, indica para la determinación de ergosterol en aire el muestreo en filtro y el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), aunque no se dispone de un método normalizado basado en este fundamento.

De los distintos procedimientos mencionados en la bibliografía consultada se deduce que la cuantificación de ergosterol puede ser abordada con diversas técnicas analíticas: cromatografía líquida (HPLC), cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía de gases-espectrometría de masas/masas de captura iónica (CG-EM/ICP) e inmunoensayo.

En la actualidad, las técnicas más empleadas son la CG-EM (13) y la CG-EM/ICP (14), ambas con dehidrocolesterol como patrón interno. En general, la toma de muestra ambiental se realiza con filtros de polycarbonato estériles que se encuentran montados en portafiltros con soportes de celulosa. La tendencia en estos últimos años es emplear la CG-EM/EM ya que con →

La utilización de marcadores supone una alternativa prometedora para la evaluación del riesgo por exposición a hongos y productos derivados

esta técnica se mejora sustancialmente el límite de detección.

Por otra parte, NIOSH publicó en 2003 un informe sobre la calidad del aire en el que se cuantifica el ergosterol mediante CG-EM, y se recomienda ampliar el volumen del muestreo a 5 l/min, 24 horas al día durante 3 días, con el fin de mejorar el límite de detección en zonas de muy baja concentración (15).

7. GLUCANOS

7.1. Descripción y utilización como marcador

Los D-glucanos son polímeros formados por unidades de D-glucopiranosas que están unidas mediante enlaces glucosídicos de varios tipos, que además pueden aparecer en dos formas estructurales, α y β (5). En función de estas dos características aparecen en la naturaleza una gran variedad de glucanos, con diferencias en la forma de unión y en el peso molecular, que oscila entre 10^4 y 10^7 Da (16). Entre todos ellos, los más importantes por su implicación en la contaminación de origen fúngico son los (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos, que se localizan en la pared celular de la mayoría de los hongos, aunque también aparezcan en algunas bacterias, levaduras y algunas plantas superiores (17).

Al igual que ocurre con el ergosterol, la cantidad de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos varía entre las diferentes especies de hongos (18). Sin embargo, es importante mencionar que algunos investigadores han conseguido relacionar los resultados obtenidos de hongos cultivables con los niveles de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos medidos en muestras de polvo recogidas en zonas residenciales (19), (20).

7.2. Toxicología

La actividad biológica de los (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos depende de varios factores: su peso molecular, el tipo de unión de sus monómeros, su conformación y su solubilidad (16). Tienen efectos antitumorales (1), efectos adyuvantes y activación de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y complemento (26).

Los (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos causan reacciones inflamatorias no específicas y se les considera responsables de los síntomas inducidos por los bioaerosoles, tanto en ambientes laborales como de interior (3), (21), (22). Se ha encontrado una relación dosis-respuesta entre niveles de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos e irritación de ojos y garganta, tos seca e irritación de la piel (21). Otros autores añaden además opresión torácica y dolor de articulaciones, fatiga, irritación de nariz y ronquera. (22). También se ha encontrado una relación entre la exposición a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos y afecciones pulmonares, tales como una disminución en el volumen de expiración forzada en adultos y una variabilidad en la capacidad pulmonar en niños. Muchos de los estudios realizados en los últimos años pretenden demostrar la implicación de los (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos en el desarrollo o agravación de asma en niños. Además, parece que los individuos atópicos son especialmente sensibles a este tipo de conta-

minación, incluso a niveles de exposición bajos (3). Por ello, son frecuentes las investigaciones que se realizan en escuelas, zonas residenciales, etc.

En cuanto a la experimentación con animales de laboratorio, existe abundante información acerca del efecto de la administración por inyección de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos; sin embargo, los estudios por inhalación son limitados. En estudios en vivo sobre cobayas se ha concluido que por inhalación de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos, el número de eosinófilos aumenta significativamente en el epitelio de las vías aéreas, y se produce una respuesta inflamatoria (23).

7.3. Métodos para la determinación de glucanos en aire

En las muestras medioambientales, los β -D-glucanos aparecen en forma particulada, por lo que lo más frecuente es realizar la toma de muestra en filtros de membrana de policarbonato de 0,8 μ m de poro, en un portafiltros sobre un soporte de celulosa, todo ello previamente esterilizado. Los muestreos se realizan en puntos fijos, situando el portafiltros a la altura que correspondería a la zona de respiración del trabajador. La extracción se lleva a cabo en una disolución de NaOH. Normalmente, los (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos son insolubles en agua, salvo los unidos por enlaces (1 \rightarrow 6), y este proceso rompe la triple hélice del glucano, convirtiéndolo en hidrosoluble durante un tiempo limitado, en el transcurso del cual deberá realizarse la cuantificación (16). →





Por el momento hay una falta de uniformidad en cuanto a las técnicas de muestreo y análisis empleadas en los diferentes estudios

Para cuantificar los glucanos, las dos opciones mayoritarias son ensayos biológicos: inmunoensayos y métodos basados en el Lisado del Amebocito del Límulo (*Limulus Amebocyte Lysate*, LAL).

a) Inmunoensayos

Existen diferentes versiones de diferentes autores, pero los más destacables son los elaborados por Douwes y Milton. Douwes desarrolló en 1996 un inmunoensayo de inhibición enzimática (EIA, Inhibition Enzyme Immunoassay) con un límite de sensibilidad de 40 ng/ml, aunque se considera que este método no es altamente específico para los (1→3)-β-D-glucanos de los hongos (24). En 2001, Milton alcanzó un límite de detección bastante menor, 1 ng/ml con un ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), empleando un anticuerpo más específico que el ensayo de Douwes. Es específico para los enlaces glucosídicos (1→3), y detecta también los (1→3)-β-D-glucanos unidos por enlaces (1→6), aunque su mayor ventaja es la insensibilidad a interferencias causadas por otros agentes (21).

b) Métodos basados en el LAL

Los métodos basados en el Lisado del Amebocito del Límulo (LAL) son un conjunto de ensayos biológicos basados en el sistema inmune del cangrejo cacero-

la o cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), en concreto en un tipo de células denominadas amebocitos. El lisado de los amebocitos contiene enzimas capaces de reaccionar ante la presencia de endotoxinas (mediante el factor C) y glucanos (factor G). De acuerdo a este principio, se han desarrollado diferentes versiones del método que permiten detectar y cuantificar estos agentes biológicos, y que se comercializan en forma de *kits* específicos para cada uno de ellos.

La Norma UNE-EN 13098 «Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire», de mayo de 2001, indica una toma de muestra en filtro y el análisis por LAL, pero en el último informe publicado por NIOSH sobre la calidad de aire en 2003, los (1→3)-β-D-glucanos son cuantificados por inmunoensayo, ELISA, por lo que sería conveniente tener en cuenta esta alternativa (15).

8. MEDICIONES EN CAMPO

Los resultados que se han encontrado en la bibliografía sobre mediciones de glucanos y ergosterol en campo se resumen en las tablas 1 y 2, respectivamente. Existen diversas posibilidades para la toma de muestras, así como diferentes opciones a la hora de analizar dichas muestras. Los resultados procedentes de diferentes estudios se han agrupado teniendo en cuenta el lugar de muestreo y especificando los métodos empleados en cada caso.

9. VALORES LÍMITE

No se han encontrado referencias a ningún valor límite de exposición establecido o propuesto en organismos como ACGIH, MAK o INSHT, ni en Directivas UE u otra normativa legal

para la exposición a glucanos y/o ergosterol.

A título orientativo, es reseñable que se han localizado dos estudios que aportan datos a tener en cuenta sobre una posible relación dosis-efecto para la exposición a (1→3)-β-D-glucanos. Por un lado, Thorn, J. y Rylander, R. realizaron en 1998 un estudio en una zona residencial y analizaron las muestras por LAL, concluyendo que para concentraciones de 2 ng/m³ los niveles de opresión torácica resultan significativos (22).

En 2001, Eduard, W. et al. llevaron a cabo un estudio sobre la exposición a glucanos soportada por un grupo de granjeros (30) en el que cuantificaron las muestras por EIA. Estudiando los síntomas que presentaban llegaron a dividir la exposición en tres rangos en función de la gravedad de diversos síntomas (irritación ocular, congestión nasal y moqueo, tos, opresión torácica y sibilancias), considerando: exposición baja de 0,00 a 0,5 μg/m³, exposición media de 0,5 a 5 μg/m³ y exposición alta de 5 a 76 μg/m³.

Es necesario interpretar con cautela la diferencia numérica a la que se llega en estas investigaciones, dado que la metodología empleada en ambos estudios es diferente.

En lo referente a la exposición a ergosterol, no se ha encontrado en la bibliografía consultada ningún tipo de información orientada a establecer unos valores de límite.

10. CONCLUSIONES

El estudio de los contaminantes biológicos está tomando cada vez mayor interés, tanto en el mundo laboral como fuera de él, pero su evaluación es compleja. La contaminación de origen fúngico es un ejemplo de esta situación. Los hongos generan una gran cantidad de partículas y sustancias contaminantes, cuyas implicaciones más relevantes para la salud →

son enfermedades de hipersensibilidad, pero los métodos empleados actualmente para su evaluación son incompletos y no han permitido establecer una relación causa-efecto, por lo que no se dispone aún de unos valores límite. La contaminación de origen fúngico es muy alta en ambientes agrícolas y ganaderos, en recogida de basuras, reciclaje y compostaje, pero también es muy común en ambientes de interior, por lo que puede afectar a una parte importante de la población.

En la última década, varios grupos de investigadores han tratado de evaluar la contaminación fúngica mediante la utilización de marcadores, planteando la determinación de glucanos y ergosterol en aire o en polvo como métodos alternati-

vos a los tradicionales. El estudio de los glucanos ha permitido además describir con cierto detalle cuáles son sus efectos sobre la salud de las personas expuestas, e incluso algunos investigadores presentan datos para unos posibles valores límite de exposición. El estudio de la toxicología del ergosterol no se encuentra tan avanzado y todavía se discuten sus efectos sobre la salud, pero su utilización como marcador de la biomasa fúngica está ampliamente aceptada hace varios años.

La utilización de estos marcadores supone una alternativa prometedora para la evaluación del riesgo por exposición a hongos y productos derivados, aunque por el momento hay una falta de unifor-

midad en cuanto a las técnicas de muestreo y análisis empleadas en los diferentes estudios. Es de esperar que se siga investigando en este campo y que en un futuro no muy lejano se pueda disponer de métodos normalizados, como ha ocurrido recientemente para el caso de las endotoxinas bacterianas.

11. AGRADECIMIENTOS

Este artículo es parte del trabajo realizado en el desarrollo de una beca concedida por la FUNDACIÓN MAPFRE en la convocatoria 2003-2004. Agradezco a Concepción de la Hoz la orientación y las aportaciones recibidas para la elaboración de este artículo.

□ Para saber más

1. American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH). *Bioaerosols assesment and control.* ACGIH Publisher: Cincinnati, Ohio, 1999. Chapter 19.

2. Burge, H. A. *Bioaerosols.* Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1995. pp 87-114.

3. Rylander, R.; Lin, R.H. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan relationship to indoor air related symptoms, allergy and asthma, *Toxicology*, 2000, 152, 47-52.

4. Rylander, R.; Persson, K.; Goto, H.; et al. Airborne beta-1,3-glucan may be related to symptoms in sick buildings, *Indoor environ*, 1992, 1, 263-267.

5. Szponar, B.; Larsson, L. Use of mass spectrometry for characterising microbial communities in bioaerosols, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2001, 8, 111-117.

6. Eduard, W. Measurement methods and strategies for non-infectious microbial components in bioaerosols at the workplace, *Analyst*, 1996, Vol. 121, 1197-1201.

7. Reeslev, M.; Miller, M.; Nielsen K.F. Quantifying mold biomass on gypsum board: comparison of ergosterol and beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, Vol. 69, No. 7, 3996-3998.

8. Young, J.C. Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids, *J. Agric. Food. Chem.*, 1995, Vol. 43, No. 11, 2904-2910.

9. Miller, J.D.; Young, J.C. The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1997, 58, 39-43.

10. Pasanen A.L.; Yli-Pietilä K.; Pasanen P. et al. Ergosterol

content in various fungal species and biocontaminated building materials, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, Vol. 65, No. 1, 138-142.

11. Dales, R., Miller, D. White, J. Testing the association between residential fungus and health using ergosterol measures and cough recordings, *Mycopathologia*, 1999, 147, 21-27.

12. Sebastian, A.; Larsson, L. Characterization of the microbial community in indoor environments: a chemical-analytical approach, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, Vol. 69, No 6, 3103-3109.

13. Axelsson, B-O.; Saraf, A.; Larsson, L. Determination of ergosterol in organic dust by chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 1995, 666, 77-84.

14. Saraf, A.; Larsson, L. Use of gas chromatography/ ion trap tandem mass spectrometry for the determination of chemical markers of microorganisms in organic dust, *J. Mass Spectrom.*, 1996, 31, 389-396.

15. Park, J., Goe, C. I. H. S., Choe, K. T., Akpınar-elci, M. and Kreiss, K. NIOSH health hazard evaluation report: Somerset county assistance office, HETA #2001-0067-2896, Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health, 2003.

16. Young, S.H.; Robinson V.A.; Barger, M. et al. Exposure to particulate 1 \rightarrow 3- β -glucans induces greater pulmonary toxicity than soluble 1 \rightarrow 3- β -glucans in rats, *J. Toxicol. Environ. Health*, 2003, 66, 25-38

17. Young, R.S.; Jones, A.M.; Nicholls, P.J. Something in the

air: endotoxins and glucans as environmental troublemakers, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1998, 50, 11-17.

18. Fogelmarck, B.; Rylander, R. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in some indoor air fungi, *Indoor Built Environ.*, 1997, 6, 291-294.

19. Chew, G.; Douwes, J.; Doekes, G.; et al. Fungal extracellular polysaccharides, β (1 \rightarrow 3) glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, *Indoor Air*, 2001, 11, 171-178.

20. Douwes, J.; Doekes, G. et al. Endotoxin and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in house dust and the relation with home characteristics. A pilot study in 25 German houses, *Indoor Air*, 1998, 8, 255-263

21. Milton, D.K.; Alwis, K.A.; Fisette, L.; Muilen; et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific for (1 \rightarrow 6) branched, (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan detection environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, Vol. 67, No. 12, 5420-5424.

22. Thorn, J.; Rylander, R. Airways inflammation and glucan in a row-house area, *Am. J. Respir. Crit. Med.*, 1998, 157, 1798-1803.

23. Fogelmark, B.; Thorn, J.; Rylander, R. Inhalation of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan causes airway eosinophilia, *Mediators of Inflammation*, 2001, 10, 13-19.

24. Douwes, J.; Doekes, G. Montijn, R.; et al. Measurement of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in the occupational and home environment with and inhibition enzyme immunoassay, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, Vol. 62, 3176-3182.

25. Wan, G.H.; Li, G.S. Indoor endotoxin and glucan in association with airway inflammation and systemic symptoms, *Arch. Envi-*

ron. Health, 1999, Vol. 54, No. 3, 172-178.

26. Rylander, R. Airborne (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan and airway disease in a day-care center before and after renovation, *Arch. Environ. Health*, 1997, Vol. 52, No. 4, 281-285.

27. Hryhorczuk, D.; Curtis, L., Scheff, J. et al. Bioaerosol emission from a suburban yard waste composting facility, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 8, 177-185.

28. Alwis K.U.; Mandryck J.; Hocking A.D. Exposure to biohazards in wood dust: bacteria fungi, endotoxins and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 1999, Vol. 14 (9), 598-608.

29. Thorn, J. Seasonal variations in exposure to microbial cell wall components among household waste collectors, *Ann. Occup. Hyg.*, 2001, Vol. 45, No. 2, 153-156.

30. Eduard, W.; Douwes, J.; Mehl, R.; Heederick, D. et al. Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms, *Occup. Environ. Med.*, 2001, 58, 113-118.

31. Saraf, A.; Larsson, L.; Burge, H. and Hamilton, D. Quantification of ergosterol and 3-hidroxi fatty acids in settled house dust by chromatography-mass spectrometry: Comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* Amebocyte Lysate assay, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, Vol. 63, No. 7, 2554-2559.

32. Dharmage, S.; Bailey, M.; Raven, J.; et al. Mouldy houses influence symptoms of asthma among atopic individuals, *Clin. Exp. Allergy*, 2002, 32, 714-720.