

Sesión I

ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN EN LA EXPOSICIÓN LABORAL A BENCENO EN ESTACIONES DE SERVICIO. MARCADORES AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS.

J.F. Periago y C. Prado. Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo MURCIA.

Resumen: En la operación de repostar gasolina en estaciones de servicio, tanto la temperatura ambiente como el volumen de gasolina dispensada, pueden incrementar notablemente los niveles ambientales de hidrocarburos aromáticos y consecuentemente el riesgo de exposición laboral de los operarios que realizan las mismas, especialmente en el caso del benceno que bajo el punto de vista toxicológico es el componente más importante de las gasolinas. En este trabajo hemos analizado la evolución de la exposición laboral de los trabajadores de estaciones de servicio a benceno, entre 1995 y 2000, mediante el muestreo personal en la zona de respiración

El estudio se ha llevado a cabo en dos fases. En la primera, que se realizó en 1995, se comenzó en el ámbito de laboratorio analizando la influencia de la temperatura en las concentraciones de los vapores de los 3 tipos de gasolinas que se comercializaban entonces. Después se hizo un muestreo en una población laboralmente expuesta de 21 trabajadores en dos períodos con temperaturas ambientales muy diferentes (Marzo y Julio). Se encontró una relación significativa entre el volumen de gasolina dispensada a lo largo de la jornada por cada trabajador muestreado y la concentración ambiental media de benceno durante el mismo período. También se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones medias de benceno evaluadas en marzo (14-15°C) y julio (28-30°C).

La segunda fase se realizó en el año 2000, después de la entrada en vigor de la normativa legal que disminuye la concentración de benceno en las gasolinas, midiéndose la exposición personal a benceno en el mes de julio a una exposición semejante, de 28 trabajadores. Se obtuvo de nuevo una relación significativa entre el volumen de gasolina y la concentración de benceno en aire. Sin embargo se ha observado un descenso significativo de los niveles ambientales de benceno entre 1995 y 2000. Además se realizó el control biológico de una población compuesta por 31 trabajadores expuestos laboralmente, mediante la determinación de la concentración de benceno en orina recogida al finalizar la exposición. Se detectó una relación significativa entre la concentración urinaria y ambiental de benceno. Por ello, la concentración de benceno en orina se puede utilizar como un buen marcador biológico de la exposición a benceno.

INTRODUCCIÓN

La gasolina es una mezcla compleja y muy variable de hidrocarburos alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular, principalmente hidrocarburos parafínicos, nafténicos, olefínicos y aromáticos. Un grupo muy importante a considerar en la exposición laboral a estos vapores, es el constituido por los componentes aromáticos de bajo peso molecular (benceno, tolueno y xilenos). De entre ellos el más importante, bajo el punto de vista toxicológico, es el benceno ya que está considerado como un cancerígeno para el hombre por diversas organizaciones internacionales tales como la Agencia Internacional del Cáncer

(IARC) [1], The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) [2] y la Comisión MAK [3]. Este hecho también se ha puesto de manifiesto en trabajos realizados por diversos autores [4-6]. En nuestro país también está considerado como cancerígeno en el documento sobre límites de exposición profesional a contaminantes químicos del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [7]. La concentración de benceno en las gasolinas es variable, porque depende del tipo de crudo que se refine y del propio proceso de refinado. Sin embargo, desde enero de 2000 se ha limitado en nuestro país la concentración máxima de benceno en las gasolinas al 1% en volumen [8].

Las operaciones de suministro de combustible para la automoción constituyen la principal fuente de contaminación por benceno en las grandes ciudades. Los individuos que realizan la operación de repostar combustible pueden estar expuestos a concentraciones muy elevadas de vapores de gasolinas. Este hecho es particularmente importante en el caso de la exposición laboral del personal que realiza esta tarea a lo largo de toda la jornada laboral en estaciones de servicio, por lo que este tipo de exposición ha sido evaluado por diversos autores [9-13], aunque recientemente también se han realizado estudios encaminados a estimar este riesgo para los usuarios que utilizan el autosuministro [14-15]. En cualquier caso, la concentración de compuestos volátiles procedentes de la gasolina en el área de trabajo de los operarios de estaciones de servicio, estará condicionada fundamentalmente, por la temperatura ambiente y el volumen de combustible despachado [16]. Para la evaluación de los niveles de vapores de gasolina en aire se han desarrollado numerosos procedimientos, tanto dinámicos como difusivos [17, 18].

A lo largo de los últimos años se han producido importantes modificaciones en las variables que influyen en las condiciones de exposición laboral, tales como la modificación de las características de los combustibles debida a la introducción de las gasolinas sin plomo o la entrada en vigor de disposiciones legales sobre la limitación del contenido en benceno en gasolinas. Todo ello ha influido en las condiciones de la exposición laboral, por lo que puede ser de interés estudiar la misma en relación con dichas modificaciones.

El estudio se llevó a cabo en dos fases. La primera se realizó en 1995 analizando experimentalmente, en el ámbito de laboratorio, la influencia de la temperatura en la concentración ambiental de los componentes volátiles de varios tipos de gasolina que se suministraban habitualmente en las estaciones de servicio. También se evaluó la exposición laboral de un grupo de trabajadores expuestos a vapores de gasolina en estaciones de servicio dos épocas climáticamente diferentes, para analizar la influencia de la temperatura, registrando el volumen de combustible despachado en cada caso [16].

La segunda fase se llevó a cabo en el año 2000, una vez entrada en vigor la disposición legal que limitaba la composición máxima de benceno en gasolinas y con una mayor implantación comercial de las gasolinas sin plomo. En ella se volvió a evaluar la exposición laboral de un grupo de trabajadores en las condiciones climáticas coincidentes con las del período más cálido de la primera fase. También se realizó en esta segunda fase un control biológico de la exposición a benceno, mediante su determinación en orina como inmetabolizado.

El objetivo de este estudio es analizar globalmente la influencia de las modificaciones tecnológicas y legales en la evolución de la exposición laboral a benceno por los trabajadores de estaciones de servicio durante el período de tiempo comprendido entre 1995 y 2000, así como analizar la posibilidad de complementar el control ambiental con el control biológico de benceno inmetabolizado en orina.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Primera Fase

Estudio de gasolinas en el laboratorio

Se utilizaron los siguientes tipos de gasolinas:

- 1.- Gasolina de 97 I.O. con plomo (súper)
- 2.- Gasolina de 95 I.O. sin plomo (eurosúper)
- 3.- Gasolina de 98 I.O. sin plomo (superplus)

El estudio experimental se llevó a cabo en una instalación cuyo esquema se expone en la Fig. 1.

En todos los casos se conectó a la instalación un elemento de difusión que permitía la vaporización de los componentes volátiles de la gasolina que se estaba ensayando. La vaporización se realizaba en condiciones de temperatura controlada mediante un termostato eléctrico conectado al sistema de calefacción del horno. Para cada tipo de gasolina se realizaron experiencias a cuatro niveles de temperatura. Una vez estabilizada la atmósfera dinámica generada en cada caso, se recogieron dos series de 4 muestras mediante la aspiración de volúmenes variables de aire procedentes de la atmósfera que se hicieron pasar a través de tubos de vidrio rellenos con un lecho de 100 mg de carbón activo (20/40 mallas). La medición del flujo de muestreo a través de cada tubo, se realizó mediante un flujómetro digital conectado en serie a cada línea de muestreo. Tras la captación se realizó la desorción con sulfuro de carbono del carbón activo y se analizaron las muestras por cromatografía de gases con detector de FID. La concentración ambiental de benceno se calculó en función de la masa analizada en cada muestra y el volumen de aire que se hizo pasar por el tubo.

En la Fig. 2 se representan los niveles de benceno en aire correspondientes a los diferentes tipos de gasolina ensayados. En todos los casos se observó un incremento en función de la

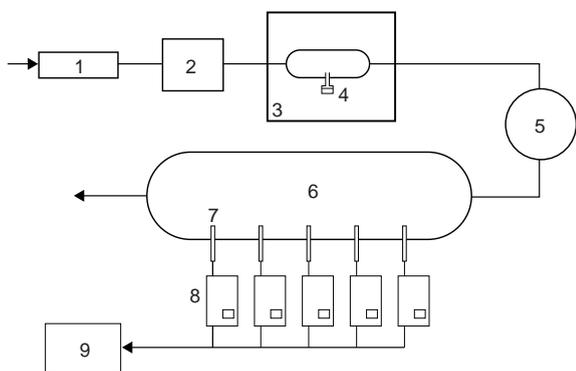


Fig. 1. Cámara de generación de atmósferas controladas. 1.Filtro; 2.Humidificador; 3.Horno; 4.Elemento de difusión; 5. Cámara de mezcla; 6. Cámara de muestreo; 7. Tubos de carbón activo; 8. Flujómetros digitales; 9. Bombas de muestreo.

temperatura dentro del intervalo de temperaturas ensayado, que, por otro lado corresponde a variaciones típicas de la temperatura ambiente. Por tanto, los vapores de gasolina saturados a la temperatura del depósito de combustible, tendrán una concentración creciente de benceno en función de la temperatura ambiente.

Exposición laboral

La exposición laboral a vapores de benceno en operarios de estaciones de servicio se debe, fundamentalmente, a la inhalación del aire procedente del depósito que es desplazado por el combustible y que, a su vez, pasa muy cerca de las vías respiratorias de los operarios que realizan dicha tarea. Como ya se ha comentado anteriormente los niveles de benceno en este aire dependerán de la temperatura a que se encuentre la gasolina en el depósito de combustible del automóvil. Por otro lado, la dosis total recibida a lo largo de la jornada de trabajo también dependerá del número de veces que se realice esta tarea, es decir del volumen total de gasolina despachada a lo largo de la jornada de trabajo.

Para confirmar esta hipótesis y estudiar la influencia que pudieran tener en la exposición ocupacional las condiciones climáticas de las diferentes épocas del año, se diseñó una serie de experiencias para evaluar la exposición a benceno de 21 operarios de estaciones de servicio a lo largo de una jornada laboral de 8 horas diarias. El estudio se llevó a cabo en 5 estaciones de servicio localizadas en los alrededores de la ciudad de Murcia, en una área geográfica reducida en la que se encontraba situado además un observatorio meteorológico. Las muestras se recogieron en marzo y julio, para que las temperaturas ambientales fueran diferentes. En ambos períodos las muestras se recogieron los mismos días de la semana en jornada de mañana y tarde. También se recogieron datos sobre el volumen de gasolina despachada en cada turno.

El muestreo personal se realizó con muestreadores difusivos 3M-3500, localizados en la proximidad de las vías respiratorias, durante toda la jornada laboral. Una vez analizados por cromatografía de gases, se calculó la concentración ambiental media de benceno a lo largo de toda la jornada en función de la masa analizada y una constante característica del muestreador denominada U, que depende de las características del diseño geométrico del mismo y del coeficiente de difusión del benceno[19]. En la Tabla 1 se muestran las condiciones experimentales de muestreo y los resultados obtenidos para el benceno.

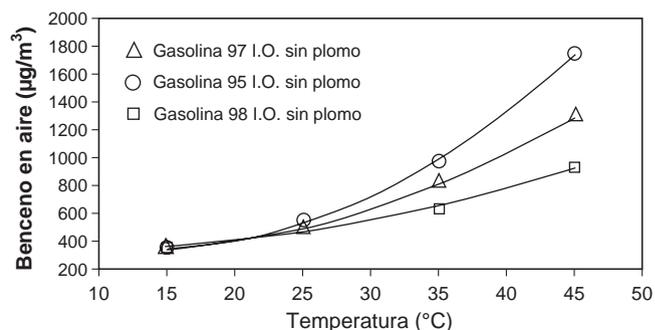


Fig. 2. Concentración ambiental de benceno en función de la temperatura.

Tabla 1. Evaluación de la exposición laboral a benceno en personal de estaciones de servicio.

	Turno	Nº de muestras	Muestreo (min)	Temperatura ambiente	Gasolina expendida (L)	Concentración de benceno valor medio e intervalo (µg/m³)
Marzo	Mañana	10	375-390	14° C	589-3454	551 (104-897)
Marzo	Tarde	11	345-450	15° C	700-2676	472 (164-774)
Marzo	Total					511 (104-897)
Julio	Mañana	11	370-455	28° C	936-3006	726 (281-1515)
Julio	Tarde	10	370-450	30° C	1172-3355	746 (272-1603)
Julio	Total					736 (272-1603)

Tabla 2. Evaluación de la exposición laboral a benceno en personal de estaciones de servicio (1ª y 2ª fase).

	Fase del estudio	Nº de muestras	Muestreo (min)	Temperatura ambiente	Gasolina expendida (L)	Concentración de benceno valor medio e intervalo (µg/m³)
1995	Primera	21	370-445	28-30°C	936-3355	736 (272-1603)
2000	Segunda	28	450	30.7°C	150-5000	241 (115-453)

Las concentraciones de benceno en aire en todos los casos fueron superiores en el mes de julio, sin embargo como el volumen de gasolina despachado puede influir notablemente en los niveles de concentración de benceno en aire, analizamos la relación existente entre esta concentración y el volumen de gasolina vendido por cada operario durante el período de tiempo muestreado.

En la Fig. 3 se representa esta relación lineal así como los parámetros de la recta de regresión. Como se puede observar, existe una relación estadísticamente significativa entre los niveles de benceno en aire y el volumen de gasolina despachado en los dos períodos.

Una vez confirmada la relación entre los niveles de benceno en aire y el volumen de gasolina expendida, se normalizaron los resultados de concentración en aire dividiendo, en cada caso, por el volumen de gasolina expendida. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza para analizar la influencia neta de la temperatura en los niveles ambientales de benceno entre los dos períodos estudiados, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos, marzo con temperaturas ambientales entre 14-15 °C y julio, con temperaturas entre 28-30°C. Ambos niveles de temperaturas son muy comunes en nuestro país.

Segunda Fase

Exposición laboral

En esta segunda fase se evaluó la exposición de 28 trabajadores de estaciones de servicio, durante la época correspondiente al período cálido de la primera fase. También se recogieron datos sobre el volumen de gasolina expendida en cada turno y la temperatura ambiente correspondiente al día de muestreo. El muestreo personal se realizó con muestreadores difusivos 3M-3500, localizados en la proximidad de las vías respiratorias, durante toda la jornada laboral. Las muestras se analizaron de forma similar a la descrita en la primera fase. En la Tabla 2 se muestran las condiciones experimentales de muestreo y los resultados obtenidos para el benceno, en esta segunda fase, así como los obtenidos en la primera.

En este caso también se analizó la relación existente entre los niveles de concentración ambiental de benceno y el volumen de gasolina expendido. En la Fig. 4 se representa gráficamente esta relación, junto con la correspondiente a la primera fase del estudio.

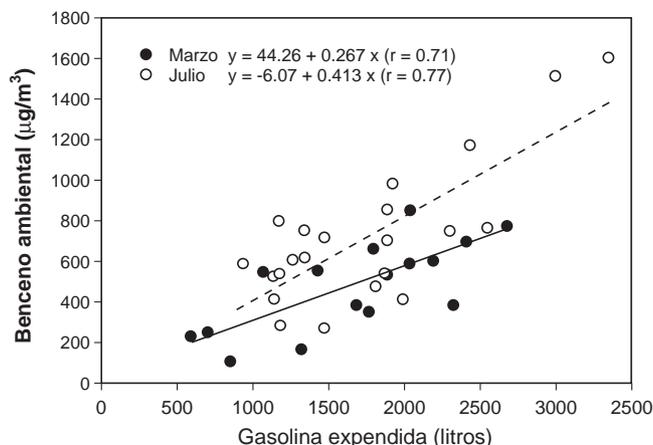


Fig. 3. Relación entre la concentración ambiental de benceno y el volumen de gasolina dispensada.

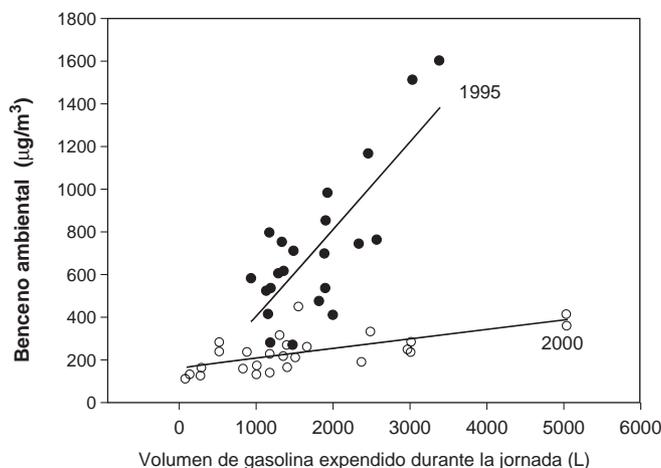


Fig. 4. Relación entre los niveles de concentración de benceno en aire y el volumen de gasolina expendido en ambas fases del estudio.

En ambos períodos la correlación existente entre la concentración ambiental y el volumen expendido de gasolina fue estadísticamente significativa. Sin embargo la pendiente de la recta de regresión correspondiente al año 2000, fue sensiblemente inferior a la del año 1995, en condiciones de temperatura ambiental similares. Esto indica que para un mismo volumen de gasolina despachado, los niveles de concentración ambiental de benceno fueron sensiblemente inferiores.

Para confirmar este extremo también se normalizaron los resultados de concentración de benceno en aire, dividiendo en cada caso la misma por el volumen de gasolina expendida. Siendo los valores medios de los resultados normalizados 42,7 en el período de 1995 y 26,6 en el del 2000. Se puede apreciar una disminución de los niveles de benceno en aire en las muestras recogidas en la segunda fase, que tras realizar un análisis de varianza, resultó estadísticamente significativa.

Control biológico de una población laboralmente expuesta

También se realizó en la segunda fase un control biológico de la exposición laboral, mediante la determinación de benceno inmetabolizado en la orina al final del período de exposición. De cada muestra de orina se trasvasó un volumen de 2.5 ml a un vial de 4 ml herméticamente cerrado para su análisis inmediato; cuando no se pudo efectuar inmediatamente, se congelaron las muestras. El análisis se llevó a cabo mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) utilizando una fibra de polidimetilsiloxano. La muestra se acondicionó a 15 °C durante un minuto en baño termostatzado, posteriormente la fibra se introdujo en el espacio de cabeza del vial durante 1 minuto y después se introdujo en el bloque de inyección del cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas durante 2 min a una temperatura de 200 °C, en modo splitless. Los parámetros analíticos fueron los siguientes: Columna HP1 MS de 50 m /0.25 mm / 1mm. Temperatura del horno, 40 °C durante 2 minutos hasta 100 °C a 8 °C/min. Detección en modo SIM focalizando el ión molecular 78.

La población estudiada estaba compuesta por 31 trabajadores (21 hombres y 10 mujeres) con edades comprendidas entre 20 y 54 años. En todos los casos se muestreó la concentración ambiental durante la jornada completa previa a la recogida de la muestra de orina, mediante muestreadores pasivos por difusión 3M-3500. En la Tabla 3, se recogen los resultados del control ambiental y biológico

Se analizó la relación entre ambas variables, concentración de benceno en aire ambiental y en orina mediante un análisis de regresión lineal. En la Fig. 5 se muestra la correlación entre ambos valores y los parámetros de la recta de regresión. Existe

Tabla 3. Concentración de benceno en aire y orina en la población expuesta.

	Benceno en aire ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Benceno en orina (ng/ml)
Media	233.2	328.3
Mediana	231.2	308.0
Máximo	404.0	795.5
Mínimo	72.5	40.1
Error estándar	14.5	35.4
Media geométrica	218.8	263.2

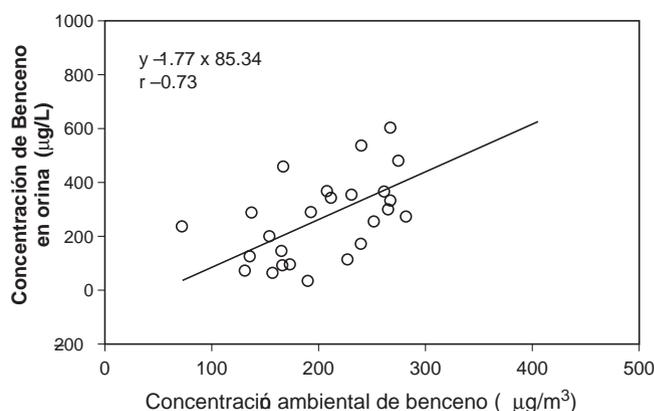


Fig. 5. Relación entre las concentraciones ambiental y urinaria de benceno.

una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de benceno ambiental y los niveles urinarios del mismo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La emisión de vapores de benceno en las estaciones de servicio se produce en dos ocasiones. En primer lugar, en la operación de rellenado de los tanques que abastecen a los surtidores desde las cisternas de transporte. En esta operación se vierte a la atmósfera, a través de los respiradores de dichos tanques, un volumen de aire saturado de vapor de benceno idéntico al volumen de combustible que se trasvasa. Los respiraderos de dichos tanques están a una altura superior a 3 metros y es presumible una rápida dilución en el aire ambiental. Por tanto esta operación contribuye fundamentalmente a la contaminación ambiental. En segundo lugar, se produce la operación de repostado de vehículos, con la consiguiente exposición laboral analizada en este trabajo.

Con objeto de prevenir los riesgos derivados de esta exposición laboral se desarrollaron, y fueron adoptados por algunos países, procedimientos concretos para minimizar el problema. Estas medidas consistían en dotar a las mangueras de suministro de un ajuste flexible y hermético a la boca del depósito de combustible del vehículo, así como una doble tubuladura, una de las cuales conducía el combustible al depósito del vehículo mientras que la otra recogía los gases emanados del mismo, que el cierre hermético impedía que fueran a la atmósfera, para reconducirlos de nuevo al propio tanque. También ha contribuido a minimizar el problema de la exposición laboral la tendencia comercial de abastecimiento de vehículos mediante autoservicio.

Sin embargo, los elevados índices de contaminación ambiental detectados en las ciudades, motivaron la publicación de la Directiva Europea que limitaba el contenido de benceno en gasolinas y su transposición a nuestra legislación nacional [8]. Mediante esta disposición legal, que entró en vigor el 1 de enero del año 2000 regulando las especificaciones de las gasolinas en nuestro país, se establece como límite máximo para el contenido en benceno de las gasolinas de automoción una concentración del 1% (v/v). Por tanto, de forma colateral, esta limitación legal cuyo objetivo era preservar las condiciones medioambientales, ha contribuido de forma decisiva a mejorar las condiciones de trabajo de la población que atiende las estaciones de servicio.

Así, los niveles de benceno en aire, normalizados en función del volumen de gasolina dispensado, se han reducido prácticamente a la mitad en la segunda etapa, tras la entrada en vigor de la norma legal anteriormente citada, lo cual es un indicador objetivo de la disminución cuantitativa de la concentración de benceno en el entorno laboral del personal que atiende las estaciones de servicio. De la evaluación individual de la exposición para cada uno de los trabajadores que participaron en el estudio se deduce que, mientras que en la primera fase el 20% de los trabajadores superaba el valor límite TLV-TWA propuesto para el benceno, de 960 mg/m³, en la segunda fase toda la población estaba expuesta a concentraciones de benceno por debajo de ese mismo valor límite de referencia.

Para el control biológico de la exposición a benceno se vienen utilizando como biomarcadores los metabolitos urinarios, tales como el ácido trans, trans-mucónico [20-22] y el ácido S-fenilmercapturico [23, 24], así como la concentración de benceno en sangre [25]. Sin embargo recientemente se están proponiendo biomarcadores basados en la determinación de los compuestos inmetabolizados en orina. El procedimiento de control biológico utilizado en nuestro trabajo, basado en la utilización de la concentración de benceno en orina como biomarcador de exposición, es una buena herramienta para estimar la dosis interna de benceno. Se ha obtenido una buena correlación entre los valores ambientales y biológicos, similares a la obtenida en estudios similares [26]. Este procedimiento permite determinar la concentración de benceno urinario de trabajadores expuestos a dosis equivalentes a la exposición durante 8 horas a 300 mg/m³, valor límite ambiental más bajo de los propuestos para benceno por la ACGIH. En nuestro caso, el 70% de la población estudiada presenta valores urinarios equivalentes a concentraciones ambientales de benceno inferiores a 300 mg/m³, cuando los valores límites VLA-ED y TLA-TWA actuales, son 9700 y 1600 mg/m³, respectivamente. Por tanto, el procedimiento descrito permite detectar y evaluar la concentración de benceno en orina como marcador biológico de exposición laboral al mismo, llegando a evaluar niveles biológicos equivalentes a exposiciones ambientales cinco veces inferiores al valor límite ambiental más exigente.

Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 29, 1982.
2. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. TLVs: Threshold Limit Values and Biological Exposures Indices for 2001.
3. Deutsche Forschungsgemeinschaft Comisión for the Investigation of Health Hazards of Chemicals Compounds in the Work Area. Maximum Concentration and Biological Tolerance Values at the Workplace for 2001.
4. Hayes, R.B. Songnian Y. Dosemeci M. Linet M. (2001) Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans *Am J Ind Med* 40:117-126.
5. Tondel, M. Persson, B. Carstensen, J. (1995) Myelofibrosis and benzene exposure *Occup Med* 45:51-52.
6. Swaen, G.M. Slangen, J.J. (1995) Gasoline consumption and leukaemia mortality and morbidity in 19 European countries: an ecological study. *Int. Arch. Occup. Environ Health*. 67: 85-93.
7. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. 2000-2001. INSHT. 2001.
8. R.D. 1728/1999 de 12 de noviembre del Ministerio de Industria y Energía sobre fijación de especificaciones de los gasoleos de automoción y las gasolinas. BOE nº 272/1999.
9. Javelaud, B. Vian, L. Molle, R. Allain, P. Allemand, B. Andre, B. Barbier, F. Churet, A. *et al.* (1998) Benzene exposure in car mechanics and road tanker drivers. *Int Arch Occup Environ Health* 71:277-283.
10. Liljelind, I.E. Sromback, A.E. Jarvholm, B.G., Levin J.O. Strangert, B.L. Sunesson, A.L. (2000) Self-assessment of exposure - a pilot study of assessment of exposure to benzene in tank truck drivers. *Appl. Occup Environ Hyg* 15:195-202.
11. Peretz, C. Froom, P. Pardo, A. Goren, A. (2000) Exposure to benzene in fuel distribution installations: monitoring and prevention. *Arch Environ Health* 55: 439-496.
12. Carere, A. Antoccia, R. Crebelli, F. Degrassi, F. *et al.* (1995). Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants. *Mutat-res.* 332: 17-26.
13. Moen, B.E. Hollund B.E. Berntsen M. Flo R. Kyvic K.R. Riise, T. (1995) Exposure of the deck crew to carcinogenic agents on oil product tankers. *Ann Occup Hyg* 39:347-361.
14. Vainiotalo, S. Peltonen Y. Ruonakangas A. Pfaffli P. (1999) Customer exposure to MTBE, TAME, C6 Alkyl methyl ethers and benzene during gasoline refuelling.
15. Egeghy, P.P. Tornero-Velez, R. Rappaport, S.M. (2000) Environmental and biological monitoring of benzene during self-service automobile refuelling. *Environ Health Perspect* 108:1195-1202.
16. Periago J.F. Zambudio A. Prado. C (1997) Evaluation of environmental levels of aromatic hydrocarbons in gasoline service stations by gas chromatography *J.Chromatogr. A* 778:263-268
17. Phurdan J.T. Sass-Kortsak A.M. Bozek P.R. (1994). Comparison of charcoal tubes and passive organic vapour disimeter as sample collection devices of gasoline vapours. *Ann Occup Hyg* 38: 721-727.
18. Coker D.T. van den Hoed N. Saunders K.J. Tindle P.E. (1989) A monitoring method for gasoline vapour giving detailed composition. *Ann. Occup. Hyg.* 33: 15-21.
19. 3M Organic Vapour Monitor, sampling and Analysis Guide 1993.
20. Wiwanitkit, V. Suwansaksri, J. Nasuan, P. (2001) Urine trans,trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure in gas station attendants in Bangkok, Thailand. *Ann Clinic Lab Sci* 31:399-401.
21. Sanguinetti, G. Accorsi, A. Barbieri, A. Raffi, G.B. Violante, F.S. (2001) *J.Toxicol Environ Health* 63:599-604.
22. Laghorio, S. Crebelli, R. Ricciarello, R. Conti, L. Iavarone, I. Zona, A. Ghittori, S. Carere, A. (1998) Methodological issues in biomonitoring of low level exposure to benzene. *Occup Med* 48:497-504.
23. Verdina, A. Galati, R. Falasca, G. Ghittori, S. Imbriani, M. Tomei, F. Marcellini, L. Zijno, A. Vecchio, V.D. (2001) Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J. Toxicol Environ Health* 64:607-618.
24. Maestri, L. Mestad, I.J. Pezzagno, G. (1999) Mercapturati e monitoraggio biológico: benzene (1999) *G.Ital.Med. Lav Ergon* 21:323-328.
25. Brugnone, F. Perbellini, L. Romeo, L. Cerpelloni, M. Bianchin, M. Tonello, A. (1999) Benzene in blood as a biomarker of low level occupational exposure. *Sci Total Environ* 235:247-252.

26. Waidyanatha, S. Rothman, N. Fustinoni, S. Smith, M.T. Hayes, R.B. Bechtold, W. Dosemici, M. Guilan L. Yin, S. Rappaport, S.M.(2001) Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis* 22:279-286.

SCREENING DE DROGAS DE ABUSO EN SANGRE TOTAL MEDIANTE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO CEDIA ORIGINALMENTE DISEÑADO PARA EL ANÁLISIS DE ORINA. APLICACIÓN A CASOS FORENSES.

R. García, E. Moreno, T. Soriano, I. Roca y M. Menéndez. Instituto Nacional de Toxicología. Apdo. 863, 41080 Sevilla.

Resumen: El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método para detectar la presencia de drogas de abuso en sangre mediante la aplicación de la técnica de inmunoensayo enzimático CEDIA (cloned enzyme donor immunoassay) originalmente desarrollado para el análisis de orina. Las drogas de abuso que se analizaron fueron: anfetaminas, benzodiazepinas, cannabis, cocaína y metabolitos, metadona, y opiáceos. Para calcular el número de falsos positivos y falsos negativos de esta técnica, se compararon los resultados obtenidos mediante inmunoensayo con los resultados cromatográficos. La utilidad principal de esta técnica es la realización del screening de drogas de abuso en sangre cuando no existe una muestra de orina. Se estudiaron 375 casos forenses.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la mayoría de los laboratorios forenses realizan el screening de drogas de abuso mediante técnicas de inmunoensayo debido a que dichas técnicas presentan una elevada sensibilidad y son rápidas de realizar [1]. Estas técnicas, por lo general, han sido desarrolladas para el análisis de orina. En ocasiones, ello puede suponer un inconveniente para los laboratorios forenses ya que reciben continuamente un gran número de muestras de sangre. Esta situación puede empeorar cuando la única muestra de la que se dispone sea la sangre, como es frecuente en los casos de accidentes de tráfico. Por ello, existe la necesidad de desarrollar un método fiable de screening de drogas de abuso en sangre para los casos de los que no se disponga de la muestra de orina.

La primera aplicación de una técnica de inmunoensayo a un fluido biológico distinto de la orina la publicó Slighton en 1978 [2]. Desde entonces, la comunidad toxicológica ha manifestado un gran interés hacia la ampliación de la aplicación de los inmunoensayos a diversas muestras biológicas como pueden ser: suero, sangre total, bilis, humor vítreo y tejidos [3].

La extensión de la aplicación de los inmunoensayos a las muestras de sangre supone una modificación de los procedimientos utilizados en el análisis de orina ya que las muestras de sangre total no pueden ser analizadas de forma directa debido a que presentan altos niveles de absorbancia que interfieren con las medidas a realizar. Por tanto, es necesaria una preparación de la muestra antes de someterla al análisis inmunoenzimático, cosa que no ocurre cuando se analizan las muestras de orina [4].

Durante los dos últimos años nuestro laboratorio ha aplicado un método de inmunoensayo para la determinación semicuantitativa de anfetamina, benzodiazepinas, cannabis, metabolitos de la

cocaína (benzoilecgonina), metadona y opiáceos en sangre total procedente de personas que habían fallecido en accidentes de tráfico. En todos los casos el inmunoensayo CEDIA fue empleado como técnica de screening. Los resultados obtenidos se confirmaron mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta resolución. Estas dos últimas técnicas fueron utilizadas en la cuantificación de las sustancias encontradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microgenics (Boehringer Mannheim Corp., Mannheim, Alemania) suministró todos los reactivos y calibradores para inmunoensayo CEDIA. Las columnas de extracción en fase sólida Bond-Elut certificadas se compraron a Varian (Harbor City, CA, USA). β -glucuronidasa, BSTFA y nalorfina se compraron a Sigma-Aldrich (St.Louis, MS,USA). Todas las sustancias analizadas y cuantificadas se compraron a Radian International (Austin, TX, USA).

Microgenics (Boehringer Mannheim Corp., Mannheim, Alemania) suministró un analizador Hitachi 902 que opera en el modo de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. Las instrucciones suministradas por los fabricantes para el análisis de drogas de abuso en orina se cumplieron en todo momento.

La tecnología CEDIA utiliza la enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) como marcador de la presencia de una droga de abuso en una muestra analizada. El fundamento de este inmunoensayo consiste en controlar el ensamblaje espontáneo de un donante con un aceptor enzimático mediante una reacción antígeno-anticuerpo [1]. Al medio de reacción se le añade también un sustrato del enzima, ya que la cantidad de enzima libre formado se medirá como un cambio de absorbancia ($\lambda = 570$ nm) producido debido a su reacción con dicho sustrato. El cambio de absorbancia producido será proporcional a la concentración de droga en la muestra.

Se calibró el analizador utilizando los calibradores "cut-off" CEDIA suministrados por el fabricante [5]. En cada lote de muestras analizadas se incluyeron unas muestras de control de calidad, siendo el instrumento recalibrado cuando dichas muestras control no proporcionaban resultados que estuvieran dentro del criterio de calidad de $\pm 25\%$ del valor de la concentración del punto de corte. Se efectuaron estudios de precisión "intra-day" repitiendo el análisis de los controles bajos y altos durante 21 días. La precisión "between-day" se determinó calculando la media de los ensayos realizados con los controles altos y bajos 3 veces al día, dos veces al mes, durante seis meses.

El análisis CEDIA de las muestras de sangre total se efectuó del modo siguiente: a 1 mL de sangre total se le añaden 2 mL de acetona mientras se agita de forma continua. El tubo se cierra y se agita de forma vigorosa durante 1 minuto, luego se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se traspara a un tubo limpio. El sobrenadante se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Los residuos secos, así obtenidos, se reconstituyen con 300 μ L de solución salina (NaCl, 0.9%). Las muestras fueron analizadas siguiendo las instrucciones del fabricante para el análisis de las muestras de orina.

En total se analizaron 375 casos forenses que se corresponden con personas fallecidas en accidentes de tráfico. Las muestras de sangre fueron enviadas a nuestro laboratorio por el médico