

Original

Punto de corte óptimo de la concentración de cotinina en saliva para discriminar entre fumadores y no fumadores en la población adulta de Barcelona

Jose M. Martínez-Sánchez^{a,b,*}, Marcela Fu^{a,b}, Carles Ariza^{c,d}, María J. López^{c,d}, Esteve Saltó^{e,f}, José A. Pascual^{g,h}, Anna Schiaffinoⁱ, Josep M. Borràs^{b,j}, Mercè Peris^a, Antonio Agudo^a, Manel Nebot^{c,d,g} y Esteve Fernández^{ab}, en nombre de los Investigadores del Estudio DCOT

^a Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^b Departamento de Ciencias Clínicas, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^c Servei d'Avaluació i Mètodes d'Intervenció, Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB), Barcelona, España

^d CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), España

^e Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Barcelona, España

^f Departament de Salut Pública, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^g Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España

^h Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar), Barcelona, España

ⁱ Ajuntament de Terrassa, Terrassa, Barcelona, España

^j Pla Director d'Oncologia-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de diciembre de 2008

Aceptado el 4 de marzo de 2009

On-line el 1 de julio de 2009

Palabras clave:

Sensibilidad
Especificidad
Curva ROC
Cotinina
Punto de corte
Tabaquismo

Keywords:

Sensitivity
Specificity
ROC curve
Cotinine
Cut-off point
Smoking

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el punto de corte óptimo de la concentración de cotinina en saliva para discriminar el consumo de tabaco en la población adulta de Barcelona.

Métodos: Estudio transversal de una muestra representativa ($n = 1117$) de la población adulta (> 16 años) de la ciudad de Barcelona (2004-2005). El estudio recogió información sobre tabaquismo (activo y pasivo) mediante cuestionario y una muestra de saliva para la determinación de cotinina. Se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad estratificado por sexo, edad, tipo de consumo (diario y ocasional) y exposición al humo ambiental del tabaco en el hogar. Se calcularon las curvas ROC y el área bajo la curva.

Resultados: La prevalencia de fumadores (diarios y ocasionales) fue del 27,8% (intervalo de confianza del 95%: 25,2-30,4%). El punto de corte óptimo que separa a los no fumadores de los fumadores es 9,2 ng/ml (sensibilidad del 88,7% y especificidad del 89,0%). El área bajo la curva ROC fue 0,952. El punto de corte fue 12,2 ng/ml para los hombres y 7,6 para las mujeres, y aumentaba en los grupos de edad con mayor prevalencia de tabaquismo. Los fumadores diarios tenían un punto de corte superior al de los fumadores ocasionales.

Conclusiones: El punto de corte óptimo que discrimina fumadores de no fumadores en la población adulta es 9,2 ng/ml, con sensibilidad y especificidad cercanas al 90%. El punto de corte es más alto en los hombres y en los grupos de menor edad, y aumenta cuanto mayor es la prevalencia de consumo diario.

© 2008 SESPAS. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Optimal cut-point of salivary cotinine concentration to discriminate smoking status in the adult population in Barcelona

ABSTRACT

Objective: To assess the optimal cut-point for salivary cotinine concentration to identify smoking status in the adult population of Barcelona.

Methods: We performed a cross-sectional study of a representative sample ($n = 1,117$) of the adult population (> 16 years) in Barcelona (2004-2005). This study gathered information on active and passive smoking by means of a questionnaire and a saliva sample for cotinine determination. We analyzed sensitivity and specificity according to sex, age, smoking status (daily and occasional), and exposure to second-hand smoke at home. ROC curves and the area under the curve were calculated.

Results: The prevalence of smokers (daily and occasional) was 27.8% (95% CI: 25.2-30.4%). The optimal cut-point to discriminate smoking status was 9.2 ng/ml (sensitivity = 88.7% and specificity = 89.0%). The area under the ROC curve was 0.952. The optimal cut-point was 12.2 ng/ml in men and 7.6 ng/ml in women. The optimal cut-point was higher at ages with a greater prevalence of smoking. Daily smokers had a higher cut-point than occasional smokers.

Conclusions: The optimal cut-point to discriminate smoking status in the adult population is 9.2 ng/ml, with sensitivities and specificities around 90%. The cut-point was higher in men and in younger people. The cut-point increases with higher prevalence of daily smokers.

© 2008 SESPAS. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jmmartinez@ico.scs.es (J.M. Martínez-Sánchez).

Introducción

La clasificación del consumo de tabaco autodeclarado mediante el uso de cuestionarios no siempre es fiable y puede estar sesgada por la percepción negativa que hoy existe sobre el consumo de tabaco. Por ello, muchos estudios sobre consumo de tabaco o exposición al humo ambiental del tabaco han incorporado, junto con la información proporcionada por los cuestionarios, el uso de biomarcadores como medida objetiva del consumo y de la exposición al humo ambiental del tabaco^{1,2}.

Se ha demostrado que la cotinina es un buen biomarcador para estudiar el consumo de tabaco y la exposición al humo ambiental del tabaco^{1,2}. La cotinina es el principal metabolito de la nicotina y puede medirse en el pelo y en diferentes fluidos corporales, como la saliva, la orina y el suero. La vida media de la nicotina en los fluidos corporales es de dos a tres horas antes de metabolizarse a cotinina, que es mucho más estable y tiene una vida media de 15 a 17 h³.

La cotinina es un marcador específico del tabaco, fácilmente detectable, y mantiene una razón constante con otros productos del tabaco. Aunque el mejor indicador de la dosis absorbida de nicotina es la concentración de cotinina en la sangre, ésta puede estimarse razonablemente bien a partir de los valores de cotinina en la saliva y la orina^{2,4,5}.

La concentración de cotinina en la saliva se ha utilizado como medida complementaria a los cuestionarios para estudiar la exposición al humo ambiental del tabaco en la población general^{6,7} y evaluar el efecto de las medidas sanitarias frente al tabaquismo en distintas poblaciones^{6,8-10}. En estos estudios, el punto de corte de la concentración de cotinina utilizado para discriminar entre fumadores y no fumadores se ha basado en estudios realizados en las décadas de 1980 y 1990. Los estudios de validación del punto de corte óptimo lo han situado en 10-20 ng/ml, si bien ponen de manifiesto que depende de la prevalencia del consumo en el grupo de población estudiado y de la exposición al humo de tabaco ambiental¹¹⁻¹³. La epidemia del tabaquismo se desarrolla, en general, siguiendo un mismo modelo de difusión¹⁴. Actualmente, en los países desarrollados, incluyendo España, se observa una tendencia descendente de la prevalencia del consumo en la población general, que se inicia unas décadas antes en los hombres que en las mujeres¹⁵⁻¹⁷. Por este motivo, es importante revisar el punto de corte óptimo en las fases actuales de la epidemia del tabaquismo.

El objetivo de este estudio fue evaluar el punto de corte óptimo de la concentración de cotinina en la saliva para discriminar el consumo de tabaco en una muestra representativa de la población adulta.

Métodos

Diseño del estudio y características de la muestra

Estudio transversal de una muestra representativa (n = 1226) de la población adulta (> 16 años) de la ciudad de Barcelona realizado entre marzo de 2004 y diciembre de 2005⁷. El Instituto Municipal de Estadística de Barcelona proporcionó la muestra obtenida mediante muestreo aleatorio simple del Padrón Municipal. Se envió una carta de presentación del estudio previa a la visita en el hogar. Cuando no se pudo localizar a los individuos después de varios intentos a diversas horas del día y en distintos días de la semana, o bien cuando rechazaron participar, fueron sustituidos por otras personas escogidas al azar del mismo grupo de sexo, edad y distrito de residencia. Después de hablar personalmente y explicar el estudio, se solicitó a los participantes su consentimiento informado por escrito para realizar una

encuesta y para recoger una muestra de saliva. El cuestionario incluía una entrevista estructurada sobre consumo de tabaco y exposición al humo ambiental del tabaco. Después de realizar la encuesta se procedió a la recogida de una muestra de saliva (8 ml). El estudio finalizó el 31 de diciembre de 2005 debido a la entrada en vigor de la Ley 28/2005 de medidas sanitarias frente al tabaquismo y reguladora de la venta, el suministro, el consumo y la publicidad de los productos del tabaco¹⁸, que podría afectar el consumo de tabaco y la exposición pasiva. Por lo tanto, no se pudo entrevistar a 296 personas. La muestra final fue de 1226 individuos, de los cuales el 49,3% fue la primera persona localizada, el 24,4% el primer suplente y para el resto el segundo o posterior suplente. De los 1226 individuos del estudio, se excluyeron 80 del análisis porque no dieron muestra de saliva o no la facilitaron en cantidad suficiente para la determinación de la cotinina, y 29 porque estaban utilizando terapia sustitutiva de la nicotina (en forma de parches o chicles). La muestra final analizada (n = 1117) fue representativa de la ciudad de Barcelona en términos de sexo, edad, distrito y consumo de tabaco. La investigación obtuvo la autorización del comité ético del Hospital Universitario de Bellvitge.

VARIABLES DE ANÁLISIS

Consumo de tabaco: a partir de las preguntas del cuestionario se definió la variable de consumo de tabaco como fumador diario (al menos un cigarrillo al día), fumador ocasional (no diario) y no fumador (nunca fumadores y ex fumadores). También se crearon dos variables dicotómicas (sí/no) relativas al consumo de cigarrillos durante las últimas 24 y 48 h.

Exposición al humo ambiental del tabaco: se estudió el punto de corte según la exposición al humo ambiental del tabaco en el hogar, porque es la exposición que se encuentra más asociada a la concentración de cotinina⁷. La variable de exposición al humo ambiental del tabaco en casa se construyó a partir de las preguntas del cuestionario: «Actualmente, ¿cuántas personas fuman habitualmente dentro de su casa?» y «Durante la semana pasada, ¿cuántos cigarrillos se han fumado al día en su presencia en su casa?». Con estas dos preguntas se creó la variable dicotómica de exposición al humo ambiental del tabaco en casa, en la cual se consideró «no expuestos» a los individuos que contestaban «ninguna» a la primera pregunta y «cero» a la segunda, y «expuestos» al resto.

Concentración de cotinina en saliva: la determinación de cotinina en saliva se realizó en el Instituto Municipal de Investigación Médica de Barcelona (IMIM-Hospital del Mar) mediante el método de cromatografía de gases (GC/MS) ya utilizado en estudios previos^{19,20}. Esta prueba tiene un límite de cuantificación de 1 ng/ml y un límite de detección de 0,3 ng/ml (cuantificación del error < 15%).

Análisis estadístico

Se calcularon las prevalencias del consumo de tabaco y sus intervalos de confianza al 95% (IC95%). Para la concentración de cotinina en la saliva se calcularon las medianas y los rangos intercuartílicos (RI), y se representaron gráficamente mediante *box-plots*. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos independientes para comparar la concentración de cotinina en la saliva. Se determinó el punto de corte óptimo como el valor de cotinina que maximizaba el porcentaje de respuesta correcta de no fumadores y fumadores. Se analizó la sensibilidad y la especificidad del punto de corte para fumadores (diarios y ocasionales) frente a no fumadores. Debido a las diferencias en las concentraciones de cotinina entre fumadores diarios y

ocasionales, también se analizó por separado la sensibilidad y la especificidad para los fumadores diarios frente a los no fumadores y para los fumadores ocasionales frente a los no fumadores. Se elaboraron las curvas ROC y se calculó el área bajo la curva (ABC) como índice de exactitud (máxima exactitud, ABC = 1). Todos los análisis se realizaron estratificados por sexo, grupos de edad (17-44, 45-64 y ≥ 65 años) y exposición al humo ambiental del tabaco en el hogar (sí/no). El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 15.0 y la hoja de cálculo Microsoft Excel.

Resultados

La prevalencia de fumadores (diarios y ocasionales) fue del 27,8% (IC95%: 25,2-30,4%), 32,0% en hombres (IC95%: 27,9-36,1%) y 24,5% (IC95%: 21,1-27,9%) en mujeres. La prevalencia de fumadores fue mayor en los grupos de edades más jóvenes, con una tendencia descendente con la edad (χ^2 de tendencia lineal; $p < 0,01$). La concentración mediana de cotinina fue de 150,2 ng/ml (RI: 85,5-223,1 ng/ml) en los fumadores diarios, 6,9 ng/ml (RI: 3,3-20,4 ng/ml) en los fumadores ocasionales y 1,4 ng/ml (RI: 0,5-3,6 ng/ml) en los no fumadores. La concentración de cotinina en la saliva presenta una distribución sesgada a la izquierda en los fumadores diarios y a la derecha en los no fumadores y fumadores ocasionales (fig. 1). La distribución de cotinina en saliva se solapa en los valores 10-25 ng/ml entre los fumadores (diarios y ocasionales) y los no fumadores. La concentración mediana de cotinina en la saliva de los fumadores diarios y ocasionales que declararon haber fumado en las últimas 24 h fue de 139,8 ng/ml (RI: 67,4-220,0 ng/ml), y de 6,2 ng/ml (RI: 2,0-15,0 ng/ml) en los fumadores que declararon no haber fumado en las últimas 24 h ($p < 0,01$). La concentración mediana de cotinina de los que declararon haber fumado en las últimas 48 h fue de 137,6 ng/ml (RI: 59,2-218,8 ng/ml), y de 4,2 ng/ml (RI: 1,9-13,1 ng/ml) en los fumadores que declararon no haber fumado en las últimas 48 h ($p < 0,01$) (fig. 2).

La tabla 1 muestra los puntos de corte óptimos, la sensibilidad, la especificidad y el área bajo la curva ROC según el tipo de consumo y las variables sociodemográficas. El punto de corte óptimo que discrimina entre fumadores (diarios y ocasionales) y no fumadores fue de 9,2 ng/ml, con una sensibilidad del 88,7% y una especificidad del 89,0% (ABC = 0,952). El punto de corte fue más alto en los hombres que en las mujeres. Según grupos de edad, el punto de corte óptimo varió entre 10,1 y 12,4 ng/ml, con

una sensibilidad comprendida entre el 86,5% y el 90,9%, y una especificidad del 86,4% al 94,5%. El punto de corte fue más alto en los que declararon estar expuestos al humo ambiental del tabaco en el hogar (12,1 ng/ml) frente a los que declararon no estarlo (9,1 ng/ml).

El punto de corte óptimo que separa los fumadores diarios de los no fumadores fue de 18,0 ng/ml, con una sensibilidad del 94,1% y una especificidad del 95,0% (ABC = 0,982). El punto de corte fue más alto en los hombres que en las mujeres, y disminuía con la edad. Para los fumadores diarios, la sensibilidad de los distintos puntos de corte varió entre el 92,7% y el 96,2%, mientras que la especificidad varió entre el 92,2% y el 96,1% (tabla 1).

El punto de corte óptimo que separa los fumadores ocasionales de los no fumadores fue de 4,2 ng/ml, con una sensibilidad del 70,4% y una especificidad del 77,3% (ABC = 0,812). El punto de corte fue más alto en los hombres. Según el grupo de edad, varió entre 3,3 y 4,8 ng/ml. No hubo diferencias en el punto de corte según la exposición al humo ambiental del tabaco en el hogar para los fumadores ocasionales (tabla 1).

Discusión

Éste es el primer estudio en España que evalúa el punto de corte óptimo de la concentración de cotinina en saliva para clasificar el consumo de tabaco en la población general. En nuestro estudio se observa que el punto de corte óptimo para distinguir entre no fumadores y fumadores es 9,2 ng/ml, con una sensibilidad y una especificidad cercanas al 90% y un ABC muy cercano al valor máximo. El punto de corte observado varía en función de la prevalencia del tabaquismo y del tipo de fumador (ocasional frente a diario). A mayor prevalencia de consumo de tabaco, más alto es el umbral óptimo. Los fumadores diarios presentan un umbral superior al de los fumadores ocasionales. Asimismo, los hombres y los grupos de edad más joven presentan un punto de corte más alto que las mujeres y los grupos de mayor edad en todas las situaciones estudiadas. Esto puede deberse a una mayor prevalencia de tabaquismo y consumo de cigarrillos entre los hombres.

Cuando se considera conjuntamente a los fumadores diarios y a los ocasionales, el punto de corte óptimo no supera los 12 ng/ml. En un estudio realizado en el Reino Unido se recomienda utilizar este valor como punto de corte óptimo para separar a los no fumadores de los fumadores²¹. Este valor es inferior a los recomendados en estudios previos en diversas poblaciones, que fijan el punto de corte alrededor de los 20 ng/ml^{1,13,22}. Cuando se considera separadamente a los fumadores diarios de los ocasionales, los diarios presentan puntos de corte más altos que los ocasionales y similares a los recomendados en algunos estudios previos^{1,13,22}. Cabe destacar que los puntos de corte de los fumadores ocasionales son los que presentan menor sensibilidad y especificidad, y se ven menos afectados por la exposición al humo ambiental del tabaco en casa. Esta diferencia entre los fumadores diarios y ocasionales se debe a que los fumadores ocasionales pueden estar varios días sin fumar, y a que la vida media de la cotinina en la saliva es de 15 a 17 h³, aunque la concentración de cotinina indica consumo activo o exposición pasiva al humo ambiental del tabaco hasta tres o cuatro días².

La reducción del punto de corte óptimo que se observa en nuestro estudio en comparación con los puntos de corte recomendados en la literatura puede estar relacionada con la evolución de la epidemia del tabaco^{14-17,23}. La prevalencia del tabaquismo en los países desarrollados, entre ellos España, ha sufrido un descenso en los últimos años, con lo que ha aumentado el número de ex fumadores. Por otro lado, el elevado punto de corte en los fumadores diarios puede deberse a que éstos tienen

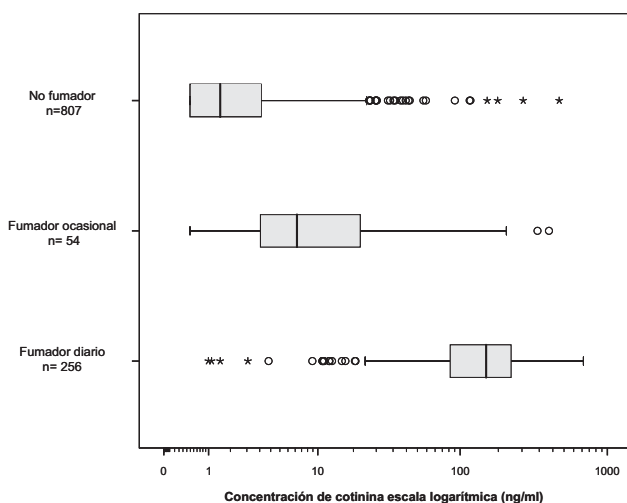


Figura 1. Concentración de cotinina en saliva (ng/ml) según el consumo de tabaco autodeclarado.

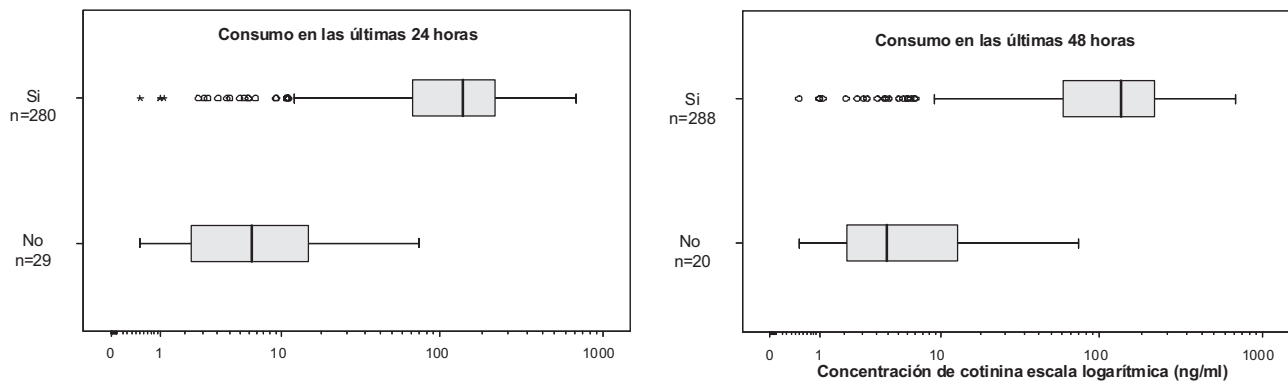


Figura 2. Concentración de cotinina en saliva (ng/ml) según el consumo de tabaco autodeclarado en las últimas 24 y 48 h.

Tabla 1

Puntos de corte óptimos (ng/ml) según sexo, edad y exposición al humo ambiental del tabaco en casa

	n	Fumadores (%)	Punto de corte (ng/ml)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	ABC
<i>No fumadores frente a fumadores (diarios y ocasionales)</i>						
Todos	1117	27,8	9,2	88,7	89,0	0,952
Sexo						
Hombres	488	32,0	12,2	90,4	91,0	0,957
Mujeres	629	24,5	7,6	87,0	87,2	0,947
Edad (años)						
17-44	457	38,9	11,5	86,5	86,4	0,940
45-64	364	30,2	10,1	90,0	92,5	0,960
≥65	296	7,4	12,4	90,9	94,5	0,957
Expuestos al humo ambiental del tabaco en casa						
Sí	390	42,8	12,1	90,4	90,6	0,974
No	727	19,7	9,1	85,3	89,0	0,855
<i>No fumadores frente a fumadores diarios</i>						
Todos	1063	24,1	18,0	94,1	95,0	0,982
Sexo						
Hombres	464	28,4	22,2	96,2	96,1	0,984
Mujeres	599	20,7	12,5	92,7	92,2	0,980
Edad (años)						
17-44	423	34,0	21,3	93,1	93,5	0,976
45-64	347	26,8	19,6	93,5	95,3	0,982
≥65	293	6,5	12,7	94,7	94,5	0,995
Expuestos al humo ambiental del tabaco en casa						
Sí	373	40,2	18,6	94,7	95,1	0,985
No	690	15,4	15,1	93,4	93,5	0,960
<i>No fumadores frente a fumadores ocasionales</i>						
Todos	861	6,3	4,2	70,4	77,3	0,812
Sexo						
Hombres	356	6,7	4,3	75,0	75,9	0,813
Mujeres	505	5,9	2,9	70,0	73,5	0,812
Edad (años)						
17-44	313	10,9	4,1	70,6	74,9	0,786
45-64	271	6,3	3,3	76,5	76,8	0,840
≥65	277	1,1	4,8	66,7	80,7	0,720
Expuestos al humo ambiental del tabaco en casa						
Sí	240	7,1	3,5	70,6	74,4	0,807
No	621	6,0	3,5	73,0	75,2	0,821

ABC: área bajo la curva ROC.

una mayor dependencia de la nicotina^{24,25} y un mayor consumo diario de cigarrillos (últimas 24 h), que hace que las concentraciones de cotinina en la saliva sean más altas. La concentración de cotinina en la saliva se relaciona positivamente con el número de cigarrillos fumados, como se ha puesto de manifiesto en otros estudios^{26,27}.

Una posible limitación del estudio deriva del uso de un cuestionario para discriminar entre fumadores y no fumadores.

Esto podría implicar cierto sesgo de información y amenazar la validez interna del estudio, infraestimando la verdadera prevalencia del tabaquismo y el verdadero valor del punto de corte. Sin embargo, los puntos de corte obtenidos concuerdan con los publicados recientemente en estudios similares realizados en Inglaterra²¹ y Estados Unidos²⁸. Otra posible limitación del estudio deriva de la corta vida media de la cotinina en saliva (15 a 17 h)³. Si bien el uso regular del tabaco de los fumadores diarios

comporta concentraciones de cotinina en la saliva estables, no ocurre así en los fumadores ocasionales. Por tanto, específicamente para los fumadores ocasionales, la cotinina en la saliva no es el mejor método para medir la exposición acumulada, que sí es posible con la determinación de nicotina en el pelo^{20,29}.

Una ventaja de nuestro estudio es que las muestras de saliva se recogieron en diferentes momentos del día durante distintos días de la semana (incluidos los fines de semana) y durante más de un año, lo que minimiza el posible error estacional debido a la toma de la muestra. Además, se recabó información acerca del consumo de tabaco en las últimas 24 y 48 h. Otra ventaja del estudio es que el equipo de encuestadores fue entrenado para evitar posibles sesgos de información en la entrevista y en la recogida de las muestras. Por otro lado, el método analítico utilizado para determinar la cotinina es muy sensible y se utilizó sin modificar para todas las determinaciones, sin que el laboratorio conociera el consumo de tabaco de los participantes.

En conclusión, el punto de corte óptimo para distinguir entre no fumadores y fumadores se sitúa entre 9 y 10 ng/ml en la población adulta. Para decidir qué punto de corte utilizar se debe considerar la prevalencia de fumadores diarios y ocasionales según el sexo y el grupo de edad.

Conflictos de intereses

No existen conflictos de intereses.

Financiación

Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI020261, CIBERESP CB06/02/0032, y RTICC RD06/0020/0089); la Consejería de Universidades e Investigación de la Generalitat de Catalunya (SGR200500646); y la V Ayuda "Enrique Nájera" para jóvenes epidemiólogos de la SEE financiada por la Escuela Nacional de Sanidad.

Contribuciones de autoría

JMMS y EF concibieron el presente trabajo. EF, AS, JAP, CA, MN, ES, JMB y AA, participaron en el diseño del estudio. JAP fue el responsable de las determinaciones de cotinina. JMMS y EF hicieron los análisis estadísticos. Todos los autores participaron en la interpretación de los resultados. JMMS escribió el primer borrador del manuscrito y todos los autores contribuyeron significativamente a su revisión crítica en versiones posteriores. Todos los autores han aprobado la versión final del manuscrito. EF es el responsable del proyecto.

Investigadores del estudio de los "Determinantes de la COTinina (DCOT)"

Antoni Agudo, Carles Ariza, Josep M. Borràs (IP), Esteve Fernández (IP), Marcela Fu, Mireia Jané, Jose M. Martínez-Sánchez, Albert Moncada, Manel Nebot, José A. Pascual, Raúl Pérez-Ortuño, Mercè Peris, Esteve Saltó, Jonathan M. Samet, Anna Schiaffino, Jorge Twose.

Bibliografía

1. Etzel RA. A review of the use of saliva cotinine as a marker of tobacco smoke exposure. *Prev Med.* 1990;19:190-7.
2. Benowitz NL. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. *Environ Health Perspect.* 1999;107(Suppl 2):349-55.
3. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev.* 1996;18:188-204.
4. Jaakkola MS, Ma J, Yang G, et al. Determinants of salivary cotinine concentrations in Chinese male smokers. *Prev Med.* 2003;36:282-90.
5. Kuo HW, Yang JS, Chiu MC. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;768:297-303.
6. Haw SJ, Gruer L. Changes in exposure of adult non-smokers to secondhand smoke after implementation of smoke-free legislation in Scotland: national cross sectional survey. *BMJ.* 2007;335:549-52.
7. Martínez-Sánchez JM, Fernández E, Fu M, et al. Assessment of exposure to secondhand smoke by questionnaire and salivary cotinine in the general population of Barcelona, Spain (2004-2005). *Prev Med.* 2009;48:218-23.
8. Allwright S, Paul G, Greiner B, et al. Legislation for smoke-free workplaces and health of bar workers in Ireland: before and after study. *BMJ.* 2005;331:1117.
9. Semple S, Maccalman L, Naji AA, et al. Bar workers' exposure to second-hand smoke: the effect of Scottish smoke-free legislation on occupational exposure. *Ann Occup Hyg.* 2007;51:571-80.
10. Fernández E, Fu M, Pascual JA, et al. Impact of the Spanish smoking law on exposure to second-hand smoke and respiratory health in hospitality workers: a cohort study. *PLoS ONE.* 2009;4:e2444.
11. Jarvis MJ, Tunstall-Pedoe H, Feyerabend C, et al. Comparison of tests used to distinguish smokers from nonsmokers. *Am J Public Health.* 1987;77:1435-8.
12. Cummings SR, Richard RJ. Optimum cutoff points for biochemical validation of smoking status. *Am J Public Health.* 1988;78:574-5.
13. Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, et al. The validity of self-reported smoking: a review and meta-analysis. *Am J Public Health.* 1994;84:1086-93.
14. Lopez AD, Collishaw NE, Piha T. A descriptive model of the cigarette epidemic in developed countries. *Tob Control.* 1994;3:242-7.
15. Borràs JM, Fernández E, Schiaffino A, et al. Pattern of smoking initiation in Catalonia, Spain, from 1948 to 1992. *Am J Public Health.* 2000;90:1459-62.
16. Fernández E, Schiaffino A, García M, et al. Smoking in Spain, 1945-1995. A retrospective analysis based on the Spanish National Health Interview Surveys. *Med Clin (Barc).* 2003;120:14-6.
17. Fernández E, Gallus S, Schiaffino A, et al. Price and consumption of tobacco in Spain over the period 1965-2000. *Eur J Cancer Prev.* 2004;13:207-11.
18. Galán I, López MJ. Tres años con "Ley de medidas sanitarias frente al tabaquismo": aire más limpio pero no lo suficiente. *Gac Sanit.* 2009;23:87-9.
19. García-Algar O, Vall O, Segura J, et al. Nicotine concentrations in deciduous teeth and cumulative exposure to tobacco smoke during childhood. *JAMA.* 2003;290:196-7.
20. Pichini S, García-Algar O, Muñoz L, et al. Assessment of chronic exposure to cigarette smoke and its change during pregnancy by segmental analysis of maternal hair nicotine. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2003;13:144-51.
21. Jarvis MJ, Fidler J, Mindell J, et al. Assessing smoking status in children, adolescents and adults: cotinine cut-points revisited. *Addiction.* 2008;103:1553-61.
22. Benowitz NL, Ahijevych K, Jarvis MJ, et al. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tob Res.* 2002;4:149-59.
23. World Health Organization (WHO). WHO Report of the global tobacco epidemic. MPOWER. 2008.
24. Fagerstrom K, Furberg H. A comparison of the Fagerstrom test for nicotine dependence and smoking prevalence across countries. *Addiction.* 2008;103:841-5.
25. Fu M, Martínez-Sánchez JM, Pérez-Ríos M, et al. A comparison of the Fagerström test for nicotine dependence and smoking prevalence across countries: updated data from Spain. *Addiction.* 2009;104:326-7.
26. Etter JF, Perneger TV. Measurement of self reported active exposure to cigarette smoke. 2001;55:674-80.
27. Blackford AL, Yang G, Hernández-Ávila M, et al. Cotinine concentration in smokers from different countries: relationship with amount smoked and cigarette type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1799-804.
28. Benowitz NL, Bernert JT, Caraballo RS, et al. Optimal serum cotinine levels for distinguishing cigarette smokers and nonsmokers within different racial/ethnic groups in the United States between 1999 and 2004. *Am J Epidemiol.* 2009;169:236-48.
29. Al-Delaimy WK, Crane J, Woodward A. Is the hair nicotine level a more accurate biomarker of environmental tobacco smoke exposure than urine cotinine? *J Epidemiol Commun Health.* 2002;56:66-71.