

Artículo traducido por Claudia Paris Cortes, Traductora Oficial tomado del artículo Diagnostic Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers

Precisión del diagnóstico de Detección Canina a través del olfato en las fases tempranas y terminales del cáncer de mama y de pulmón.

Michael McCulloch, Tadeusz Jezierski, Michael Broffman, Alan Hubbard, Kirk Turner, and Teresa Janecki

Antecedentes: El cáncer de pulmón y de mama son las principales causas de muerte en todo el mundo. El trabajo exploratorio previo ha demostrado que se han encontrado patrones de los marcadores bioquímicos en el aire exhalado de pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de mama que se distinguen de los de pacientes control. Sin embargo, el análisis químico del aire exhalado no ha demostrado la idoneidad para el diagnóstico clínico individual.

Métodos: Los autores utilizaron un método basado en recompensa de alimento, al entrenar 5 perros de casa, para que distinguieran por el simple olor, muestras de aire exhalado de 55 pacientes con cáncer de pulmón y 31 pacientes con cáncer de mama de los 83 monitoreados. Una prueba correcta de las muestras de cáncer estaba asentada / situada en frente de la muestra. La primera reacción a las muestras de pacientes control fue hacer caso omiso de la muestra. En principio los autores entrenaron los perros en un proceso de tres fases secuenciales que progresivamente aumentaba los niveles de desafío. Una vez entrenados, la capacidad de los perros para distinguir los pacientes con cáncer de los pacientes control fue luego probada utilizando muestras de aliento de individuos que no se habían encontrado con los perros anteriormente. Los investigadores taparon los ojos de ambos, los adiestradores y los observadores experimentales para ocultar la identidad de las muestras de aliento.

El diagnóstico preciso de los datos indicó que estas muestras fueron obtenidas exclusivamente de la olfateada de los perros, en condiciones de doble cegada, a partir de individuos que no se habían reunido anteriormente con los perros durante el período de entrenamiento.

Resultados: Entre los pacientes con cáncer de pulmón y los pacientes control, la sensibilidad de detección canina por olor comparada con el diagnóstico convencional de la biopsia fue 0,99 (95% intervalo de confianza [IC], 0,99, 1,00) y la especificidad general 0,99 (95% IC, 0,96, 1,00). Entre los pacientes con cáncer de mama y los pacientes control, la sensibilidad fue 0,88 (95% IC, 0,75, 1,00) y la especificidad 0,98 (95% IC, 0,90, 0,99).

La sensibilidad y la especificidad fueron notablemente similares en todas las 4 etapas de ambas enfermedades. Conclusión: El entrenamiento fue eficaz y la identificación de cáncer fue exacta, en cuestión de semanas los perros domésticos quienes recibieron entrenamiento básico de conducta fueron entrenados para distinguir con precisión las muestras de aliento de pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de mama de los pacientes control. Este trabajo piloto que usa detección canina de olores demuestra la validez de la utilización de un sistema biológico para examinar aire exhalado en el diagnóstico de identificación del cáncer de mama y de pulmón.

Trabajos futuros deberían examinar la química del aire exhalado para determinar que compuestos químicos pueden identificar con mayor precisión la presencia de cáncer. Palabras clave: perros, detección canina de olor, cáncer de mama, diagnóstico, cáncer de pulmón.

El diagnóstico de detección temprana del cáncer es un objetivo deseable, ya que a menudo permite el tratamiento con menor toxicidad y pronostica una mayor supervivencia. Sin embargo, En muchos tipos de cáncer, la capacidad limitada de los actuales métodos de diagnóstico puede contribuir a un mayor índice de mortalidad por cáncer. Cuando el cáncer de pulmón es detectado en sus primeras fases, la intervención quirúrgica por si misma puede lograr tasas de supervivencia de 5 años en hasta 50% de los pacientes.¹ Sin embargo, la radiografía de tórax y la citología de esputo tienen una alta tasa de falsos negativos y, por lo tanto, no detectan muchos de los casos en etapas tempranas.

1. Además, la tomografía computarizada (TC), capaz de detectar lesiones tan pequeñas como de 1 mm de diámetro, produce muchos falsos positivos, que conducen a cirugías innecesarias por la biopsia.² La alta tasa de falsos positivos de la Tomografía Computarizada puede ser reducida a través de la confirmación con la tomografía por emisión de positrones. ³ En el cáncer de mama, aunque la evidencia sugiere que la mamografía reduce la mortalidad por cáncer de mama, ^{4, 5} y permite el tratamiento con menor toxicidad, ⁶ aún hay incertidumbre debido a la calidad variable de los estudios ⁷ y la inconsistencia de los resultados entre los estudios. ⁸ La mamografía detecta las lesiones no cancerígenas, lo que lleva a pruebas innecesarias, tratamientos y ansiedad.⁹ Además, es más probable que la mamografía no detecte el cáncer en mujeres con tejidos mamarios densos.

Detección Canina de aliento en Cáncer de pulmón y de mama

Un enfoque alternativo a estas herramientas tradicionales de diagnóstico ha sido la búsqueda de biomarcadores que puedan ser identificados a través de muestras de sangre con métodos de química analítica. Sin embargo, estos métodos tienen desventajas significativas. En el cáncer de pulmón, cuando muchos biomarcadores son considerados individualmente, no han demostrado la

idoneidad para su uso como las pruebas de detección, y aún no está claro qué grupo de pruebas utilizadas en conjunto proporcionarán diagnósticos de sensibilidad y especificidad suficientes. En el cáncer de mama, la evidencia es limitada debido a la falta de estandarización de las pruebas y por los estudios que son demasiado pequeños y no tan fáciles de comparar, con pacientes heterogéneos y características del tumor.

Posiblemente la detección canina de olor puede ayudar a superar algunos de estos inconvenientes, debido a la extraordinaria capacidad olfativa del perro, que tiene umbrales de detección tan bajos como partes por trillón. Además, el sistema olfativo canino parece ir más allá de los simples umbrales bajos de detección, hasta la capacidad de discriminar entre mezclas químicas complejas, como la que se encuentran en el aliento exhalado por los humanos.

Los compuestos orgánicos volátiles que potencialmente diagnostican el cáncer, tales como alcanos, alcanos metilados, compuestos aromáticos, y derivados del benceno, se han identificado mediante cromatografía de gases / espectroscopia de masas (GCMS) en el aire exhalado de pacientes con cáncer de mama y de pulmón. En ambos tipos de cáncer de pulmón y de mama, 18 de las concentraciones relativas de estos compuestos exhalados difieren entre los pacientes y los voluntarios sanos. Sin embargo, la espectroscopia de masas no puede detectar todos o casi todos los productos químicos presentes, perdiendo, potencialmente los marcadores de diagnóstico más importantes. Además, todavía no es una práctica habitual en el diagnóstico del cáncer.

Informes de casos de interacciones entre pacientes y perros para el diagnóstico de cáncer aparecieron por primera vez en 1989 y, posteriormente, en 2001. Esto fue seguido por evidencia desconcertante de que el melanoma y el cáncer de vejiga podrían ser detectados por los perros a través del uso de sus habilidades olfativas. En el estudio actual, nos propusimos explorar 3 preguntas. Nuestro

primer objetivo era ver si los perros normales, sin entrenamiento previo de discriminación de olor, podían ser entrenados rápidamente para identificar pacientes con cáncer de pulmón y de mama al oler muestras de su aliento comparado con tubos de muestra vacíos no utilizados. Nuestro segundo objetivo era investigar si los perros podían distinguir muestras de aliento de pacientes con cáncer de pulmón y de mama de aquellos pacientes saludables. Finalmente, se trató de examinar si el rendimiento del diagnóstico del perro se vería afectado por la etapa de enfermedad de los pacientes con cáncer, la edad, el tabaquismo, o el alimento recientemente comido por los pacientes con cáncer o los pacientes control.

Métodos: Pacientes y donantes control de aliento

Los pacientes aptos eran hombres y mujeres mayores de 18 años con una biopsia confirmada muy reciente de un diagnóstico convencional de cáncer de pulmón o mama. Específicamente pedimos que los centros de reclutamiento refirieran los pacientes lo antes posible tras el diagnóstico definitivo de tal modo que el aliento de muestreo no interfiriera con la demora prevista del tratamiento convencional. Como sospechamos que el tratamiento de quimioterapia podría cambiar los químicos exhalados en pacientes, buscamos pacientes quienes no hubieran experimentado la quimioterapia. Como también sospechamos que los pacientes con enfermedades más avanzadas y, por tanto, tumores más grandes, podrían exhalar mayores concentraciones de sustancias químicas asociadas con células cancerígenas que - por lo tanto, serían más fácilmente identificadas por los perros- buscamos pacientes con cualquier etapa de la enfermedad.

Se reclutaron ambos, pacientes y pacientes control a través de los centros médicos locales (Clínica Pine Street, San Anselmo, California; Golden Gate Center for Integrative Cancer Care, San Francisco, California; California Cancer Care Greenbrae, California). Todos los individuos, tanto los pacientes y los

pacientes control, respondieron a un cuestionario sobre los factores que según nosotros podrían afectar la exhalación de productos químicos en el aire: edad, fumadores actuales y antiguos, diabetes, infecciones dentales, y el alimento comido recientemente (que se describe a continuación, consulte la sección "Análisis"). Se reclutaron 55 pacientes (35 hombres y 20 mujeres) con cáncer de pulmón y 31 pacientes (1 hombre y 30 mujeres) con cáncer de mama (Tabla 1). También reclutamos a 83 voluntarios como pacientes control sin historia previa de cáncer. Los pacientes excluidos fueron aquellos que respondieron a nuestro estudio de reclutamiento, después de haber comenzado la terapia estándar o para quienes el reporte de biopsia positiva no estaba disponible.

Todos los individuos presentaron informe por escrito de su consentimiento. Nuestro protocolo de reclutamiento de pacientes y los materiales fueron aprobados por una junta de revisión institucional (Independent Review Consulting, Corte Madera, California). Además, nuestro entrenamiento de animales y los métodos de manipulación fueron diseñados con asesoría de 2 veterinarios, un entrenador de perros, y los propietarios de los perros, quienes aprobaron nuestros métodos. No proporcionamos ningún tipo de compensación a los individuos que proporcionaron muestras de aliento o a los propietarios de los perros quienes voluntariamente ofrecieron sus perros para el estudio.

Equipo y Muestreo de Aliento

Para la toma de muestras del aliento, obtuvimos un Tubo cilíndrico de polipropileno de muestreo de vapores orgánicos (Defencetek, Pretoria, Sudáfrica). Cada tubo está abierto en ambos extremos, tiene 15 centímetros de largo, tiene un diámetro exterior de 2.5 centímetros, tiene un diámetro interior de 1.88 centímetros, y tiene tapas removibles. Un tubo extraíble de 2 pulgadas de largo recubierto de aceite de silicona de polipropileno "lana" captura los

compuestos orgánicos volátiles del aire exhalado mientras que el aliento pasa a través del tubo.

McCulloch y otros
Cuadro 1. Individuos

Diagnosís e Histología	Etapa	Número	Genero		Edad media (Rango)
			M	F	
Células no pequeñas de cáncer de pulmón					
Adenocarcinoma	I	4	4		
	II	9	7	2	
	III	10	4	6	
	IV	16	8	8	
Escamoso	II	6	3	3	
	III	4	3	1	
	IV	6	6		
Todos		55	35	20	59 (43-87)
Cáncer de mama					
Adenocarcinoma	I	8	8		
	II	6	1	5	
	III	12	12		
	IV	4	4		
Lobular	III	1	1		
Todos		31	1	30	55 (39-73)
Donantes sanos		83	41	42	50 (22-79)

Para recolectar las muestras de aliento, les pedimos a los donantes exhalar de 3 a 5 veces por el tubo. Después tapamos los tubos en cada extremo con sus respectivas tapas y los sellamos en bolsas estilo zip lock a temperatura ambiente entre el momento de la toma de la muestra de aliento y la exposición a los perros.

Creíamos que a partir de la respiración profunda desde los pulmones, donde tiene lugar el intercambio de oxígeno, podría haber una mayor concentración de compuestos químicos exhalados potenciales para el diagnóstico de cáncer. Por lo tanto, les pedimos a los individuos que exhalaran a través del tubo tan profundo y cómodamente como fuera posible. Deteníamos las pruebas en caso de que los

individuos se quedarán sin aliento, si comenzaban a toser, o en caso de que no desearan continuar, por lo que el número de tubos de muestra de aliento que pudimos recoger varió de 4 a 18.

Para cada persona evaluada, todas las muestras de aliento fueron recolectadas durante 1 visita. Se le pidió al investigador de recolección de muestras de aliento que subjetivamente notara si la fuerza o energía de la respiración de los individuos "a través del tubo era "suave" o "fuerte". Debido a las variaciones en las tasas de selección y la ventana limitada de tiempo entre la fecha del diagnóstico y la fecha de comienzo de la quimioterapia, el tiempo de almacenamiento del muestreo varió entre 1 y 60 días.

PERROS

Cinco perros, de 7 a 18 meses, fueron elegidos de un total de 13: tres Labradores (2 machos y 1 hembra) y 2 perros de agua portugués (1 macho y 1 hembra). Los perros fueron proporcionados por los propietarios de los perros y por GUIDE DOGS FOR THE BLIND (San Rafael, California). Nuestro criterio de selección estaba dirigido a perros mayores de 6 meses con entrenamiento básico de obediencia, típico de mascotas del hogar, según lo definido por el American Kennel Club. Los perros fueron seleccionados por su nivel de avidez al oler objetos y responder a los comandos.

Nuestro método de entrenamiento estaba basado en la recompensa, en donde el comportamiento apropiado es recompensado al activar un dispositivo que hace clic y simultáneamente mostrarles comida. A lo largo de las sesiones de entrenamiento, los perros fueron alojados en jaulas limpias, bien ventiladas apropiadas para el tamaño de cada perro. Tenían acceso ilimitado de agua, y prácticas de buen trato eran proporcionadas cada mañana durante las sesiones de entrenamiento y de pruebas. Entre cada prueba, que duraba aproximadamente 10 minutos, a cada perro se le permitía tiempo libre para

jugar con los otros perros y se les dio libre acceso a un gran patio cercado para jugar. También se prestó atención veterinaria a cada perro, sin embargo no fue necesaria ya que todos los perros completaron su entrenamiento y las pruebas sin ningún tipo de eventos adversos y ningún perro experimentó alguna lesión o enfermedad durante el transcurso de nuestro estudio. En el cuadro 2, ilustramos la secuencia de entrenamiento y el proceso de las pruebas que usamos para entrenar a los perros para que detectaran muestras de cáncer y, luego distinguieran a los pacientes de los pacientes control y, por último, poner a prueba su capacidad de discriminación en un diseño de prueba de doble ciego.

Detección Canina a través del olfato de cáncer de Pulmón y de mama

Cuadro 2. Fases Secuenciales de adiestramiento y prueba para los perros

Fase	Ubicación de la Muestra de Cáncer Entre 5 Estaciones	Contenidos de la Estación con Objetivo de Estimulo	Contenidos de Otras 4 Estaciones	Secuencia de Eventos En la Estación Con muestra de Cáncer	Ubicación de la Muestra de Cáncer Conocidos por:
Entrenamiento					
I	Escogido Aleatoriamente	Muestras de aliento de paciente con Cáncer Y alimentos	Tubos vacíos	1. Olfatear 2. Comando (síntese/abajo) 3. Indicación por el perro 4. Luego que el perro se sienta, entonces: Clicker Recompensa de comida Felicitación	Experimentador y adiestrador
II	Escogido Aleatoriamente	Muestras de aliento de paciente con Cáncer Y alimentos	Tubos vacíos	1. Olfatear 2. Si el perro indica correctamente: Clicker Recompensa de comida Felicitación	Experimentador sólo
III	Escogido Aleatoriamente	Muestras de aliento de paciente con Cáncer Y alimentos	Tubos vacíos	1. Olfatear 2. Si el perro indica correctamente: Clicker Recompensa de comida Felicitación	Experimentador sólo
Experimentación Prueba a	Escogido Aleatoriamente	Muestras de aliento de paciente con Cáncer Y alimentos	Muestra de paciente Control De aliento	1. Olfatear 2. Si el perro indica	Experimentador sólo

Ciegas				correctamente: Clicker Recompensa de comida Felicitación	
Experimentación	Escogido	Muestras de aliento de paciente con Cáncer	Muestra de pacienteControl	1. Olfatear	El experimentador sabia
Prueba a Ciegas	Aleatoriamente	Muestra de aliento de paciente control a,b	De aliento	2.Posible indicación por el perro No clicker No hay recompensa de comida No hay felicitación	Solamente la locación pero no Identidad de la prueba

- a. Orden aleatorio entre los ensayos, no conocido por el adiestrador.
- b. El estado de la muestra no se conoce ni por el experimentador o por el adiestrador.

MECANISMO EXPERIMENTAL

Sala de entrenamiento. El entrenamiento se llevo a cabo en un cuarto de 3 por 7.3 metros con suelo de baldosas de vinilo, techo fluorescente e iluminación natural proveniente desde la ventana. La habitación no tenia control del clima, y el promedio de temperatura ambiente durante el estudio (de marzo a agosto) osciló entre los 18 ° C a 21.5 ° C. Al final de cada jornada de trabajo, el piso se limpiaba con jabón de aceite de MURPHY y agua.

El personal. Durante las fases de entrenamiento, los adiestradores de perros guiaron los perros dentro del salón, motivándolos a para olfatear las estaciones con un simple comando: "vayan a trabajar!" Dos investigadores observaron desde detrás de una cortina, escondidos de los perros y los adiestradores.

Estaciones de Muestreo de aliento. Ubicamos 5 estaciones de muestreo en el suelo de la habitación en una sola línea recta, con una distancia de 90 cm. una de la otra. Cada estación consistía de un contenedor de almacenamiento de plástico de polipropileno que medía 37. 5 centímetros de largo, 30. Centímetros de ancho y 25 centímetros de altura. Cada estación también contenía 20 centímetros de profundidad en donde se colocaron las muestras de aliento en los tubos. Para evitar que la nariz del perro tocara los tubos de muestra,

Colocamos los tubos con las muestras de aliento en contenedores de polipropileno de media pinta que miden 11,25 centímetros de ancho por 3,75 centímetros de alto y se usó un nuevo contenedor para cada ensayo. Para permitir el intercambio de aire y los químicos del aliento exhalado, se perforaron 7 orificios que median 0.63 centímetros de diámetro, se perforaron en las tapas de los envases.

Ubicación de las muestras de aliento

Una prueba consistía en un perro caminando a lo largo del salón y olfateando cada una de las 5 estaciones (1 muestra del aliento de un paciente con cáncer y 4 muestras de aliento de pacientes control). Después de que cada uno de los 5 perros había inhalado las muestras en cada una de las estaciones, ambas muestras de aliento fueron reemplazadas con nuevas muestras. Para evitar que los perros predijeran la ubicación de las muestras de aliento de los pacientes con cáncer, el experimentador rotó la ubicación de las muestras de aliento de cáncer dentro de las 5 estaciones utilizando una tabla de números aleatorios. Un día de entrenamiento consistió en 5 ensayos realizados por los 5 perros, 4 veces en un día (un total de 100 ensayos por día).

Clasificación de la respuesta de los perros. Las respuestas correctas fueron (1) indicadas a través de una sentada o acostada directamente en frente a una muestra que contenía una muestra de cáncer (una verdaderamente positiva en cálculos de sensibilidad) y (2) inhalación pero no indicando frente a una muestra de control (un verdadero negativo). Las respuestas incorrectas fueron (1) indicar positiva una muestra de control (falso positivo), (2) inhalación pero no indicar una muestra de cáncer (falso negativo), y (3) dudas, una reacción incompleta ya fuera hacia la muestra de cáncer o hacia la muestras de control (ya sea falsos - positivos o falsos negativos, dependiendo de si se duda que era una muestra de cáncer o una muestra de control).

Entrenamiento

El entrenamiento consistió en 3 fases (Cuadro 2). Por cada perro, cada fase de entrenamiento se consideró terminada cuando el perro o la perra pudo distinguir correctamente, por lo menos en 30 ensayos consecutivos, la muestra de aliento del paciente con cáncer, entre aquellas de 4 pacientes control, en la línea experimental de 5 muestras de aliento.

Durante la fase 1 del entrenamiento, la ubicación de la muestra de aliento de cáncer fue conocida por ambos el experimentador y entrenador (Cuadro 2). Una estación contenía una muestra de aliento con cáncer, y las 4 estaciones restantes contenían tubos de muestra en blanco que no habían sido utilizadas en ninguna muestra de aliento. Para motivar a los perros para que buscaran las sustancias químicas exhaladas asociadas con el cáncer, ubicamos un trozo de comida de perro en la estación con la muestra de aliento con cáncer y cubrimos el recipiente con un trozo de papel para que el alimento no fuera visible. Los perros caminaron sueltos a lo largo de las estaciones. No asignamos ningún plazo en el periodo de tiempo que los perros dedicaron a olfatear las muestras o en el número de veces en que un perro pudiera olfatear cualquier muestra. Para entrenar a los perros e indicarles la muestra de cáncer, cuando el perro olfateaba la estación que contenía la muestra de cáncer, un investigador activaría el dispositivo haciendo clic, indicando al adiestrador para que emitiera el comando de "sentarse" , aplaudir al perro, y ofrecerle un alimento como recompensa antes de que se fuera de la sala. Una prueba se considera completa cuando se activaba el dispositivo, y el adiestrador llevaba al perro fuera de la sala.

Durante la fase 2 del entrenamiento, sólo el experimentador tenía conocimiento de la ubicación de la muestra de aliento con cáncer y aparte de motivar al perro con frases como "vaya a trabajar", decía "síntese" u otros comandos verbales.

La señal de clic por parte del experimentador, la recompensa de comida y los elogios por parte del entrenador se dieron únicamente después de que el perro indicó correctamente la muestra de aliento con cáncer. Cuando el perro indicaba de forma incorrecta en un paciente control, el experimentador daba señal con el dispositivo y el adiestrador permanecía en silencio, y no le daba al perro ni elogios ni recompensas, y suavemente reprendía al perro diciendo "no". Las muestras utilizadas en las fases 1 y 2 (contaminadas con esencia de comida) no fueron utilizadas nuevamente.

La fase 3 del entrenamiento es idéntica a la fase 2, excepto que la comida ya no era ubicada en las muestras de aliento con cáncer (Cuadro 2). En resumen, esta fase del entrenamiento era para capacitar a los perros para detectar muestras de aliento de pacientes con cáncer.

Prueba: Experimento a ciegas

Durante el experimento a ciegas de prueba de olfateo canino, utilizando muestras utilizadas anteriormente en la fase 3 del entrenamiento, el nivel de desafío de los perros se incrementó al colocar una muestra de aliento con cáncer en la estación 1 y muestras de aliento de pacientes control en las 4 estaciones restantes. Por lo tanto, los perros tenían que distinguir las muestras de aliento de pacientes con cáncer de las muestras de aliento de pacientes control saludables. Por otra parte, al adiestrador le tapaban los ojos para que no pudiera identificar la ubicación de las muestras y la condición del paciente con cáncer y el paciente control. Aunque el experimentador no sabía la ubicación de las muestras y la condición del paciente y del paciente control durante el experimento a ciegas, la posibilidad de que el experimentador le diera pistas a los perros se redujo al mínimo, al ubicar al experimentador en una habitación contigua, detrás de una cortina opaca que cubría completamente la puerta entre las salas de entrenamiento y de observación.

No	99	3	102			1	0	1
Si	6	45	51			0	10	10
Total	105	48	153	0,94	0,94	1	10	11
Etapa II								
No	37	1	38			5	0	5
Si	3	19	22			0	0	0
Total	40	20	60	0,95	0,93	5	0	5
Etapa III								
No	70	1	71			1	0	1
Si	4	27	31			0	10	10
Total	74	28	102	0,96	0,95	1	10	11
Etapa IV								
No	54	1	55			12	1	13
Si	2	19	21			0	4	4
Total	56	20	76	0,95	0,96	12	5	17
Todos								
No	260	6	266			14	1	15
Si	15	110	125			0	29	29
Total	275	116	391	0.88 (0.75, 1.00)	0.98 (0.90, 0.99)	14	30	44

ND = no definido.

a. Indicación por parte del perro

b. Sensibilidad y Especificidad, estimado general eq

Todos los demás métodos fueron idénticos a los de la fase de prueba del experimento a ciegas, salvo que ahora (1) ubicamos la muestra de aliento de interés, ya fuera del paciente o del paciente control, dentro de la alineación junto con otros 4 controles y (2) tapamos los ojos a ambos a los experimentadores y a los adiestradores de perros para que no identificaran la muestra objetivo en la alineación. Mientras que en los experimentos a ciegas sólo el adiestrador era cegado al conocimiento de la muestra objetivo, en los experimentos doble ciego, tanto el adiestrador y como el experimentador fueron cegados para garantizar que ni experimentadores ni adiestradores pudieran dar pistas a los perros. Dado que los experimentadores ya no conocían la condición de las muestras objetivo del aliento, no tuvieron que activar el dispositivo después de darle una indicación al perro de "sentarse", y por lo tanto, el adiestrador no dio al perro alimento como recompensa. Después de haberle dado la oportunidad de olfatear y de indicar el lugar de las muestras, simplemente el perro era sacado de la sala. Sólo después de haber dejado la sala de entrenamiento se reconoció al perro con la frase "buen trabajo!". Durante los ensayos doble ciego, cada tubo fue utilizado en promedio unas 20 veces ($x = 32,35$, $SD = 24,46$, rango, 4-99).

Manejo y Análisis de datos

Durante las fases de entrenamiento y de pruebas, los experimentadores monitorearon cada prueba, grabando las observaciones tanto en papel como en cintas de video. Nosotros auditamos todo el conjunto de datos del rendimiento de cada perro para una mayor precisión, comparando los registros en papel y los de la cinta de vídeo.

La precisión del diagnóstico de la fase de las pruebas doble ciego fue calculada por la indicación por parte de los perros de la sensibilidad y la especificidad de las muestras de aliento comparadas con el diagnóstico de la biopsia convencional confirmada. Los intervalos de confianza para la sensibilidad y la especificidad fueron estimados usando ecuaciones de estimación generales (EEG), regresión lineal de efectos aleatorios, con errores estándar ajustados por la agrupación de donantes .27 La respuesta de los perros a cada una de las 5 muestras inhaladas fue incluida en nuestro análisis, a los perros se les permitió visitar cada estación de muestreo y de esta forma se podría haber indicado potencialmente cada una de las muestras en una prueba, aunque en nuestros experimentos, esto nunca ocurrió. Los adiestradores de perros no trataron de evitar que los perros visitaran cualquier estación individualmente. Por lo tanto, ya que cada estación de muestra era considerada como unidad de análisis, el uso de muestras de aliento de 4 pacientes control junto con la muestra de un paciente con cáncer en cada ensayo experimental, no cambiaría la sensibilidad o la especificidad.

Durante cada prueba experimental doble ciego, como ni el experimentador ni el adiestrador sabían la ubicación de la muestra del cáncer, no hubo activación del dispositivo o recompensas de alimento para los perros. No obstante, para examinar si hubo cambio sistemático en la capacidad que tenían los perros para detectar la muestra de aliento de los sujetos después de la inhalación más de

una vez- durante la serie de ensayos experimentales doble ciego- calculamos la sensibilidad y especificidad en 2 puntos: (1) para todos los ensayos doble ciego combinados y (2) sólo el primer suceso de cada combinación de individuo-perro.

Utilizamos la prueba exacta de Fisher para poner a prueba las diferencias entre los pacientes y los pacientes control en las siguientes características: muestreo (tiempo de toma de muestras de aliento a la inhalación del perro, así como fuerza de la respiración durante la toma de muestras) y las características de los donantes desde el cuestionario (edad, tabaquismo, diabetes, infecciones dentales, y alimentos comidos recientemente que pueden afectar la respiración, como pescados, comidas picantes, alcohol, cordero, cerdo, café, té, y ajo).

Resultados: Efectividad del entrenamiento

Cada uno de nuestros cinco perros, que entraron en nuestro estudio con sólo el entrenamiento básico de comportamiento de un cachorro típico, completaron el entrenamiento de detección de olores de 2 a 3 semanas. Durante las 3 etapas de entrenamiento, usamos las muestras de aliento de 27 pacientes con cáncer de pulmón, 25 pacientes con cáncer de mama, y 66 pacientes control.

Exactitud del diagnóstico: sensibilidad y especificidad en el ensayo doble ciego.

Durante los ensayos doble ciego, usamos las muestras de aliento de 28 pacientes con cáncer de pulmón, 6 pacientes con cáncer de mama, y 17 pacientes control. Para calcular la sensibilidad y especificidad, tuvimos en cuenta las respuestas de los perros con cada una de las muestras inhaladas como unidad de análisis (definido más arriba, "Respuesta Clasificación de los Perros").

Entre los pacientes con cáncer de pulmón y los pacientes control, en comparación con el diagnóstico convencional de la biopsia confirmada, en

general la sensibilidad de detección canina de olor fue 0,99 (95% intervalo de confianza [IC], 0,99, 1,00) y, la especificidad fue 0,99 (95% IC, 0,96, 1,00 Cuadro 3). Estos resultados fueron ajustados con la EEG al confundir la presencia de tabaquismo entre 4 pacientes con cáncer de pulmón (Tabla 3).

Entre los pacientes con cáncer de mama y los pacientes control, la sensibilidad general fue 0,88 (95% IC, 0,75, 1,00) y la especificidad 0,98 (95% IC, 0,90, 0,99). Para ambos tipos de cáncer, la sensibilidad y la especificidad fueron notablemente similares en todas las 4 etapas de la enfermedad (Cuadro 3).

La sensibilidad y especificidad fueron virtualmente idénticas en los 2 puntos analizados: (1) para todos los ensayos doble ciego combinados y (2) sólo por la primera ocurrencia de cada combinación de perro-donante, se indica que no hubo aumento sistemático en el aprendizaje de los perros a medida que el ensayo doble ciego continuaba.

Para comparar los perros, contamos cada ensayo de 5 muestras de aliento como la unidad de análisis, en la que las posibles respuestas fueron categorizadas simplemente como "cáncer localizado" o "falla al ubicar el cáncer", la única respuesta correcta en este análisis fue cuando los perros lo hicieron perfectamente (localizando correctamente la muestra del cáncer e hicieron caso omiso de las 4 muestras de pacientes control). Estadísticamente no hubo diferencia significativa en la precisión entre los 5 perros ($\chi^2 P = .21$; cuadro 4)

Excepciones del Protocolo

Varias excepciones del protocolo se produjeron durante nuestro estudio. La primera excepción del protocolo fue la de 3 pacientes que previamente habían sido tratados por cáncer y se encontraban en remisión en el momento de

nuestro estudio. De 1 paciente en remisión de cáncer de mama, en 24 o 25 pruebas de olor, los perros indicaron actividad en sus muestras de aliento, por lo tanto, fue considerada como "paciente". Ella continuó bajo supervisión de diagnóstico, que incluyó una resonancia magnética hecha 12 meses más tarde; 18 meses después de haber sido identificada por los perros como un caso de cáncer, se encontró que tenía una recurrencia local de su cáncer de mama en los márgenes quirúrgicos. Para los otros 2 pacientes en remisión, uno con cáncer de pulmón y el otro con cáncer de mama, los perros no indicaron actividad alguna, por lo cual se consideraron pacientes control (90 de 90 ensayos y 46 de 47 ensayos). La segunda excepción del protocolo fueron 2 pacientes con cáncer de pulmón que ya habían comenzado la quimioterapia. En 20 ensayos, los perros indicaron en estos 2 pacientes sensibilidad marcadamente inferior (40,4%).

Análisis de posibles factores de confusión

Tiempo de muestreo de la prueba. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre pacientes y pacientes control en el tiempo de muestreo de las pruebas de aliento ($P = .52$, Prueba exacta de Fisher; Tabla 5).

Edad. Estadísticamente hubo una diferencia significativa en la distribución de edad entre los pacientes y los pacientes control ($P < .001$). Dado que no hubo pacientes con cáncer menores de 44 años, descartamos los análisis de los 15 pacientes control menores de 44 años. En este análisis restringido, ninguna asociación entre la edad y el estado de cáncer fue evidente entre los pacientes y los pacientes control ($P = 1,00$). Además, la sensibilidad y la especificidad se mantuvieron prácticamente sin cambios.

Cáncer de mama. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los pacientes y los pacientes control, en fumadores activos (fumadores no activos entre los pacientes), o fumadores antiguos ($p = 1,00$).

Cáncer de pulmón. Hubo una asociación por fumadores activos ($p = .01$) pero no para fumadores antiguos ($p = .57$). Por lo tanto, ajustamos nuestro análisis de sensibilidad y especificidad en los pacientes con cáncer de pulmón por tabaquismo actual.

Cuadro 5. Comparación entre Pacientes & Pacientes Control De Potenciales Confusiones

Factor de estudio del diseño	
Tiempo desde las muestras de aliento a las pruebas	0,52
Factores de los individuos	
Edad	
Todos las edades	<,01
Edad restringida >43	1,00
Fumadores Actuales	
Cáncer de Pulmón	0,01
Cáncer de mama	Fumadores no actuales
Fumadores Antiguos	
Cáncer de Pulmón	0,57
Cáncer de mama	1,00
Fuerza de respiración durante la prueba	0,37
Diabetes	0,38
Infecciones dentales	0,55
Alimentos mas recientemente ingeridos	
Ajo	0,26
Alcohol	0,42
Café	0,58
Té	1,00
Cerdo	1,00
Cordero	1,00
Pescado	0,17
Comidas picantes	0,41

a. Prueba exacta de Fisher

Interpretación

Mediante un procedimiento sencillo y barato, entrenamos perros para que distinguieran muestras de aliento de pacientes con cáncer de mama y de pulmón

de pacientes control sanos en tan sólo 2 a 3 semanas. Entre los pacientes con cáncer de pulmón y los pacientes control, la sensibilidad general de detección canina comparada con el diagnóstico convencional de la biopsia confirmada fue 0,99 (95% IC, 0,99, 1,00) y la especificidad general 0,99 (95% IC, 0,96, 1,00). Entre los pacientes con cáncer de mama y los pacientes control, la sensibilidad fue 0,88 (95% IC, 0,75, 1,00) y la especificidad 0,98 (95% IC, 0,90, 0,99). La falta de pruebas estadísticamente significativas de diferencias en la precisión entre los perros sugiere que nuestro método de entrenamiento se puede aplicar a diferentes perros con resultados similares. Sin embargo, nuestro artículo está sujeto a limitaciones.

Nuestra gran sensibilidad se compara favorablemente con la de la radiografía de tórax en la detección de la fase inicial de cáncer de pulmón, y nuestra gran especificidad se compara favorablemente con la de tomografía computarizada al descartar el cáncer de pulmón. Además, nuestra gran sensibilidad se compara favorablemente con la de la mamografía al detectar el cáncer de mama, y nuestra gran especificidad se compara favorablemente con la de la mamografía al descartar el cáncer de mama. Sin embargo, nuestra especificidad podría estar sobreestimada, ya que únicamente se usaron los pacientes control (en lugar de un amplio espectro de individuos que incluyeran, por ejemplo, personas con bronquitis o enfisema como pacientes control para el cáncer de pulmón o aquellas personas con enfermedades fibroquísticas de mama o mastitis como pacientes control para el cáncer de mama). Estas preguntas pueden ser mejor comprendidas al estudiar un diseño de cohortes que incluya los dos casos pacientes y pacientes control que representan el espectro completo de la gravedad de la enfermedad observada en la población en general.

Aunque medimos el potencial de confusión por otros olores, nuestros perros pudieron haber detectado y respondido a los olores asociados con el cáncer, tales como inflamación, infección, necrosis, en vez del cáncer específicamente.

Esa pregunta puede ser respondida en investigación de seguimiento que incluya tanto pacientes control sanos y aquellos con condiciones inflamatorias benignas y en los que específicamente examinamos la química de aire exhalado. El tabaquismo varió entre los pacientes con cáncer de pulmón y los pacientes control. Después de ajustar los factores de confusión por el consumo de tabaco la sensibilidad y especificidad continuaron, por lo que se sugiere que el diseño de futuros ensayos incluya estrategias específicas de contratación a fin de evitar diferencias en el estado de tabaquismo entre los pacientes y los pacientes control.

Debido a que estadísticamente no había diferencias significativas entre pacientes y pacientes control respecto al alimento comido recientemente, todavía no sabemos si las diferencias significativas entre pacientes y los pacientes control respecto a los olores en el aliento asociados con factores dietéticos podrían interferir con el entrenamiento y la exactitud del olfateo de los perros. Un estudio más amplio con métodos de entrenamiento apropiadamente secuenciados podría ayudar a resolver esa incertidumbre. Además, trabajos futuros deberían utilizar estrategias específicas de contratación para reducir al mínimo la confusión entre pacientes y pacientes control y un diseño de cohorte prospectivo que incluya a ambos pacientes y pacientes control, lo que representa el espectro completo de la gravedad de la enfermedad observada en la población general. Investigaciones futuras deberían combinar y comparar la detección canina de olor y los métodos químicos analíticos para determinar las aplicaciones más óptimas del diagnóstico para cada método. El análisis del aliento puede proporcionar una reducción sustancial de la incertidumbre vista actualmente en el diagnóstico de cáncer.

Declaraciones

No existen conflictos de interés para cualquiera de los autores del estudio. Todos

los perros fueron tratados con humanidad y de forma segura, consecuente con el entrenamiento profesional DOG CLICKER.²⁸ Ninguno de los perros era mascota de alguno de los investigadores, entrenadores, o adiestradores.

Agradecimientos

Guide Dogs for the Blind (San Rafael, Calif) proporcionó los perros para el entrenamiento y las pruebas. Nicholas Broffman críticamente revisó el artículo. Dina Garbis, Gabe McCulloch, BJ Thomas participaron en el entrenamiento de los perros, el registro de datos y el diseño experimental. El apoyo financiero fue proporcionado por la Fundación MACH (Fairfax, Calif) y Frank y Carol Rosenmayr (Kentfield, Calif). Los Patrocinadores del estudio no tuvieron ninguna responsabilidad en el diseño del estudio, la recopilación análisis e interpretación de datos, preparación de los manuscritos, o de la decisión de publicar.

Referencias

1. Fossella FV, Komaki R, Putnam JB. *Lung Cancer*. New York, NY: Springer-Verlag; 2003.
2. Dammas S, Patz EF, Jr, Goodman PC. Identification of small lung nodules at autopsy: implications for lung cancer screening and overdiagnosis bias. *Lung Cancer*. 2001;33(1):11-16.
3. Shim, SS, Lee, KS, et al. Non-small cell lung cancer: prospective comparison of integrated FDG PET/CT and CT alone for preoperative staging. *Radiology*. 2005;236(3):1011-1019.
4. Olsen AH, Njor SH, Vejborg I, et al. Breast cancer mortality in Copenhagen after introduction of mammography screening: cohort study. *BMJ*. 2005;330:220.
5. Gill PG, Farshid G, Luke CG, Roder DM. Detection by screening mammography is a powerful independent predictor of survival in women diagnosed with breast cancer. *Breast*. 2004;13:15-22.
6. Barth RJ, Jr, Gibson GR, Carney PA, Mott LA, Becher RD, Poplack SP. Detection of breast cancer on screening mammography allows patients to be treated with less-toxic therapy. *Am J Roentgenol*. 2005;184:324-329.
7. Gotzsche PC, Olsen O. Is screening for breast cancer with mammography justifiable? *Lancet*. 2000;355:129-134.
8. Freedman DA, Petitti DB, Robins JM. On the efficacy of screening for breast cancer. *Int J Epidemiol*. 2004;33:43-55.

9. Aro AR, Pilvikki Absetz S, van Elderen TM, van der Ploeg E, van der Kamp LJ. False-positive findings in mammography screening induces short-term distress: breast cancer-specific concern prevails longer. *Eur J Cancer*. 2000;36:1089-1097.
10. Buist DS, Porter PL, Lehman C, Taplin SH, White E. Factors contributing to mammography failure in women aged 40-49 years. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:1432-1440.
11. Kennedy TC, Hirsch FR. Using molecular markers in sputum for the early detection of lung cancer: a review. *Lung Cancer*. 2004;45(suppl 2):S21-27.
12. HilbeW, Dirnhofer S, Greil R, Woll E. Biomarkers in non-small cell lung cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*. 2004;13:425-436.
13. Coradini D, Daidone MG. Biomolecular prognostic factors in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004;16:49-55.
14. Walker DB, Cavnar P, Taylor J, et al. Canine olfactory thresholds to N-amyl acetate measured naturalistically. Paper presented at: Meeting of the Association for Chemoreception Sciences; April 2003; Sarasota, Fla.
15. Walker DB, Walker JC, Cavnar P, et al. *Naturalistic Quantification of Canine Olfactory Sensitivity*. Forthcoming.
16. O'Neill HJ, Gordon SM, O'NeillMH, Gibbons RD, Szidon JP. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer. *Clin Chem*. 1988;34:1613-1618.
17. Preti G, Labows JN, Kostelc JG, Aldinger S, Daniele R. Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr*. 1988;432:1-11.
18. Phillips M, Cataneo RN, Ditzkoff BA, et al. Volatile markers of breast cancer in the breath. *Breast J*. 2003;9:184-191.
19. Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, Gibbons RD, O'Neill HJ. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. *Clin Chem*. 1985;31:1278-1282.
20. Phillips M, Greenberg J. Method for the collection and analysis of volatile compounds in the breath. *J Chromatogr*. 1991;564:242-249.
21. Phillips M. Breath tests in medicine. *Sci Am*. 1992;267(1):74- 79.
22. Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet*. 1999;353:1930-1933.
23. Williams H, Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? *Lancet*. 1989;1:734.
24. Church J, Williams H. Another sniffer dog for the clinic? *Lancet*. 2001;358:930.
25. Pickel DP, Manucy GP, Walker DB, Hall SB, Walker JC. Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Appl Anim Behav Sci*. 2004;89:107-116.
26. Willis CM, Church SM, Guest CM, et al. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *BMJ*. 2004;329:712.

27. Liang KY, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika*. 1986;73:13-22.
28. Pryor K. *Don't Shoot the Dog! The New Art of Teaching and Training*. Rev ed. New York, NY: Bantam; 1999.