



# Documentación

## NTP 422: Endotoxinas en ambientes laborales

Endotoxines dans l'environnement du travail

Airborne endotoxins in work environments

### Redactoras:

María del Carmen Martí Solé  
Lda. en Farmacia

Rosa M<sup>a</sup> Alonso Espadalé  
Lda. en Ciencias Biológicas

Angelina Constans Aubert  
Ingeniero Técnico Químico

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

*Esta Nota Técnica hace referencia a la contaminación ambiental debida a las endotoxinas y a los efectos sobre la salud de este tipo de compuestos en diversos medios laborales.*

## Introducción

Las endotoxinas están implicadas en las enfermedades asociadas a los aparatos de aire acondicionado y humidificadores, así como también a la bisinosis; por otro lado, afectan también a los trabajadores de las plantas de depuración de aguas para el consumo, de plantas de tratamiento de residuos sólidos urbanos y al personal de criaderos industriales de aves y a los agricultores.

## Descripción

Las endotoxinas son un componente de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas. Se trata de agregados macromoleculares de alrededor de 1 millón de daltons (endotoxina libre). Las bacterias Gram negativas se presentan en el medio ambiente, principalmente contaminando los vegetales, y se detectan muy a menudo en las plantas de algodón. Estas bacterias se multiplican rápidamente en el agua estancada ya que requieren muy pocos nutrientes.

En forma pura, las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS); la porción lipídica del LPS, denominada lípido A, contiene ácidos grasos con el grupo 3-hidroxi. Químicamente es distinta a todos los demás lípidos de la membrana biológica; es la fracción más constante del LPS y es la responsable de la toxicidad característica de la molécula. Las distintas especies bacterianas difieren en la composición del lípido A. Se ha observado que las propiedades toxicológicas de las endotoxinas son diferentes según las especies y el estadio de desarrollo de las bacterias. Al calentar las endotoxinas, su efecto tóxico aumenta ya que las proteínas se desnaturalizan y en consecuencia las endotoxinas acceden más fácilmente a los receptores celulares.

Las endotoxinas son solubles en agua. Los detergentes pueden romper la estructura de la membrana del LPS y solubilizarlo como unidades moleculares individuales (2500-5000 daltons).

## Efectos sobre la salud

Los efectos de las endotoxinas sobre la salud son evidentes y se conocen desde antiguo. Ramazzini, en 1713, describió los síntomas pulmonares agudos como consecuencia de la inhalación de polvos de desechos vegetales, afección conocida como bisinosis. En 1942, Neal y col., establecieron por primera vez la relación entre la presencia de bacterias Gram negativas y los síntomas pulmonares presentados por los obreros de una hilandería de algodón.

Como ya se ha comentado, las endotoxinas pueden estar contaminando la planta del algodón, en la que también se pueden encontrar otros agentes tóxicos como taninos y gossypol. La cantidad de endotoxinas en el polvo de las hilanderías dependerá del origen geográfico del algodón, de la forma de lavado antes del cardaje, de la ventilación de los locales y de los métodos de hilado. Los tejedores de tapices también están expuestos a la lana contaminada por endotoxinas.

Los agricultores encargados de la manipulación de fardos de paja durante la descarga de avena así como de la operación de abono, no sólo están expuestos a las endotoxinas sino que también lo están a las aflatoxinas producidas por el *Aspergillus fumigatus*. Así mismo, los trabajadores de silos en los que se almacena grano, también pueden estar expuestos a la inhalación de endotoxinas.

En los humidificadores contaminados la cantidad de endotoxinas aumenta considerablemente cuando el sistema de acondicionamiento de aire está parado, por ejemplo, durante el fin de semana. Los síntomas de inhalación de endotoxinas o de bacterias Gram-negativas son los mismos que los producidos por la fiebre de los humidificadores.

Las endotoxinas son altamente tóxicas. Provocan fiebre (pueden considerarse sustancias pirógenas), malestar, alteraciones en el recuento de los leucocitos, afecciones respiratorias y estado de shock, llegando en algunos casos a producir la muerte.

La inhalación experimental de bacterias Gram-negativas o de endotoxinas en voluntarios sanos ha sido muy estudiada en los últimos años. Se ha constatado la aparición de fiebre, tos, dolor difuso, náuseas, jadeo y obstrucción aguda del flujo de aire, comprobándose una disminución significativa del volumen espirado máximo por segundo (VEMS). Consecuentemente, los efectos pulmonares de la inhalación de las endotoxinas aumentan en individuos asmáticos.

## Evaluación en aire

Las endotoxinas conservan su actividad aun cuando las bacterias estén muertas. En consecuencia, no deben emplearse métodos cuantitativos que se basen exclusivamente en el número de bacterias viables. Sin embargo, la relación entre el recuento de bacterias Gram-negativas y la cantidad de endotoxina en aire se halla plenamente establecida.

Los aerosoles de endotoxinas pueden captarse tanto en medio líquido como en sólido. Dada la facilidad de manipulación, los filtros de celulosa o de cloruro de polivinilo son ampliamente utilizados.

Dado que existe la posibilidad, descrita en la bibliografía, de una adsorción irreversible por parte del filtro utilizado, al evaluar la concentración de endotoxinas en aire, debe tenerse en cuenta la cantidad de endotoxina, el tipo de filtro utilizado y el tiempo de extracción. Estas variables deben ser controladas antes de comparar los datos de diferentes laboratorios.

## Análisis

En la práctica, la captación se realiza en filtros, que se tratan con agua destilada, preparándose una serie de diluciones con las cuales se efectúa el test del Limulus, que se describe a continuación. Cuando la muestra que se desee analizar proceda de un humidificador, se recoge directamente una muestra del agua del humidificador.

La congelación de las suspensiones de endotoxinas puede producir pérdidas significativas. En consecuencia, las muestras no deben congelarse, empleándose como alternativa para su conservación la pasteurización.

La determinación de endotoxinas en aire se efectúa mediante un test basado en la reacción de lisado del Limulus amoebocyte (LAL), que se basa, a su vez, en la activación de la cadena enzimática de coagulación de la linfa del cangrejo *Limulus polyphemus*.

El test Limulus también se utiliza en la industria farmacéutica para asegurar que un preparado parenteral no es pirógeno por ser más sensible que el test en conejo, ya que se asume que las endotoxinas son los únicos pirógenos que se pueden hallar en los preparados farmacéuticos elaborados bajo normas GMP.

Basándose en la propiedad de la reacción de lisado existen diferentes técnicas de LAL:

- **LAL de gelificación.** Se basa en que el enzima activado causa la gelificación de una proteína coagulable. Cuando la concentración de endotoxinas de la muestra excede el valor de la sensibilidad del reactivo LAL, se forma un gel consistente. De esta manera se pueden hacer determinaciones cualitativas del nivel de endotoxinas. En base a este principio se han desarrollado otras técnicas que son cuantitativas, como el LAL turbidimétrico y el LAL cromogénico.
- **LAL turbidimétrico.** El enzima activado inicia la gelificación de una proteína coagulable del lisado. Midiendo el aumento de la turbidez, antes de que se forme el coágulo de gel, es posible cuantificar la cantidad de endotoxina presente en la muestra.
- **LAL cromogénico.** La presencia de endotoxina activa la cascada enzimática, incidiendo sobre un substrato cromogénico que libera p-nitroanilina proporcionalmente a la presencia de endotoxina. Las técnicas cuantitativas de LAL cromogénico pueden ser a punto final o cinéticas.

Todas estas técnicas precisan de un patrón de endotoxina para elaborar una curva de calibración. Los resultados de actividad de las muestras se expresan en UE (Unidades de endotoxina) por ml, basadas en la endotoxina estándar de referencia de la USP (United States Pharmacopeia).

El material de vidrio utilizado para el análisis de endotoxinas debe ser tratado en un horno a 180°C durante una hora para destruir toda traza de endotoxina. El material de plástico debe ser de un solo uso. Estos métodos se hallan comercializados en forma de kits.

## Criterios de valoración

No existen criterios de valoración para la evaluación de la exposición laboral a endotoxinas bacterianas. Sin embargo, Rylander(1994) propone un límite ocupacional para endotoxinas, basado en cambios agudos en la función pulmonar. Sugiere, para concentraciones TWA durante 8 horas, los siguientes efectos:

- 200 UE/m<sup>3</sup>: inflamación en vías respiratorias con incremento de la reactividad en las mismas.
- 2000 UE/m<sup>3</sup>: disminución en el VEMS.
- 3000 UE/m<sup>3</sup>: angina de pecho.
- 10000 - 20000 UE/m<sup>3</sup>: neumonitis tóxica.

Es muy importante tener en cuenta los posibles efectos de otros contaminantes ambientales como humo de tabaco, nieblas de humidificadores y gases de los tubos de escape de los coches que pueden afectar los resultados obtenidos.

## Endotoxinas y SEE

En diferentes estudios sobre edificios enfermos se ha llegado a la conclusión de que los problemas de salud detectados eran producidos por la presencia de endotoxinas.

En un estudio realizado en Holanda en 19 edificios gubernamentales en 1993, Teeuw, estableció la relación existente entre las endotoxinas presentes en el ambiente con las quejas expuestas en un cuestionario sobre el Síndrome del Edificio Enfermo (SEE). Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

- La prevalencia de síntomas de irritación de las mucosas fue más alta en los edificios con aire acondicionado humidificado, que en los edificios sin aire acondicionado, ventilados de forma mecánica o natural, produciéndose los niveles más altos de bacterias en los edificios con sistemas de humidificación.
- La existencia de una relación dosis-respuesta entre los niveles ambientales de endotoxinas y los síntomas manifestados.
- La presencia de aproximadamente 10<sup>6</sup> al 10<sup>8</sup> bacterias Gram-negativas por m<sup>3</sup>, que produjeron alrededor de 0,01-1,0 µg de endotoxinas por m<sup>3</sup>, fue la causa de la irritación de la mucosa nasal.

Por lo que respecta a otras enfermedades más específicas, no está claro el papel jugado por las endotoxinas. Toth (1992) demostró que la endotoxina bacteriana peptidoglucano (PG) está presente en casi todas las bacterias que causan enfermedades humanas. En cambio, el LPS está presente sólo en las bacterias Gramnegativas. LPS y PG pueden estar implicadas en enfermedades respiratorias asociadas con la contaminación de aire interior.

Por último, en estudios realizados en distintos tipos de edificios, comparando los niveles de endotoxinas, se ha demostrado que en los edificios "enfermos" el valor de éstas se

sextuplica en relación a los edificios "sanos".

## Recomendaciones generales

Si se detectan endotoxinas en aire, las acciones preventivas serán las mismas que se tomarían en los casos de contaminación por bacterias y hongos, es decir, separación y limpieza del material contaminado.

Es importante reducir la producción y amplificación de bacterias Gram-negativas que pueden ser la fuente de producción de endotoxinas. La vigilancia de los humidificadores y una ventilación correcta de los locales en las hilanderías y las granjas, son ejemplos de medidas preventivas adecuadas.

## Bibliografía

(1) ACGIH, Committee Activities and Reports

### **Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment**

ACGIH, Cincinnati, Oh. USA, 1989

(2) ACGIH

### **TLVs Valores Límite para Sustancias Químicas y Agentes Físicos en el ambiente de Trabajo, e índices Biológicos de Exposición para 1995-1996.**

Versión en Castellano autorizada y editada por la Conselleria de Trabajo y Asuntos Sociales de la Generalitat Valenciana (traducción de la Sección Española de la American Industrial Hygiene Association). Valencia, España. 1996, 23-24.

(3) CHROMOGENIX

### **Limulus Amebocyte Lysate Coatest® Gel Lal**

Chromogenix AB, Mölndal, Sweden, 1996

(4) DESCHAMPS S., MOMAS I., FESTY B.

### **Algunos aspectos del riesgo profesional vinculado con la inhalación de endotoxinas**

Salud Ocupacional, 28-34, 1994

(4) D K., ROBIN J.GERE, et al

### **Endotoxin Measurement: Aerosol Sampling and Application of a New Limulus Method**

Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 51 (6), 331-337, 1990

(6) SCHMIDT D.

### **Biocontaminants in Indoor Environments**

### **A Guide to the Practical Control of Indoor Air Problems, from Cutter Information Corp.**

Indoor Air Quality Update, Arlington, USA, 1994

(7) STUDY

### **Study Shows Link Between Endotoxin and SBS Complaints**

Indoor Air Quality Update, 7, (2), 5-7. 1994