

## Condensado de aire espirado: estandarización de la recogida de muestras en voluntarios sanos

J.B. de Lema, M. González, L. Vigil y P. Casan

Unitat de Funció Pulmonar. Departament de Pneumologia. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

El condensado de aire espirado (CAE) es una técnica no invasiva que permite la obtención de un conjunto de sustancias que expresan el estado funcional del pulmón y otros tejidos. A 20 voluntarios sanos se les realizó un total de 3 pruebas a cada uno: una primera recogida, seguida de otra a los 20 min y la última a las 48 h de la inicial. Al final de la prueba se estimaron el volumen de muestra de condensado obtenida y el volumen de aire movilizado. La media ( $\pm$  desviación estándar) del volumen de muestra de CAE recolectado en 15 min fue de  $1,8 \pm 0,5$  ml, con un intervalo de confianza (IC) del 95% de 1,5 a 2 ml y un coeficiente de variación del 29%. El análisis de la variancia entre las 3 muestras analizadas no mostró diferencias estadísticamente significativas. La media del volumen de aire inspirado en los 15 min fue de  $119 \pm 25$  l, con un IC del 95% de 112 a 125 l. Nuestros resultados indican que para obtener un volumen de muestra superior a 1,5 ml son necesarios al menos 15 min de recogida y haber movilizado unos 120 l de aire, lo que permite la distribución en alícuotas para analizar los componentes físicos y químicos básicos (conductividad, pH) y ciertos biomarcadores de interés.

**Palabras clave:** Condensado de aire espirado. Inflamación. Técnica no invasiva

### Introducción

El aire que espiramos está cargado básicamente de vapor de agua y de un conjunto de moléculas que expresan la situación funcional del pulmón y de otros tejidos. Estas moléculas (volátiles o no) pueden analizarse mediante la condensación del aire espirado haciéndolo pasar por un circuito frío. La obtención del condensado de aire espirado (CAE) es una técnica sencilla, no invasiva, que requiere poca colaboración por parte del paciente (de especial interés para su uso en pediatría y geriatría), reproducible en el tiempo, con períodos de recogida cortos, que no necesita de instalaciones especiales ni de personal particularmente entrenado y que se realiza con instrumental portátil y con un bajo coste<sup>1</sup>. Este procedi-

### Exhaled Breath Condensate: Standardized Collection of Samples From Healthy Volunteers

Expired breath condensate collection is a noninvasive technique for obtaining a sample in which to analyze substances that reflect the functional status of the lung and other tissues. Twenty healthy volunteers provided 3 expired breath samples: the second was collected 20 minutes after the first and the third 48 hours after the first. The air and condensate volumes were assessed. The mean (SD) volume of condensate in exhaled air over a period of 15 minutes was 1.8 (0.5) mL (95% confidence interval [CI], 1.5-2 mL) and the coefficient of variation was 29%. Analysis of variance in the 3 samples demonstrated no significant differences. The mean volume of air inhaled over 15 minutes was 119 (25) L (95% CI, 112-125 L). These results indicate that it takes at least 15 minutes and the inhalation of some 120 L of air to collect a condensate volume that exceeds 1.5 mL, sufficient to allow distribution in aliquots to analyze fundamental physical and chemical properties (conductivity, pH) and certain relevant biomarkers.

**Key words:** Exhaled breath condensate. Inflammation. Noninvasive technique

miento se desarrolló inicialmente en el ámbito de la antigua URSS, en la década de los ochenta<sup>2,3</sup>, pero su difusión se consiguió a partir de los trabajos del grupo de Kharitonov y Barnes<sup>4</sup> a finales de los años noventa. En España hace poco tiempo que se introdujo esta técnica y existe un interés particular por disponer de una estandarización de la recogida de las muestras<sup>5</sup>.

El CAE ha generado expectativas en el estudio de la patología inflamatoria pulmonar, sin que existan suficientes fuentes de evidencia sobre la estandarización de la recogida de la muestra y la validación del análisis de los biomarcadores existentes en ella, tanto en individuos sanos como en enfermedades pulmonares o sistémicas. La búsqueda de una aplicación clínica inmediata de la técnica ha producido cierta confusión sobre cómo recoger, almacenar y procesar las muestras del CAE.

El objetivo del presente trabajo ha sido validar la técnica de recogida de muestras de CAE en individuos sanos, comparando las diferencias intraindividuales y a las 48 h, así como establecer las bases del procedimiento de recogida para su uso en nuestro ámbito neumológico.

Financiado por Red Respira-ISCIH-SEPAR.

Correspondencia: Dr. J.B. de Lema.  
Unitat de Funció Pulmonar. Departament de Pneumologia. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau.  
Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.  
Correo electrónico: jbruno@hsp.santpau.es

Recibido: 14-9-2004; aceptado para su publicación: 12-1-2005.



Fig. 1. Equipo EcoScreen-Jaeger (cabezal en la parte superior de la figura).

### Material y métodos

Se estudió a un total de 20 voluntarios sanos, que aceptaron libremente su participación en el estudio. Los criterios de inclusión fueron: edad superior a 18 años, sin antecedentes de enfermedad pulmonar previa y con examen físico normal. Los criterios de exclusión fueron: ser fumador activo y presentar enfermedad pulmonar actual o una enfermedad crónica conocida. El protocolo fue aceptado por el Comité de Ética del centro.

#### *Protocolo de recogida del condensado de aire espirado en voluntarios sanos*

La recogida de las muestras se realizó siempre en un mismo ambiente del laboratorio, con una temperatura de 20-25 °C y con una humedad relativa del 50-60%. Los voluntarios no habían ingerido alimentos en las 2 h previas ni recibido ninguna medicación en las 24 h anteriores. La recogida de las muestras se realizó con el equipo EcoScreen (Jaeger, Alemania) (fig. 1). Para la medición del volumen inspirado se utilizó el aparato Wright Respirometer MARK 8 (Reino Unido). Se realizó un total de 3 pruebas a cada individuo: una primera recogida, seguida de otra a los 20 min y la última a las 48 h de la inicial. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Poner en marcha el equipo.
- Colocar el cabezal en el núcleo frío.
- Esperar 20 min para que descienda la temperatura del núcleo frío.
- Indicar al individuo que debe limpiar la cavidad oral con agua destilada, enjuagando y escupiendo en repetidas oportunidades.

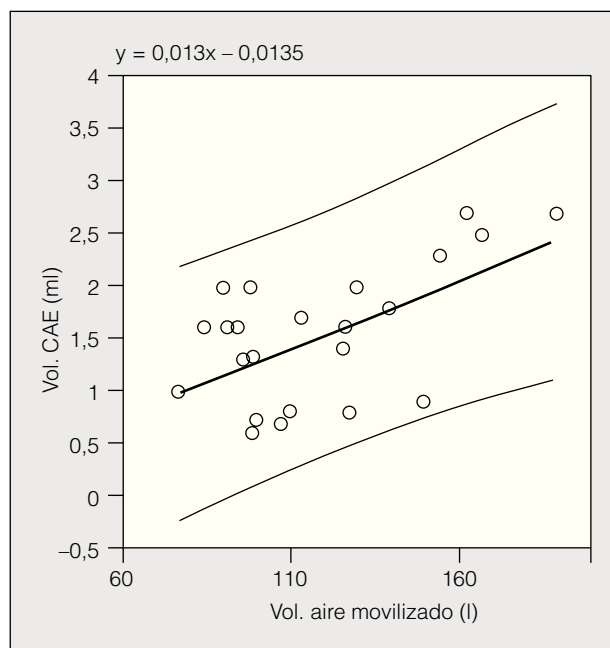


Fig. 2. Regresión lineal de la relación del volumen de condensado de aire espirado (CAE) y el volumen de aire movilizado.

- Sentarle cómodamente.
- Colocar la boquilla y las pinzas nasales.
- Conectar el medidor de volumen a la línea inspiratoria.
- Pedir al paciente que respire de manera pausada.
- Iniciar la cuenta de 15 min.
- Medir el volumen inspirado cada 3 min.
- En el minuto 6, retirar las pinzas, descansar y escupir la saliva acumulada.
- Reiniciar la medida hasta el minuto 15.
- Medir el volumen resultante de muestra.
- Pasar a la separación por alícuotas de la muestra.
- Congelar la muestra a -80 °C.

### Resultados

La edad media ( $\pm$  desviación estándar) de los 20 individuos (15 varones y 5 mujeres) que participaron en el estudio era de  $39 \pm 9$  años, la talla de  $167 \pm 8$  cm y el peso de  $71 \pm 11$  kg.

La media del volumen de muestra de CAE recogido en 15 min fue de  $1,8 \pm 0,5$  ml, con un intervalo de confianza del 95% de 1,5 a 2 ml y un coeficiente de variación del 29%. El análisis de la variancia entre las 3 muestras analizadas no mostró diferencias estadísticamente significativas. Los valores promedio de cada período de recolección se resumen en la tabla I.

TABLA I  
Volumen de condensado de aire aspirado obtenido en las 3 determinaciones realizadas

	Primera	Segunda	Tercera
Media $\pm$ desviación estándar (ml)	$1,7 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,5$
Intervalo de confianza del 95%	1,5-1,9	1,5-2	1,5-2
Coefficiente de variación (%)	29	30	30

La media del volumen de aire inspirado en los 15 min fue de  $119 \pm 25$  l, con un intervalo de confianza del 95% de 112 a 125 l. El volumen de CAE recogido se relacionó directamente con la ventilación de cada individuo (fig. 2) mediante la siguiente ecuación:

Volumen CAE (ml) =  $0,013 \text{ ventilación (l)} + 0,255$ .  
( $R = 0,6$ ;  $p < 0,0001$ .)

## Discusión

Nuestros resultados indican que para obtener un volumen de muestra superior a 1,5 ml son necesarios al menos 15 min de recogida y haber movilizadounos 120 l de aire, lo que permite la distribución en alícuotas para analizar los componentes físicos y químicos básicos (conductividad, pH) y ciertos biomarcadores de interés.

Las diferencias observadas entre las 3 determinaciones no mostraron significación estadística y el volumen de líquido obtenido está directamente relacionado con la ventilación.

En los últimos años han aparecido en la bibliografía diversas publicaciones orientadas a la aplicación clínica del CAE, básicamente en el área de la inflamación pulmonar<sup>1</sup>. Por otra parte, se ha llamado repetidamente la atención sobre la necesidad de estandarizar este procedimiento de una forma adecuada, aunque hasta la actualidad no se ha caracterizado suficientemente ni se dispone de valores de referencia validados<sup>6</sup>.

Otro aspecto de interés lo constituye el hecho de conseguir que la muestra de CAE sea lo más rica posible en biomarcadores. Este problema, asociado a la dilución de la muestra, implicará en el futuro modificaciones en el procedimiento de recogida, como el enriquecimiento mediante aire inspirado humidificado o la concentración de la muestra mediante técnicas como el liofilizado<sup>7,8</sup>.

Los mecanismos por los cuales pasan al CAE los elementos volátiles y no volátiles del pulmón son diversos. En primer lugar, las turbulencias generadas durante el paso del aire generan la energía suficiente para desprender moléculas de las paredes de las vías respiratorias. La concentración de algunos de los elementos más frecuentemente medidos en el CAE (peróxido de hidrógeno) depende del flujo aéreo generado durante la prueba, mientras que otros componentes (8-isoprostano y etanol) no dependen del flujo<sup>1</sup>. Otro de los mecanismos implicados en la obtención de CAE es el efecto Venturi, que se produce a partir de la apertura y cierre bronquial y alveolar, aunque este mecanismo es poco conocido<sup>1</sup>.

Otra de las variables a considerar en la estandarización del procedimiento es la diversidad de equipos disponibles. En España existe la posibilidad de utilizar el equipo EcoScreen, empleado en este estudio y en la ma-

yoría de las publicaciones internacionales, o el prototipo Anacon, comercializado por Biostec (Valencia, España) y utilizado por diversos grupos de investigadores en nuestro país. Las características que debería garantizar cualquiera de los equipos utilizados son la capacidad de generar una muestra de condensado suficiente para ser analizada y disponer de los controles externos de temperatura y humedad. Sería deseable disponer de variables ventilatorias, ya que modifican el volumen final de la muestra. El flujo aéreo también modificará el tipo de biomarcadores en el CAE. Ningún equipo comercial incluye estas opciones y se deberán adquirir otros módulos que midan parámetros ventilatorios. En su ausencia, la determinación del tiempo de recogida es una estrategia válida para poder asegurar un volumen de CAE aceptable. Al mismo tiempo, los materiales utilizados deben ser inertes, cómodos, fáciles de manipular y de limpiar.

El efecto de la contaminación nasal de la muestra final y la necesidad o no de emplear pinzas nasales durante la recogida, así como el efecto de la contaminación saliva, no se han estudiado suficientemente. Tampoco disponemos de estudios de variabilidad y reproducibilidad de la mayoría de los elementos analizados. La interpretación clínica de muchos de estos hallazgos tampoco ha sido suficientemente comprobada<sup>1</sup>.

El método de obtención de muestras de CAE necesita de al menos unos 15 min o movilizar aire suficiente para generar un volumen de muestra adecuado. La reproducibilidad del procedimiento para generar este volumen es suficientemente satisfactoria. Serán necesarias nuevas determinaciones y con nuevas variables para completar la estandarización del procedimiento de obtención de CAE.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hunt J. Breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin. Immunol.* 2002;110:28-34.
2. Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI. Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Ter Arkh.* 1980;52:65-8.
3. Iakovleva OA. The diagnostic potentials of studying the condensate of expired air. *Ter Arkh.* 1990;62:102-7.
4. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1693-722.
5. De Lema JB, González N, Calaf N, Feixas T, Casan P, Belda J, et al. Estandarización del procedimiento de recogida de muestras de condensado de aire espirado (CAE). *Arch Bronconeumol.* 2004;40 Supl:4.
6. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:731-7.
7. Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers.* 2002;7:1-32.
8. Griese M. Exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol.* 2004;26 Suppl:14-5.