

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD**

DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA Y GINECOLOGÍA,
PEDIATRÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

Área de Pediatría

**ÓXIDO NÍTRICO ESPIRADO
Y NITRITOS Y NITRATOS EN SANGRE
EN EL RECIÉN NACIDO
CON ALTO RIESGO
DE INFECCIÓN PERINATAL**

Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Presentada por: IOLANDA JORDÁN GARCÍA
Dirigida por: DR. JOSEP FIGUERAS ALOY

Agradecimientos

A mis padres, M^a Teresa y Esteve, y a mis hermanos, Esteve y Cristina, por todo su amor y apoyo desde mi primer contacto con la medicina, al empezar la carrera, hasta el día de hoy que presento la tesis.

A Xavi, marido y mejor amigo, por su confianza y animosidad constantes y optimismo hasta el final.

A mis hijos, Guillem y Pol, por encaminarme a ser una persona mejor y por las horas que les “he robado”, trabajando en esta tesis.

Al Dr. Josep Figueras, mi Director de tesis, por mantener su confianza en mí hasta el final y por su empeño en enseñarnos un correcto método científico y asistencial en este mundo que es la neonatología y en la medicina en general.

A José Manuel Rodríguez-Miguélez, neonatólogo del H. Clínic de Barcelona por introducirme con pie firme en la neonatología y en el estudio motivo de la tesis actual.

A todas las enfermeras y auxiliares de estas Unidades de Neonatología, por su desinteresada colaboración en la recogida de los casos y por su capacidad de acogida sin límites. Para las que espero nunca olviden a la “médico de la mascarilla”.

Al Dr. W. Jiménez, médico analista del H. Clínic, por permitirme analizar las muestras en su laboratorio y por toda su implicación en esta materia.

A todos mis compañeros neonatólogos de las Unidades de Neonatología de los Hospitales Clínic y Sant Joan de Déu de Barcelona por su confianza y colaboración.

A todos mis compañeros de residencia del Servicio de Pediatría de los Hospitales Clínic i Sant Joan de Déu de Barcelona por su trabajo en equipo y compañerismo. Y muy especialmente a los que empezamos juntos como R1 (las Elenas, Xavi, Josep, Lilianne, Ana y Maite) y a Jose Quintillá y Susana Ruíz como residentes mayores y grandes amigos.

A mis "antiguos" compañeros de urgencias, con los que me inicié como médico adjunto en éste hospital, y con los que he compartido grandes momentos.

A mis nuevos compañeros de la UCI Pediátrica (médicos, enfermeras, auxiliares, "jefes"...), por su maravillosa acogida y confianza, así como por la gran ayuda que me han prestado para iniciar ésta nueva faceta de "intensivista".

A todos mis amigos de fuera del ámbito hospitalario, por su fidelidad, apoyo y amistad incondicional.

A Ana Sáez, nuestra secretaria del Servicio de Pediatría, por estar "siempre presente", por su disposición, por su integridad, por su gran capacidad para el trabajo y por su sonrisa.

Al profesor Jiménez, por ése "saber estar a tú lado" apoyándome en todas mis facetas, laborales y "personales", ayudándome a decidir mi futuro en esos "momentos cruciales". Gracias, gracias por todo.

A la Dirección del Hospital Sant Joan de Déu por su confianza en mí, como persona y trabajadora.

Índice

ABREVIATURAS	8
INDICES tablas, figuras, fotografías y anexos	9
INTRODUCCIÓN	11
Características del óxido nítrico:	12
Origen del óxido nítrico.	
Óxido nítrico espirado.	
Óxido nítrico espirado y fisiopatología del adulto.	
Óxido nítrico espirado en el recién nacido.	
Óxido nítrico y nitritos y nitratos en sangre y orina.	
Variabilidad del óxido nítrico ambiental.	
Técnicas de medición del óxido nítrico.	
Premisas para la medición del óxido nítrico espirado.	
Óxido nítrico e infección	
Justificación.	21
Hipótesis de trabajo.	22
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODO	29
Pacientes.	27
Material y metodología:	28
Recogida del aire espirado.	

Medición del óxido nítrico espirado en el recién nacido.

Validación de la técnica.

Consecución de que el aire inspirado no contenga óxido nítrico de la contaminación ambiental.

Estanqueidad del sistema de recogida.

Interacción del óxido nítrico con el material.

Limpieza del óxido nítrico ambiental de dentro del sistema de recogida antes de su aplicación al recién nacido.

Estabilidad de las concentraciones de ON y O₂N con el tiempo.

Reproductibilidad intrasujeto.

Influencia del llanto y de la sedación del neonato en las cifras del óxido nítrico espirado.

Aparato de quimioluminiscencia.

Análisis de los nitritos y nitratos en sangre y orina.

Variables recogidas.

Análisis estadístico: **46**

Variables dependientes.

Variables independientes.

Tratamiento estadístico.

RESULTADOS: **49**

Validación de la técnica: **49**

Sellado del sistema de recogida.

Reproductibilidad intrasujeto.

Óxido nítrico espirado: **50**

Recién nacidos sanos. Relación ONe con el tipo de parto, edad gestacional y horas de vida.

Recién nacidos con bajo o alto riesgo de infección perinatal.

Influencia de las horas de vida en el ONe total.

Nitritos y nitratos en sangre:	55
Recién nacidos sanos.	
Recién nacidos con bajo o alto riesgo de infección perinatal.	
Relación nitritos y nitratos en sangre y ONe total.	
Nitritos y nitratos en orina.	56
<hr/>	
DISCUSIÓN	59
Pacientes.	59
Material y metodología.	61
Resultados.	66
<hr/>	
CONCLUSIONES	73
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	75

ABREVIATURAS

ON: Óxido nítrico.

O₂N: Óxido nitroso.

ONe: Óxido nítrico espirado.

ONe total: Óxido nítrico espirado total.

ONi: Óxido nítrico inhalado.

ONS: Óxido nítrico sintasa.

ONSi: Óxido nítrico sintasa inducible.

ONx: Nitritos-nitratos.

NO₂⁻: Nitritos.

NO₃⁻: Nitratos.

nL: nanolitro.

ppm: partes por millón.

ppb: partes por billón (igual a ppm multiplicado por mil).

SRSI: Síndrome de respuesta sistémica a la inflamación.

Índice de tablas, figuras, fotografías y anexos

Índice de tablas:

- Tabla 1.** Terminología sobre el óxido nítrico.
- Tabla 2.** Concentración de óxido nítrico en ppm en no fumadores, según Gerlach et al.
- Tabla 3.** Concentración de óxido nítrico y óxido nitroso en las bolsas.
- Tabla 4.** Datos de los pacientes y variabilidad de las determinaciones.
- Tabla 5.** Comparación entre las recogidas de ONe total según la presencia de sedación en el neonato.
- Tabla 6.** Distribución de los recién nacidos sanos.
- Tabla 7.** Resultados de las determinaciones de ONe total respecto al tipo de parto y edad gestacional.
- Tabla 8.** Comparación de variables con la edad gestacional en recién nacidos sanos.
- Tabla 9.** Diferencias de los valores de ONe total en recién nacidos sanos, con bajo riesgo de infección y alto riesgo, según las horas de vida.
- Tabla 10.** Aumento de las cifras de ONe total en la segunda determinación en el estudio longitudinal de recién nacidos sanos.
- Tabla 11.** Resultados de las determinaciones evolutivas de ONe total según las horas de vida en el alto riesgo de infección.
- Tabla 12.** Nitritos y nitratos en sangre en los recién nacidos sanos.
- Tabla 13.** Nitritos y nitratos en sangre en recién nacidos sanos y con bajo o alto riesgo de infección.
- Tabla 14.** Resultados de los nitritos y nitratos en orina y nitritos y nitratos/creatinina en orina.

Índice de figuras:

- Figura 1.** Medidas sincronizadas de ON y CO₂ en recién nacidos, en la respiración regular.
- Figura 2.** Medidas sincronizadas de ON y CO₂ en la hipofaringe de recién nacidos.
- Figura 3.** Óxido nítrico ambiental en la UCI neonatal.
- Figura 4.** Técnica de recogida del óxido nítrico espirado en el recién nacido.
- Figura 5.** Lavado de óxido nítrico ambiental para el aire inspirado.
- Figura 6.** Lavado del óxido nítrico ambiental del interior de las bolsas.
- Figura 7.** Ausencia de degradación en el sistema de recogida.
- Figura 8.** Análisis del sistema colector.
- Figura 9.** Ausencia de síntesis de óxido nítrico en el sistema de recogida.
- Figura 10.** Correlación entre la concentración de óxido nítrico espirado y el porcentaje de llanto.
- Figura 11.** ONe total en recién nacidos sanos y con bajo o alto riesgo de infección perinatal, según las horas de vida.

Índice de fotografías:

- Fotografía 1.** *Aplicación de la mascarilla y sellado.*
- Fotografía 2.** *Detalle de la mascarilla unidireccional y de los tubos de entrada de aire medicinal y salida del volumen espirado que contiene el ONe.*
- Fotografía 3.** *Circuitos de entrada y salida de la mascarilla y unión de las bolsas de recogida mediante interposición de una llave de tres pasos.*
- Fotografía 4.** *Conexión de la bolsa con un flujo de aire medicinal con la rama inspiratoria de la mascarilla.*

Índice de anexos:

- Anexo 1.** *Hoja de consentimiento informado paterno/materno.*
- Anexo 2.** *Hoja de recogida de datos.*

INTRODUCCIÓN

Los primeros estudios que hacen referencia al óxido nítrico datan de principios de los años 70. En 1972 Weston JT se interesó por los efectos que sobre el pulmón podían tener ciertas sustancias inhaladas¹ (entre las que se hallaba el ON) y Halstead CJ desarrolló un método continuo de determinación de óxido nítrico y nitroso en fluidos de gases². En 1976 Dmitrev inició las primeras determinaciones de óxido nítrico atmosférico mediante quimioluminiscencia³. En la vertiente asistencial, en 1974 aparecen las primeras publicaciones que relacionan el óxido nítrico con aspectos de la fisiopatología clínica. Es entonces cuando se relaciona el óxido nítrico con fenómenos de vasodilatación arterial a través de la acción hipotensora del nitroprusiato^{4, 5}. Posteriormente se consigue determinar la molécula de óxido nítrico en sangre humana y se plantea el origen exógeno y/o endógeno del mismo⁶.

Los efectos de los productos derivados de la oxidación del nítrico fueron publicados en el año 1981 en la revista Lancet.

Tras identificar el ON con el factor relajante derivado del endotelio, y con la vasodilatación que éste originaba en diferentes sistemas del organismo, aumentaron las publicaciones⁸⁻¹¹. Incluso se establecieron unas recomendaciones sobre investigación en neonatología y ON¹².

Posteriormente se le empezó a relacionar con fenómenos de vasodilatación pulmonar con lo que empezó a mencionarse su utilidad en la hipertensión pulmonar neonatal y en la hipertensión pulmonar presente en el postoperatorio de cardiopatías congénitas, así como en la hipertensión pulmonar posterior al trasplante de pulmón y corazón, y en el síndrome de distrés respiratorio tipo adulto^{13, 14}.

Doughty en 1996 estudió las modificaciones del óxido nítrico en los enfermos pediátricos¹⁵. Otros autores han analizado sus variaciones en sangre¹⁶⁻¹⁹ y en orina²⁰ en el curso de procesos sépticos pediátricos.

■ Características del óxido nítrico:

Origen del óxido nítrico:

El óxido nítrico (ON) es una molécula endógena, de señalización intercelular y que se forma a partir del aminoácido L-arginina, a través de la enzima ON-sintasa (ONS). Hasta la actualidad se han caracterizado tres isoformas de dicha ONS. Dos de ellas son las constitutivas (ONSc), los tipos 1 y 3, y se expresan en las células endoteliales y en las neuronas. La otra es la isoforma inducible (ONSi) y es la tipo 2, que se expresa en las células epiteliales de la vía aérea, así como en los neutrófilos y en los macrófagos alveolares²¹.

La síntesis de ON a partir de la ONSi puede ser estimulada por las citoquinas inflamatorias y las endotoxinas, que conllevan una acción citostática y bactericida²². Por lo tanto, el ON está involucrado en un amplio espectro de procesos fisiopatológicos, dentro de los cuales cabe destacar los que afectan la vía respiratoria y los que implican fenómenos infecciosos. Está demostrada la capacidad del ON inhalado (ONi) de actuar como vasodilatador pulmonar selectivo así como de broncodilatador endógeno²³.

Los nitritos y nitratos (ONx) en sangre y orina son sus metabolitos estables y se utilizan como marcadores de la cuantía de su síntesis endógena.

Óxido nítrico espirado:

El ON espirado (ONe) incluye al ON exhalado (ON de origen broncoalveolar) y al ON nasal residual (diferencia entre el ON nasofaríngeo autoinhalado y el reabsorbido en las vías aéreas inferiores y alveolos).

Terminología:

Inhalado: exógeno, terapéutico

Endógeno: síntesis constitutiva e inducible

Nasal: nasofaríngeo

Espirado = exhalado + NO nasal residual

Broncoalveolar **NO nasal**

Autoinhalado - Reabsorbido

Tabla 1. Terminología sobre el óxido nítrico.

Óxido nítrico espirado y fisiopatología del adulto:

El ON nasofaríngeo es detectado junto con el ON exhalado si la recogida del gas espirado es a través de la boca y nariz. Debe recordarse que el recién nacido y lactante pequeño son preferentemente respiradores nasales. Las bacterias nasales pueden tomar parte en la síntesis del ON nasofaríngeo²⁴.

En adultos sanos, el ONe tiene un origen casi exclusivamente nasal, observándose, por ejemplo, que es incuantificable en el síndrome de Kartagener²⁵. Gerlach y col²⁴ describieron que la síntesis endógena de ON era de 0.063 ppm, mientras que la capacidad de las bacterias de la nasofaringe para sintetizar ON era mucho mayor, con medias de 0,649 ppm.

Los senos paranasales probablemente también forman parte en la producción de ON en adultos²⁶. Las cifras de nasofaringe y tráquea, más altas en la inspiración que en la espiración, sugieren que el ONe no procede de la síntesis pulmonar (aunque no se puede descartar que exista una porción de origen broncoalveolar), sino que sería sobre todo el ON residual del ON nasal autoinhalado, después de pasar y ser reabsorbido por los alveolos. El ON nasofaríngeo debe ser inhalado y reabsorbido por el tracto respiratorio inferior puesto que la suma de ON y O₂N estaba reducida en la fracción espiratoria y el cociente ON/O₂N sólo cambiaba ligeramente (por lo tanto, la disminución espiratoria del ON no era a causa de la conversión de ON en O₂N)²⁴.

Concentraciones de ON en ppm, en el adulto:

	Inspiración	Espiración
Boca	Poco	Poco
Nasofaringe	0.109	0.079
Tráquea	0.089	0.042
Ventilador	0.002	0.063

Síntesis en nasofaringe: media de 0.649.

Tabla 2. Concentraciones de ON en ppm, en no fumadores, según Gerlach H et al²⁴

La intubación endotraqueal impide la autoinhalación natural de dicho ON de producción nasofaríngea, encontrando niveles de ON muy bajos en el gas espirado que se origine distalmente a las cuerdas vocales²⁷. Si la ventiloterapia utiliza “aire comprimido” en vez de “aire medicinal”, se aportan pequeñas cantidades de ON (entre 0.013-0.079 ppm) que tienen efectos fisiológicos positivos como vasodilatador pulmonar y que suplen a la autoinhalación del ON producido en las vías aéreas superiores²⁸.

En la cavidad gástrica se producen grandes cantidades de ON (0.8-6 ppm), y sus concentraciones son hasta 100 veces superiores que las encontradas en el ONe a través de la boca. Esta producción requiere un ambiente ácido y disminuye un 95% si previamente se administra omeprazol (inhibidor de la bomba de protones)²⁹.

En las enfermedades respiratorias, el ONe es formado principalmente en los bronquiolos respiratorios terminales³⁰, a partir de las células inflamatorias como los neutrófilos o los macrófagos alveolares, y de las células epiteliales y endoteliales de este tracto respiratorio.

Elevación del ONe

En el adulto, el pico de ONe es más alto tras aguantar la respiración durante 5-60 segundos.

Las concentraciones de ONe disminuyen durante el ejercicio, pero si se tiene en cuenta el aumento del volumen minuto ventilatorio, la excreción total de ONe aumenta durante la hiperventilación o el ejercicio³⁰.

La ingesta de 0,1-0,2 mg/kg de L-arginina comporta una elevación significativa de ONe, que es máxima a las 2 horas³¹. La administración de nitroglicerina también aumenta el ONe³².

En el adulto, los valores de ONe aumentan en enfermedades pulmonares tales como el asma^{33, 34}, las bronquiectasias³⁵, las infecciones de la vía respiratoria alta³⁶ y la descompensación de la cirrosis hepática³⁷. El aumento de las bacterias nasales eleva el ONe y la rinitis alérgica aumenta el ON nasal³⁸.

En conjunto, estas observaciones sugieren que el incremento de ONe procede de un aumento de la síntesis de ON, probablemente a partir de la ONSi, estimulada por la mayor actividad inflamatoria en la vía aérea. Además la administración de corticoides inhalados a los pacientes con asma reduce la concentración de ONe a niveles similares a adultos sanos³⁸.

En el niño se ha descrito elevación del ONe en el asma y reducción del mismo tras el tratamiento corticoideo inhalado.

Disminución del ONe

Los valores de ONe decrecen en el caso de adultos fumadores. Estas personas inhalan grandes cantidades de ON procedente del humo del tabaco, que podrían inhibir la producción endógena de ON; también podría existir un daño tóxico de las células pro-

ductoras de ON causado por el humo del tabaco. El ONe también disminuye en casos de hipertensión arterial³⁹ y tras la ingesta de etanol⁴⁰.

La ventiloterapia prolongada disminuye la síntesis nasofaríngea y ello podría responder a la administración de antibióticos en estos pacientes. Sin embargo esto no se ha demostrado y no se han observado cambios en las cifras de ONe en mujeres embarazadas, tras una semana de antibioticoterapia⁴¹ entre las 10 y las 42 semanas de gestación. El síndrome de Kartagener y la fibrosis quística⁴² disminuyen el ON nasal.

Óxido nítrico espirado en el recién nacido:

En los años 1996 y 1997, Schedin y col^{43,44} describieron niveles de ONe en las fosas nasales de recién nacidos sanos, utilizando la ley general de los gases para estimar la tasa de excreción nasal de ON. Sus resultados para una sola fosa nasal en neonatos a término de 4-7 días de vida fueron 0,11 nmol/min × kg (equivalentes a 2,64 nL/min × kg). Por lo tanto para las dos fosas nasales sería aproximadamente el doble: 5,28 nL / min × kg.

En el 1998, Arlich y col⁴⁵ calcularon el ON total eliminado a través de las fosas nasales en 6 recién nacidos pretérmino.

Óxido nítrico y nitritos y nitratos en sangre y orina:

La relación entre las cifras de nitritos (NO₂⁻)/nitratos (NO₃⁻) y los niveles de óxido nítrico en sangre ha quedado patente en diferentes estudios^{46, 47}. Dichos substratos serían metabolitos estables del ON susceptibles de ser detectados en la sangre y se elevarían en los casos de sepsis o inflamación al igual que sucede con el óxido nítrico⁴⁸.

Existen diferentes metodologías para su detección.

Hasta hace pocos años ha sido utilizada la espectrometría utilizando el reactivo Griess⁴⁹. Sin embargo dicha metodología no diferencia con exactitud entre los nitritos y las aminas biogénicas del plasma. Como novedad se introdujo la “High-performance liquid chromatography” (HPLC), mucho más sensible y con mejor relación coste-efectividad para la detección directa de los niveles de nitritos/nitratos en las muestras de suero⁴⁹. También se ha modificado la técnica suplementándola con la desprotección y reducción de los nitratos a nitritos con buenos resultados⁵⁰.

Recientemente se ha descrito el análisis de los nitritos y nitratos de los fluidos biológicos mediante electroforesis capilar con la ventaja de ser más rápida y económica y precisar de una menor muestra de fluido⁵¹.

También se ha utilizado la cromatografía iónica. Mediante una dilución de la muestra de sangre problema con un ión (de bicarbonato y carbonato o de ácido clorhídrico) que produce una conductividad detectable por cromatografía⁵².

Las técnicas de HPLC y de electroforesis capilar también son útiles para la detección de nitritos y nitratos en orina.

En nuestro estudio utilizamos la técnica de la detección del 2,3-diaminonaftaleno^{53, 54}.

Variabilidad del ON ambiental:

Las cifras de ON ambiental varían con respecto a la geografía pero también con el clima y la contaminación ambiental. En la Nursery del Hospital Clínico, las cifras diarias variaban entre 0.013 ppm y 0.224 ppm.

Técnicas de medición del ONe:

Cabe distinguir diferentes metodologías en función de la edad del paciente que implicará la posibilidad de colaboración o no del mismo:

a) Niños mayores de 6 años

“exhalación lenta contra resistencia”⁵⁵⁻⁵⁷

- **NO exhalado:** “meseta” con CO₂ entre 5-6%
- **NO nasal:** cuando CO₂ es 0,21%

b) Recién nacidos⁵⁸

- NO nasal o faríngeo, controlado por CO₂ (ppm)
- NO nasal × 2 + ley general de gases (nmol/kg × min)
- NO espirado total (nL/min × kg)

La “exhalación lenta contra resistencia” es el mejor método actualmente aceptado para la medición del ON espirado en niños mayores de 6 años. El niño debe exhalar a través de una cánula la cual, para generar un flujo espiratorio de 250 mL/seg, origina una presión retrógrada de 50 mm de agua en la boca, que es suficiente para ocluir las fosas nasales por el velo del paladar e impedir la contaminación del ON espirado por el ON nasal. El registro del ON espirado consta de dos partes: una inicial o “pico” que corresponde al aire del espacio muerto y presenta gran contaminación con aire nasal previamente inhalado, y una segunda o “meseta” que es el registro estable de ON y traduce la producción de ON a nivel broncoalveolar. El registro del verdadero ON exhalado se hará en la meseta cuando el CO₂ esté entre el 5-6%. Un estado de broncoconstricción podría falsear los resultados⁵⁹.

El ON nasal se determina con la misma técnica anterior de “exhalación lenta contra resistencia” pero dejando libre un orificio nasal mientras el analizador de ON aspira aire a través de la otra fosa nasal ocluida. El registro del verdadero ON nasal se realiza cuando el CO₂ es 0.21 (aire ambiente nasal). Para que el registro sea válido, el ON ambiental debe ser despreciable⁶⁰.

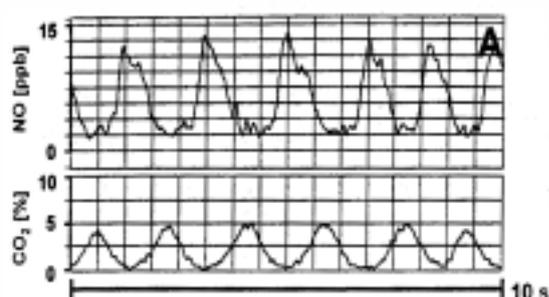


Figura 1. Medidas sincronizadas del ON y del CO₂ en la hipofaringe de recién nacidos en la respiración regular.

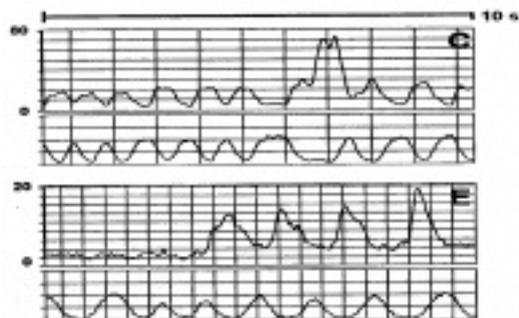


Figura 2. Medidas sincronizadas del ON y del CO₂ en la hipofaringe de recién nacidos.

C: picos inspiratorios intermitentes de ON.
E: cambios súbitos en los picos inspiratorios de ON con períodos de baja concentración de ON inhalado.

Artlich A. *Biol Neonate* 2001; 79: 21-26

Estas técnicas determinan la concentración del ON en ppm, pero no cuantifican la síntesis total del mismo.

La hipótesis de si el ONe puede equipararse al de producción alveolar mediante exhalación directa ha quedado desestimada. Byrnes⁶¹, analizando el ONe y el CO₂ espirado mediante exhalación directa y a través de un sistema de pieza en "T" interpuesta al aire espirado, concluyó que los picos y el plateau de ON eran mucho más rápidos que los de CO₂ con lo que el ONe analizado tenía fundamentalmente un origen en la vía respiratoria alta. En otro estudio, Kharitonov comparó la exhalación de aire con y sin resistencia: mediante administración de argón de forma continua en la fosa nasal y con análisis concomitante en la orofaringe de dicho gas y del CO₂ espirado, constató que en la espiración simple las cifras de argón en la orofaringe se incrementaban notablemente ya que no existía resistencia que cerrara el paladar y por lo tanto se contaminaba la muestra exhalada con el argón nasal⁶².

En un estudio llevado a cabo por Zetterquist⁶³ se alerta de un posible error en la interpretación del ONe medido por la técnica contra resistencia: el menospreciar la producción salivar de ON. En voluntarios que habían ingerido alimentos ricos en nitratos el día previo a la determinación del ONe, las determinaciones eran significativamente mayores.

Existen por el momento unas recomendaciones generales elaboradas en el año 1999 por la “American Thoracic Society” que estandarizan los procedimientos de medición del óxido nítrico nasal y del alveolar en niños y adultos⁶⁴.

Premisas para la medición del ONe:

Para obtener unos resultados correctos deben de tenerse en cuenta las siguientes premisas:

1. Los materiales del sistema no deben generar ni captar ON (al recoger el aire en bolsas podría inactivarse el ON⁶⁵). Esto se demostrará con experimentos en los que el sistema sea atravesado por aire medicinal libre de ON o por ON a concentraciones conocidas⁶⁶.
2. Para detectar pequeñas cantidades de ON es imprescindible disponer de quimioluminiscencia, con calibración mediante 0,420 ppm de ON aproximadamente, ya que los aparatos electroquímicos son poco sensibles.
3. Las concentraciones de ON en aire ambiental no afectan las lecturas del pico de ONe ni las mediciones de ONe mediante la técnica de “exhalación contra resistencia”⁵⁷⁻⁵⁸. Sin embargo, en las técnicas de recogida total del aire espirado, la contaminación con aire ambiental (o aire centralizado comprimido) rico en ON invalidaría los resultados. Por ello el neonato debe respirar previamente aire medicinal libre de ON contaminante.
4. La reproductibilidad intrasujeto debe estar garantizada, por lo que se deberían realizar dos o tres mediciones en cada sujeto y adoptar como correcta la media de las mismas, desestimando las mediciones en que el coeficiente de variación porcentual supere el 30%.

Oxido nítrico e infección:

Dentro de los procesos involucrados en la denominada “cascada inflamatoria”, relacionada con el “síndrome de respuesta sistémica a la inflamación” (SRSI) en los

fenómenos de infección y sepsis, también se ha implicado al óxido nítrico. La infección provocaría un daño endotelial que originaría la formación de óxido nítrico y sus derivados (nitritos y nitratos) que causarían vasodilatación.

Doughty publicó un estudio pediátrico, con 19 pacientes diagnosticados de sepsis y otros 12 no infectados como grupo control, en los que determinó las cifras de nitritos y nitratos en sangre como indicadores de fallo orgánico, resultando estadísticamente significativo¹⁵. El mismo autor demostró que el aumento de las concentraciones de nitritos y nitratos en plasma se relacionaba con el desarrollo de fallo multiorgánico¹⁶.

En la enfermedad meningocócica también se ha descrito un aumento de los niveles en sangre de estos metabolitos del óxido nítrico¹⁷. Otro estudio realizado por Spack en el 1997 corroboró también estos datos ya que mostró la fuerte asociación entre las concentraciones en sangre de nitritos y nitratos con el diagnóstico de SRSI, además de ser un marcador de inflamación¹⁸.

Otra vertiente de estudio ha sido la determinación en neonatos de las cifras de nitritos en orina como marcadores de SRIS en pacientes sépticos, evidenciándose una elevación significativa en estos casos¹⁹. Ergenekon concluyó en otro estudio los mismos resultados: elevación del óxido nítrico urinario en recién nacidos con sospecha de infección, analizado el ON mediante quimioluminiscencia²⁰.

■ **Justificación:**

Este estudio pretende validar una nueva metodología para la determinación exacta de las cifras de ONe total en el recién nacido sano y, a partir de las determinaciones basales, detectar si existen diferencias con los recién nacidos con alto riesgo de infección neonatal, dado que, como se puede inferir del texto previo, el ON está implicado en los fenómenos de la cascada inflamatoria que se desencadenan en la infección.

Mediante este método se recoge el gas espirado tanto por la nariz como por la boca, incluyendo por tanto el ONe de síntesis nasal (ON nasal) como el de vías respiratorias bajas (ON broncoalveolar).

La dosificación del ONe total serviría como marcador incruento de la síntesis endógena de ON producida en dichas situaciones. De esta manera, si se elevaran las cifras de ONe total en recién nacidos de madres con corioamnionitis podría considerarse esta determinación cuando se estudiaran recién nacidos con neumonía y/o sepsis.

Además, si se demostrara la influencia de la antibioticoterapia en las cifras del ONe total, cabría analizarla en función de la patología y de los días de tratamiento.

En el caso de las neumopatías crónicas inflamatorias del lactante (displasia broncopulmonar) la elevación del ONe total podría correlacionarse con la gravedad de la enfermedad, y, su disminución, con una posible mejoría después de determinadas terapias, indicando la utilidad clínica de las mismas.

En caso de corroborarse estos datos, podrían validarse y utilizarse otros métodos de recogida del ONe como el bucal o el endotraqueal.

■ Hipótesis de trabajo:

A partir de los datos apuntados se establece la hipótesis de trabajo.

Las cifras de ONe total serán iguales en los recién nacidos a término que en los pretérmino, siempre que, en este último caso, la prematuridad no haya sido desencadenada por una infección. Así mismo, las cifras de ONe total serán más elevadas en los recién nacidos fruto de un parto vaginal que por cesárea, ya que la contaminación de las fosas nasales será mayor al atravesar el canal del parto. Además, dichas cifras aumentarán con las horas de vida, ya que al nacer no existe flora bacteriana nasal, que aparecerá en las primeras horas o días de vida. Las cifras de ONe total serán mayores en recién nacidos de madre con corioamnionitis que en los sanos o con riesgo de infección perinatal por otras causas, dado que la contaminación y/o sobreinfección nasal

estará presente ya al nacimiento y será más intensa. Por otra parte, existirá una correlación positiva entre las cifras de ONe total y los nitritos y nitratos en sangre, con lo que se podrá considerar al ONe total como un marcador de la síntesis endógena de ON.

OBJETIVOS

1. Validación clínica de una nueva metodología para medir el ONe total en el recién nacido.
2. Determinar la posible influencia de la edad gestacional, tipo de parto y horas de vida en el ONe total durante los tres primeros días de vida del recién nacido.
3. Conocer los valores de normalidad de las cifras de ONe total (nL/min × kg) para cada subgrupo de pacientes.
4. Estudiar los cambios que se producen en los valores de ONe total en los recién nacidos con riesgo de infección perinatal por corioamnionitis materna u otras causas.
5. Analizar las relaciones entre los valores del ONe total con los niveles de nitritos y nitratos en sangre.

MATERIAL Y MÉTODOS

■ Pacientes:

Se procuró incluir un total de 30 recién nacidos en cada uno de los grupos de pacientes a estudiar:

- Recién nacidos sanos:
 - a) A término:
 - parto vaginal
 - parto por cesárea
 - b) Pretérmino moderado:
 - parto vaginal
 - parto por cesárea
- Recién nacidos con bajo riesgo de infección perinatal.
- Recién nacidos con alto riesgo de infección perinatal.

Se consideró como bajo riesgo de infección perinatal. A la presencia de una ruptura de membranas de más de 24 horas en los a término o de 12 horas en los pretérmino, o al antecedente de madre portadora de *Streptococcus agalactiae*.

El alto riesgo de infección se definió cuando el recién nacido recibió antibioterapia por corioamnionitis materna, o por signos clínicos o analíticos de infección neonatal iniciales (leucopenia menor de 5.000 leucocitos /microlitro, índice de desviación a la izquierda superior de 0.20 y/o proteína C reactiva mayor de 20 mg/L) pero en los que el diagnóstico de infección se descartó basándose en la negatividad de los cultivos y la rápida normalización de la proteína C reactiva y el recuento de neutrófilos en su evolución.

Se definió como corioamnionitis la presencia en la madre de fiebre superior a 38°C pre-intraparto de origen uterino, analítica materna de infección, así como la existencia de irritabilidad uterina o aguas purulentas/fétidas en el período perinatal.

Criterios de inclusión:

- Haber nacido en la Unidad Integrada Hospital Clínico-Hospital Sant Joan de Déu.
- Consentimiento informado previo al estudio (anexo 1).
- Edad gestacional entre 34 y 41 semanas.
- Edad cronológica inferior a 3 días de vida (dado que esta es la edad límite para ser dados de alta).

Criterios de exclusión:

- Estado de enfermedad, a excepción de la ictericia y, lógicamente, del riesgo de infección.
- Recién nacidos que hayan requerido administración de sustancias dadoras de ON (nitroglicerina, nitroprusiato).
- Requerimiento de oxigenoterapia o de intubación endotraqueal por la metodología de recogida de la muestra y por implicar otros estados de enfermedad.

■ **Material y metodología:**

Recogida del aire espirado:

Se utilizó una nueva metodología ya descrita previamente⁶⁵⁻⁶⁶.

El aire espirado a través de las fosas nasales y de la boca, se recoge mediante una mascarilla aplicada directamente a la cara (Small facemask. Vital signs. Fleisch, Switzerland), y sellada mediante un adhesivo a la piel (Opside) para evitar contaminación y fugas. *Fotografía 1.*



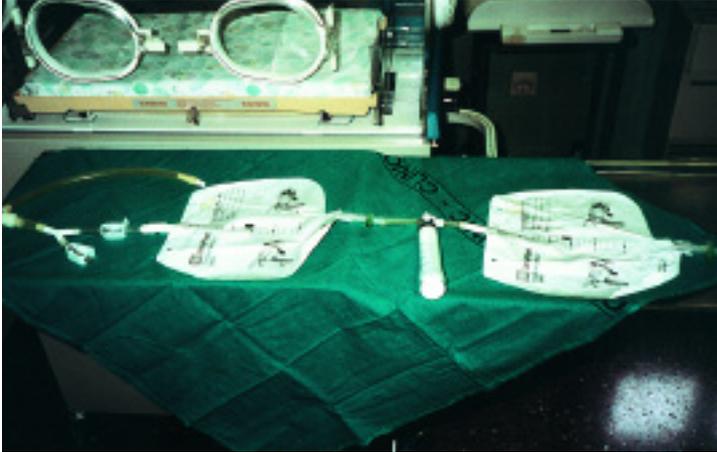
Fotografía 1. Aplicación de la mascarilla y sellado.

La máscara incorpora un sistema de dos válvulas unidireccionales, una inspiratoria y la otra espiratoria (2.200 series. 2 way valve. Mans Rudolph Inc. KC. MO. USA). El espacio muerto originado con este sistema queda minimizado. *Fotografía 2.*



Fotografía 2. Detalle de la mascarilla unidireccional y de los tubos de entrada de aire medicinal y salida del volumen espirado que contiene el ONe.

El gas espirado se recoge en dos bolsas de plástico (Unoplast. Unometerbag 2000), que quedan separadas por una llave de tres pasos que a su vez conecta con una jeringa de 50-60 ml (Plastipak B-D). La entrada a la primera bolsa se conecta con el tubo espiratorio de la máscara mediante conexión en Y, lo que permite el paso directo del gas espirado por el recién nacido a dicha bolsa. La salida de la segunda bolsa queda regulada por otra válvula de salida que conecta con el aparato de quimioluminiscencia. *Fotografía 3.*



Fotografía 3. Circuito de tubos de entrada y salida de la mascarilla y unión de las bolsas de recogida mediante interposición de una llave de tres pasos.

El aire ambiental contiene grandes cantidades de ON, con concentraciones cambiantes según el grado de contaminación, sobre todo del tráfico rodado (*Figura 3*)

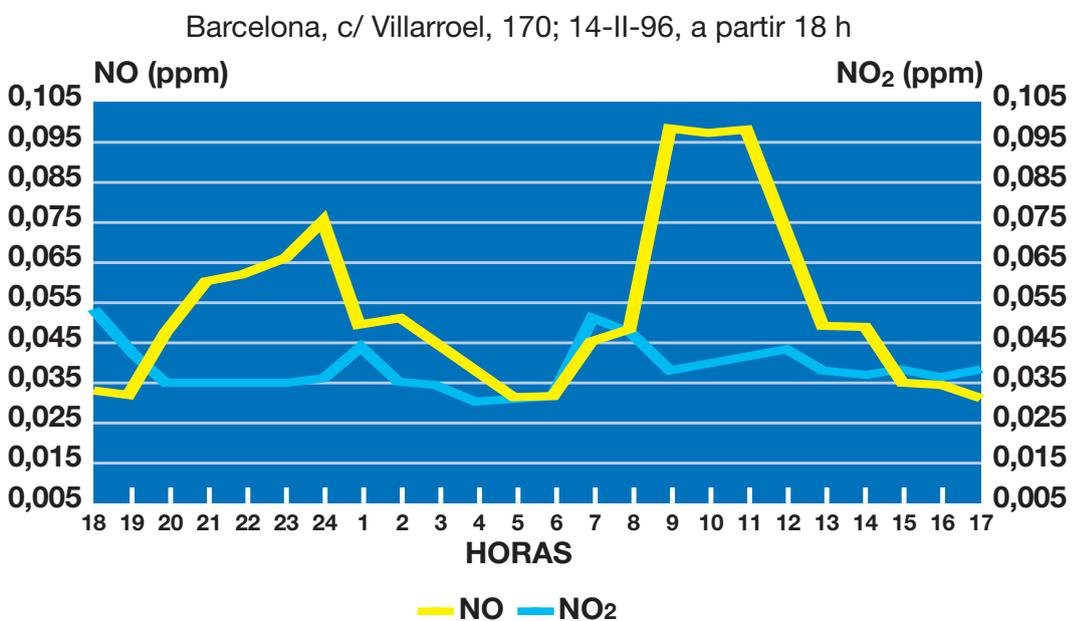
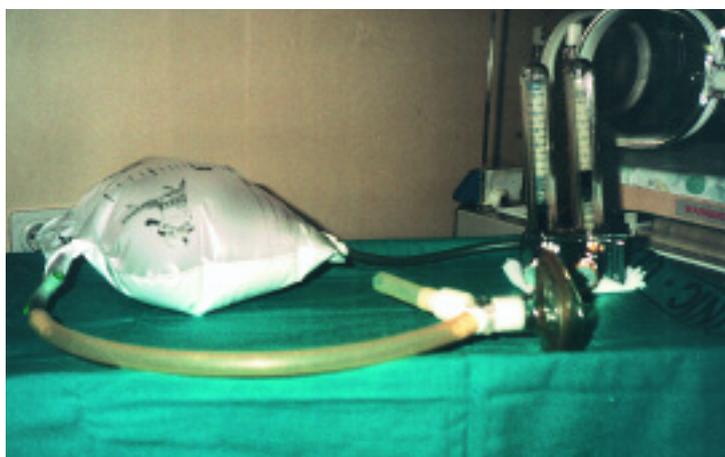


Figura 3. Óxido nítrico ambiental en la UCI neonatal.

Para evitar la contaminación del sistema de recogida por el ON ambiental, previa su aplicación al recién nacido, se realizó una “depuración” mediante el paso de aire medicinal (exento de ON) a través del sistema, a un flujo de 0,75 L/min durante 15 minutos. De esta forma, la concentración de ON al final del circuito resultó inferior a 0.004 ppm.

Con la intención de lavar el ON contaminante en las vías respiratorias bajas, antes de la recogida del ON el recién nacido respiró aire medicinal durante 5 minutos (tiempo descrito en estudios en adultos⁴), a través de conectar a la rama inspiratoria de la mascarilla, una bolsa con un flujo de 1 L/min que actúa de reservorio. *Fotografía 4.*



Fotografía 4. Conexión del flujo de aire medicinal con la rama inspiratoria de la mascarilla.

El aire espirado se recogió durante un minuto. Este período permite la recolección de 1-2 L de aire espirado, suficiente para medir las concentraciones de ON y O₂N. Durante la recogida, la llave de tres pasos permanece cerrada y se recoge el tiempo de llanto. Si el recién nacido lloraba más de 10 segundos, la recogida se repetía. Al final del minuto de recogida, la válvula de entrada a la primera bolsa se cierra.

Inmediatamente después de la recogida del aire espirado, el gas se traslada de la primera a la segunda bolsa, a través de la jeringa interpuesta, contándose el número de emboladas necesarias para ello (por su capacidad equivaldrá al flujo = volumen / tiempo usado). Cuando la primera bolsa está vacía, la llave de tres pasos se

cierra y la salida de la segunda bolsa se abre, conectándose al aparato de quimioluminiscencia (CLD 700 AL. ECHO Physics AG-Postfach. CH-8635. DÜRNTREN) para la determinación del ONe. La mínima tasa de flujo para la máquina es de 300 mL/min, y el límite de detección de 0.001 ppm de ON. La calibración de la máquina se realiza con ON de 0,420 ppm.

Cabía considerar la posibilidad de sedar al neonato con midazolam sublingual a dosis de 0,2 mg/kg. Otra opción para realizar con éxito la recogida era practicarla aproximadamente una hora después de la toma, en que el neonato suele estar más relajado o dormido.

La figura 4 resume la recogida del ONe en el recién nacido.

Medición del ONe en el recién nacido:

El ON espirado total en nanolitros (nL), depende del tiempo y del tamaño del recién nacido (peso y/o superficie corporal en m²) por lo que el ONe se expresa en nL por min⁻¹ y por kg⁻¹ ó nL por min⁻¹ y por (m²)⁻¹.

El total espirado equivaldrá a su proporción en el aire espirado, multiplicado por el volumen total espirado en un determinado tiempo. Por todo ello el total espirado de ONe/kg será:

$$\text{ONe (ppm)} = \frac{\text{ON espirado (nL)} \times \text{volumen espirado (mL)/tiempo (minutos)}}{\text{peso (kg)}}$$

La conversión a nanomol (nmol) se realiza aplicando la equivalencia de que un mol es igual a 24,3 litros (para una temperatura ambiental de 23 °C).

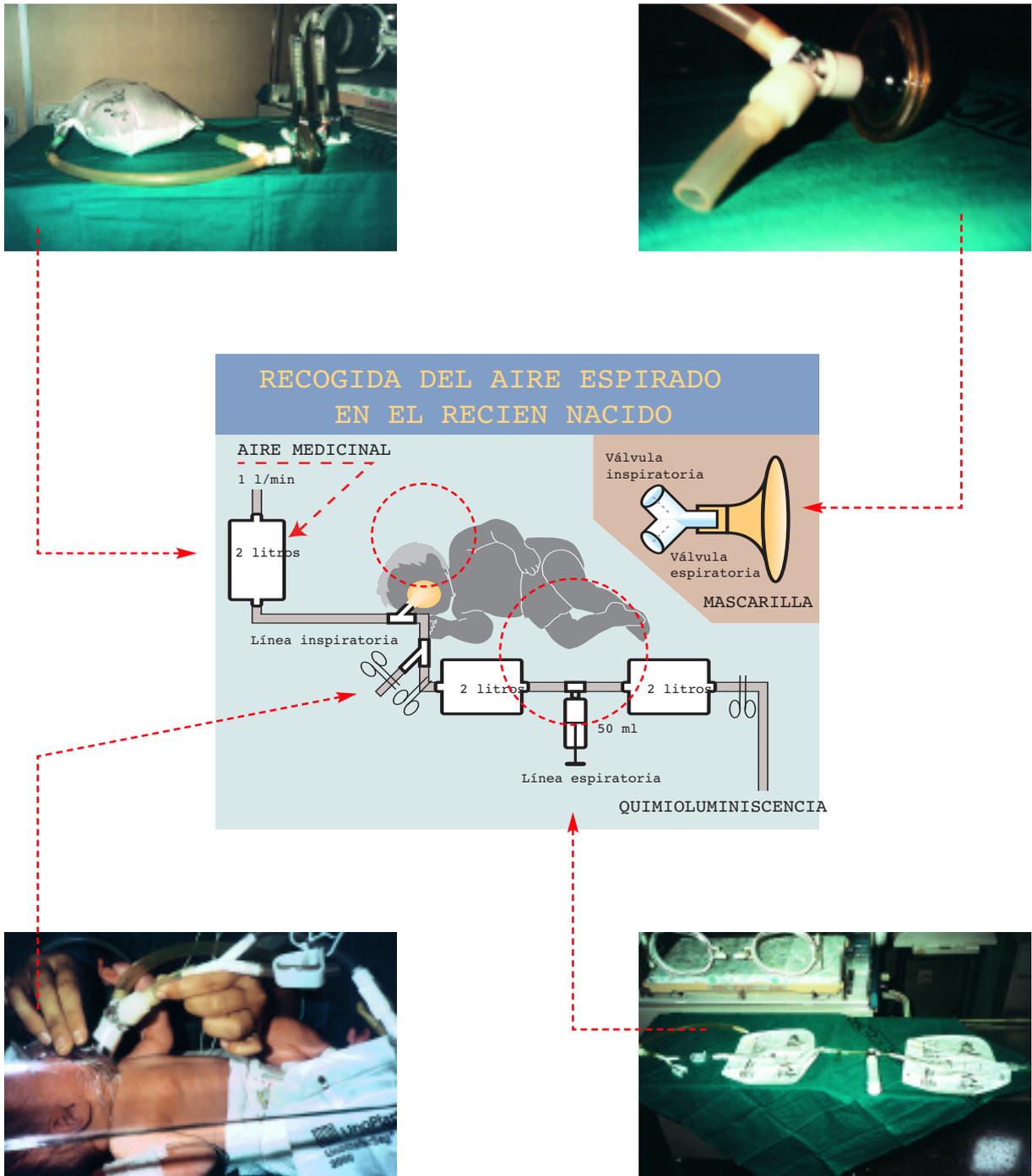


Figura 3. Técnica de recogida del ONE en el recién nacido.

Ejemplo:

Recién nacido de 3 kg; Volumen espirado 900 mL/min. ONe 0.045 ppm.

$$\text{ONet total} = \frac{0.045 \text{ partes ON}}{1.000.000 \text{ partes}} \times \frac{900 \text{ mL}}{1 \text{ min}} \times \frac{1000000 \text{ nL}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1}{3 \text{ kg}} = \frac{13,5 \text{ nL ON}}{\text{min} \times \text{kg}}$$

Validación de la técnica:

Después de diseñar el sistema de recogida, se realizaron varias pruebas antes de utilizarlo.

Para conseguir que el aire inspirado no contenga el ON de la contaminación ambiental:

Existen dos técnicas:

a) Lavado del microambiente del recién nacido en la incubadora o en una campana o cabezal de oxígeno:

Se ha intentado experimentalmente introduciendo 15 L/min de aire medicinal en la incubadora, tanto conectada (al ponerse en marcha el ventilador y el calefactor, se introduce aire ambiental contaminado) como desconectada de la red eléctrica (no entra aire ambiental, pero se enfría la incubadora, a un ritmo de 1,5°C cada 10 minutos). También se ha intentado en una campana de lactantes y en otra de recién nacidos, con la incubadora conectada o desconectada.

Los resultados obtenidos tras la metodología descrita muestran que, como era de esperar, la campana de recién nacido, con menor capacidad, permite un mejor lavado del ON ambiental, alcanzándose 0.005-0.006 ppm al cabo de 5 minutos, tanto con la incubadora conectada como desconectada. Sin embargo, esta campana es muy pequeña para introducir la cabeza del recién nacido y la mascarilla que permita la recogida del ONe. Si se utiliza la campana de lactantes, se necesitan 10 minutos para llegar a 0.008-0.009 ppm,

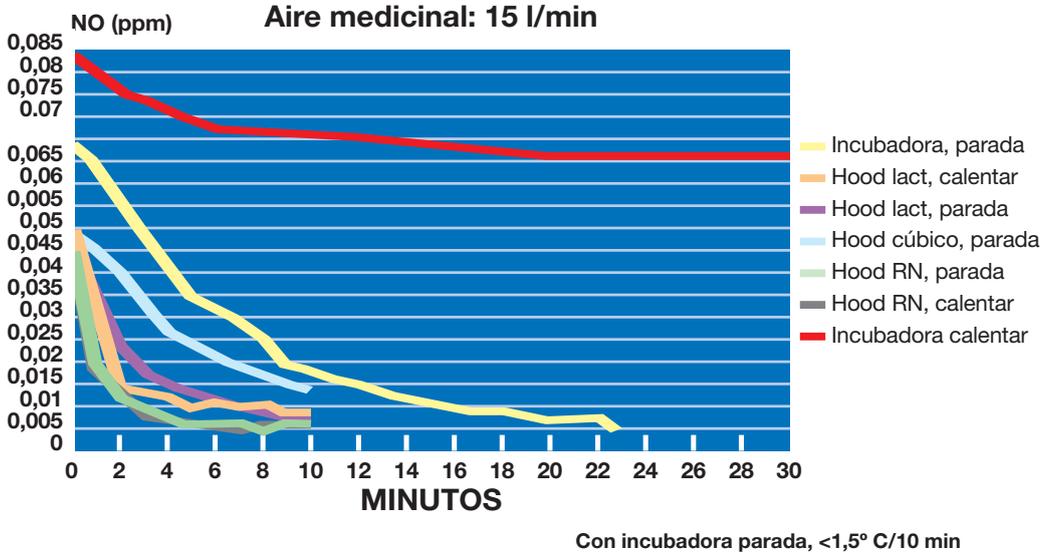
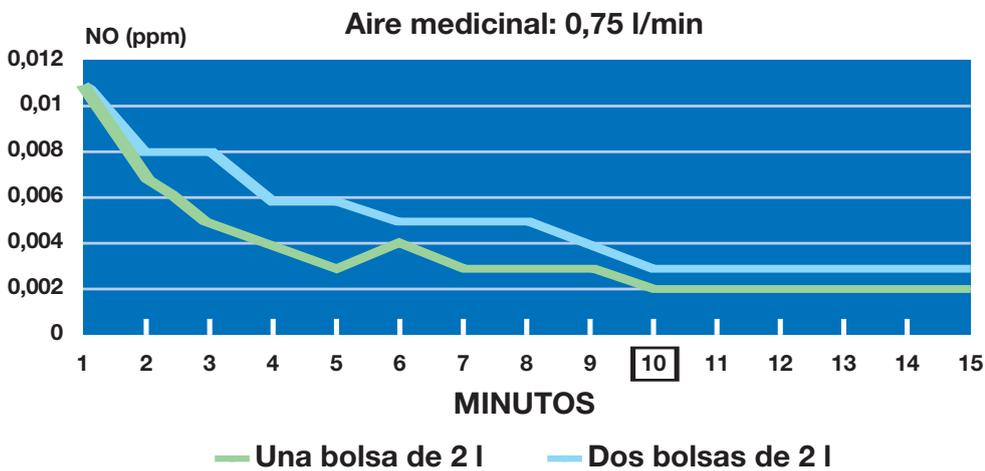


Figura 5. Lavado de óxido nítrico ambiental para el aire inspirado.



NO ambiental: 0,066-0,068 ppm

Figura 6. Lavado de óxido nítrico ambiental del interior de las bolsas.

tanto con la incubadora conectada como desconectada, cifra demasiado elevada para considerarla basal. (*Figura 5*).

b) Introducción a través del tubo inspiratorio de la mascarilla de un flujo a demanda de aire medicinal:

Este método permite ahorrarse la campana pero exige una total estanqueidad de la mascarilla sobre la piel de la cara, ya que si se inspira aire exterior se contamina toda la muestra. El aire medicinal se introduce en una bolsa de plástico de 2 L de capacidad, a un flujo de 0.75L/min durante 15 minutos. De esta manera se consigue que el gas que sale de la bolsa tenga un ON de 0.002 ppm, tolerable para ser basal (*Figura 6*).

Posteriormente se conecta la salida de la bolsa al tubo inspiratorio de la mascarilla, previamente fijada de modo estanco. Pasados 5 minutos de respirar el recién nacido el aire medicinal, se considera, como hemos mencionado anteriormente, que en el espacio muerto y los alveolos ya sólo existen can-

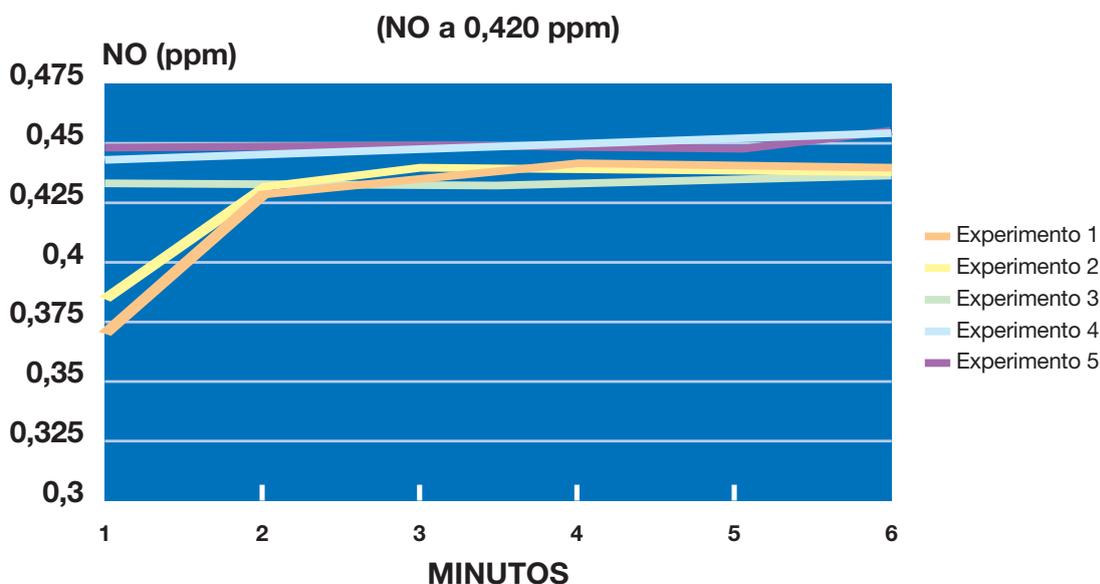


Figura 7. Ausencia de degradación en el sistema de recogida.

tidades mínimas de ON contaminante. A partir de este momento ya podrá recogerse el aire espirado.

Estanqueidad del sistema de recogida:

El sellado de las conexiones se ratificó ocluyendo el sistema con una pinza a diferentes niveles y verificando la total aspiración con la jeringa, que debía conseguir el vacío.

Interacción del ON con el material:

Comprobación de que el material del sistema no reacciona con el ON:

Al realizar la recogida del aire espirado en bolsas, había que demostrar que no se inactivaba el ON con ellas. Se comprueba que el material del sistema no reacciona ni genera ON con varios experimentos en los que, a través de las dos bolsas del sistema, se hace circular aire medicinal (libre de ON), o bien aire con una concentración conocida de ON, durante 3 minutos.

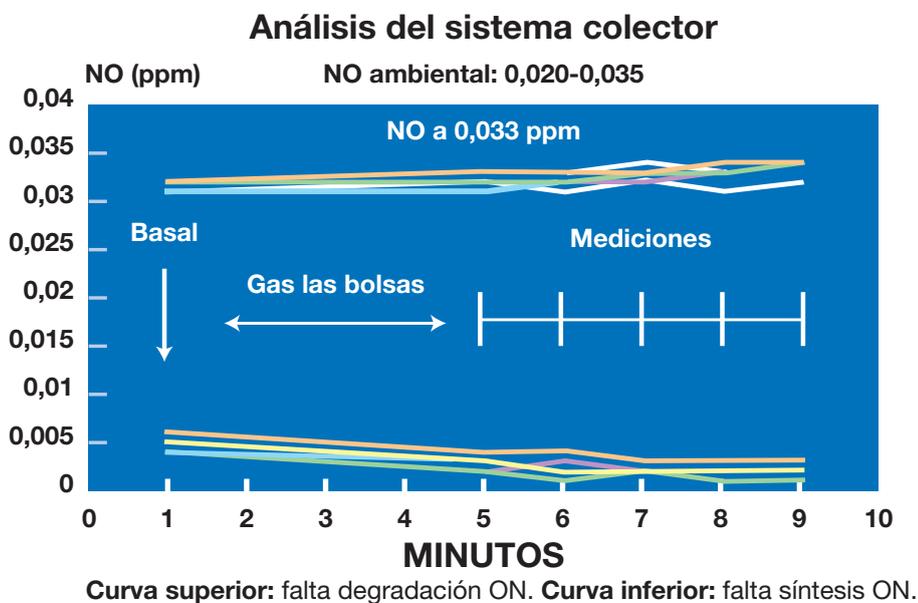


Figura 8. Análisis del sistema colector.

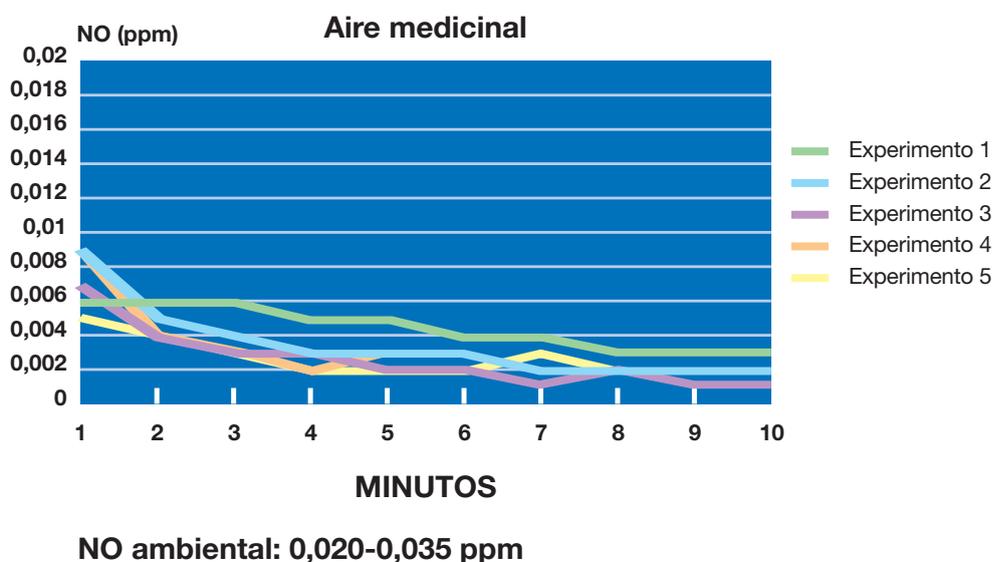


Figura 9. Ausencia de síntesis en el sistema.

Se llena la primera bolsa, la jeringa y la segunda bolsa con una dilución del ON de calibración de la quimioluminiscencia (habitualmente con una concentración cercana a 0.420 ppm) a 1 L/min durante unos 4 minutos. Al acabar, se pinza el tubo de entrada en la primera bolsa. Después, cada minuto se determina durante 30 segundos la concentración de ON a la salida de la segunda bolsa. Con el aire almacenado son posibles unas 6 determinaciones, hasta que la última da cifras bajas y cambiantes, lo cual indica que el gas en las bolsas se ha agotado.

En los cinco experimentos realizados (*FIGURA 7*), mostramos que la concentración de ON se mantiene constante a lo largo de los 6 minutos, lo cual indica que, durante este tiempo (que no superará el experimento en humanos), no hay reacción valorable del ON con las paredes del sistema ni disminución del mismo.

Una variante de esta técnica de comprobación es introducir 1-1,5L de ON a 0.033 ppm en la primera bolsa; cerrar la pinza de entrada, pasar este gas a la segunda bolsa utilizando la jeringa, con 15-30 emboladas (una cada 10 segundos, con un total de

3-4 minutos); cerrar la llave de 3 pasos correspondiente a la entrada a la segunda bolsa; abrir su salida y determinar la concentración del ON cada minuto durante 5 minutos.

La cifra a la salida de las bolsas es muy parecida al 0.033 ppm introducidas, lo que indica que el material del sistema no reacciona con el ON. *FIGURA 8 curva superior.*

Una vez lavadas las bolsas, si las volvemos a analizar con el tiempo introduciendo aire medicinal en ellas, observamos que la cifra de ON a la salida de las bolsas es prácticamente igual a la de entrada: no se genera ON. *FIGURA 8 curva inferior.*

Comprobación de que el material del sistema no genera ON:

El experimento es similar al anterior, pero llenando las bolsas con aire medicinal, que contiene alrededor de 0.002 ppm de ON *FIGURA 9.*

El material idóneo es el Teflón.

Limpieza del ON ambiental dentro del sistema de recogida, antes de su aplicación al recién nacido:

Se hizo pasar a través de todo el sistema (dos bolsas, jeringa y tubos), después de llenar las dos bolsas, 0.75 L/min de aire medicinal durante 15 minutos (Figura 4). Con ello la concentración de ON a la salida del circuito es inferior a 0.004 ppm. Se hizo antes de cada determinación.

Estabilidad de las concentraciones de ON y O₂N con el tiempo:

Fue necesario un estudio experimental para demostrar que las concentraciones del ON y del O₂N se mantienen en el gas recogido en las bolsas durante 1-1,5 h, tiempo suficiente para trasladar las bolsas rellenas desde cualquier hospital hasta el Clínico-Villarreal, donde estaba ubicado el aparato de quimioluminiscencia, que no se puede movilizar.

Se introdujo en las bolsas una mezcla de 0,5 litros de ON a 0,420 ppm y 2 litros de aire medicinal. Se determinó el ON y O₂N a la salida de las bolsas ya llenas, mientras se seguía introduciendo la mezcla original. Después se cerraba el sistema de bolsas durante 60-90 minutos. Pasado este tiempo se determinaba el ON y O₂N a la salida.

Si las bolsas no perdían ni presión ni volumen (no “se arrugaban”) en el tiempo de espera, los resultados no se alterarían. No obstante si esto sucedía (“se arrugaban”) las concentraciones de ON y O₂N ascenderían por salida del nitrógeno del aire a través de la pared de la bolsa. Por lo tanto estas bolsas deberían ser desechadas.

Los resultados experimentales mostraron que durante 1,5 horas unas bolsas no perdían ni presión ni volumen con el tiempo de espera, con lo que las concentraciones de ON y O₂N permanecían estables.

No obstante, en algunas si existió pérdida de presión/volumen (las bolsas se “arrugaban”), con lo que en el tiempo de espera, las concentraciones de ON y O₂N ascendían. *TABLA 3.*

Concentraciones de ON y O₂N en las bolsas que mantenían presión/volumen:

Tiempo	ON		O ₂ N	
	Inicio	Fin	Inicio	Fin
80 minutos	0.043	0.047	0.006	0.004
85 minutos	0.045	0.046	0.004	0.004
90 minutos	0.046	0.046	0.005	0.005
75 minutos	0.041	0.042	0.003	0.004
80 minutos	0.043	0.043	0.004	0.004
85 minutos	0.043	0.042	0.003	0.003
75 minutos	0.043	0.046	0.004	0.004
80 minutos	0.044	0.045	0.003	0.003
75 minutos	0.046	0.046	0.003	0.003
Wilcoxon	z= -1,467, p= NS		z= -0.447, p= NS	

Concentraciones de ON y O₂N en las bolsas que no mantenían presión/volumen:

Tiempo	ON		O ₂ N	
	Inicio	Fin	Inicio	Fin
75 minutos	0.046	0.052	0.004	0.008
70 minutos	0.040	0.045	0.004	0.004
70 minutos	0.045	0.054	0.004	0.003

Tabla 3. Concentraciones de ON y O₂N en las bolsas.

Reproductibilidad intrasujeto:

Se realizó un experimento clínico con 24 recién nacidos de edad gestacional entre las 31 y 41 semanas, de los cuales 14 fueron pretérminos moderados. Se estudiaron entre los días 1 y 41 de vida. En 18 casos se realizaron las determinaciones por duplicado y en 6 por triplicado. Las recogidas del ON se practicaron de forma consecutiva en cada uno de los recién nacidos, sin que existieran cambios en su situación basal.

La variabilidad intrasujeto de las determinaciones del ONe se calcularon utilizando el coeficiente de variación porcentual que equivale al cociente de la desviación estándar con la media y multiplicado por 100 (DS/media × 100)

La media de la variabilidad del ON total espirado fue del 13.9%, con una variabilidad máxima del 28.96%. *TABLA 4.*

Influencia del llanto y de la sedación del neonato en las cifras de ONe:

Con la finalidad de optimizar la recogida, el recién nacido debe de estar tranquilo en el momento de la determinación, ya que un porcentaje de llanto superior al 10% durante el proceso anula la exploración. Una de las posibilidades para tranquilizar al neonato era la administración de sedación inmediatamente antes de empezar la recogida, mediante midazolam (0,2 mg/kg) sublingual, por lo que se analizó la influencia de la misma en las cifras de ONe total.

Caso	Sexo	PN	EG	Horas	Peso	EP	N	ONe (Media)	ONe total Media ± DS	CV
1	F	3390	35	192	3180	36.1	2	0.029	10.11 ± 2.341	23.17
2	M	3570	38	96	3470	38.6	2	0.020	12.54 ± 1.973	15.73
3	F	2380	36	128	2280	36.8	3	0.025	5.27 ± 1.135	21.55
4	F	2600	36	111	2470	36.7	3	0.022	8.66 ± 1.806	20.85
5	M	3150	41	138	3090	42	3	0.015	7.02 ± 1.186	16.89
6	M	3320	40	128	3230	41.1	3	0.011	7.33 ± 0.984	13.43
7	M	3490	40	31	3370	40.2	2	0.012	3.67 ± 0.869	23.69
8	M	2390	38	58	2230	38.4	3	0.018	6.27 ± 1.213	19.34
9	F	2510	36	24	2390	36.1	2	0.012	6.30 ± 0.962	15.26
10	F	3600	40	28	3600	40.2	2	0.008	2.84 ± 0.085	2.99
11	M	1400	31	984	2190	36.9	2	0.016	8.07 ± 2.418	19.96
12	M	3760	41	81	3650	41.5	2	0.015	5.42 ± 0.212	3.90
13	M	3180	40	22	3170	40.1	2	0.008	2.54 ± 0.502	19.84
14	F	2510	36	24	2390	36.1	2	0.011	6.30 ± 0.961	15.25
15	M	2400	34	32	2340	34.2	2	0.008	3.87 ± 0.191	4.93
16	F	2790	35	39	4620	35.2	2	0.013	4.16 ± 0.481	11.56
17	M	3600	37	39	3500	37.2	2	0.009	3.33 ± 0.212	6.37
18	M	3850	37	31	3710	37.2	2	0.006	1.99 ± 0.339	17.03
19	M	2150	35	41	1980	35.2	2	0.012	5.95 ± 0.572	8.2
20	F	2032	35	71	1860	35.4	2	0.012	5.46 ± 0.707	13.0
21	M	2600	35	71	2600	35.4	3	0.011	4.97 ± 0.468	9.4
22	M	1880	35	39	1833	35.2	2	0.009	3.67 ± 0.056	1.5
23	M	3040	38	6	2950	38.0	2	0.013	5.82 ± 0.374	6.4
24	M	3200	38	67	3030	38.4	2	0.013	4.31 ± 0.509	11.8
Media: 13.9%		DS: 8.783		Máximo (media+2DS): 28.96						

SEXO: Masculino (M), Femenino (F); **PN**: peso de nacimiento (gramos), **EG**: edad gestacional (semanas); **Horas**: edad postnatal (horas). **Peso**: peso actual en el momento de determinación (gramos); **EP**: edad postconcepcional (semanas). **N**: número de determinaciones en cada caso. **ONe**: concentración de ON espirado de ON (ppm). **ONe total**: óxido nítrico total espirado (nL/min × kg); **CV**: coeficiente de variación (%).

Tabla 4. Datos de los pacientes y variabilidad de las determinaciones.

Para ello se compararon los resultados de otro experimento clínico con recién nacidos de las determinaciones de ONe en 13 casos: 7 de ellos con sedación versus 6 sin ella. Se trató de recién nacidos sanos, con edades gestacionales comprendidas entre 31 y 40 semanas, que fueron estudiados entre el 1 y 23 días de vida.

Los dos grupos de análisis fueron comparables, al no existir diferencias respecto al peso de nacimiento, edad gestacional, horas de vida, peso y ON ambiental en el momento de la recogida del gas espirado. *TABLA 5.*

Variable	Sin sedación (n=6)	Con sedación (n=7)	P U-Mann W
Peso nacimiento (g)	2391 (896)	3002 (409)	NS
Edad gestacional (sem)	35.3 (4.84)	39.3 (0.49)	NS
Horas de vida (horas)	328 (225)	125(99)	NS
Vol. Tidal /kg (mL/kg)	8.31 (2.99)	5.60 (1.65)	0.116
Porcentaje de llanto (%)	49.8 (46.99)	0.85 (2.268)	0.008
ON ambiental (ppm)	0.079 (0.077)	0.113 (0.075)	NS
ON espirado (ppm)	0.155 (0.0035)	0.016 (0.0056)	NS
ONe total (nL/min × kg)	5.61 (1.664)	4.28 (1.011)	0.116

Tabla 5. Comparación entre las recogidas de ONe total según la presencia de sedación neonatal. Media (DS).

En el grupo sin sedación no se observó correlación entre el total de ON espirado y la edad gestacional, horas de vida al efectuar la recogida u ON ambiental, mientras que sí existía una correlación significativa con el porcentaje de llanto durante la recogida ($r = 0.574$, $p = 0.04$). Por ello se optó por iniciar una sedación en los recién nacidos, que siempre fue bien tolerada. *FIGURA 10.*

Los neonatos sedados mostraron un descenso significativo del porcentaje de llanto ($p = 0.008$) y una clara tendencia a la disminución del volumen tidal/kg ($p = 0.116$) y del ONe total ($p=0.116$).

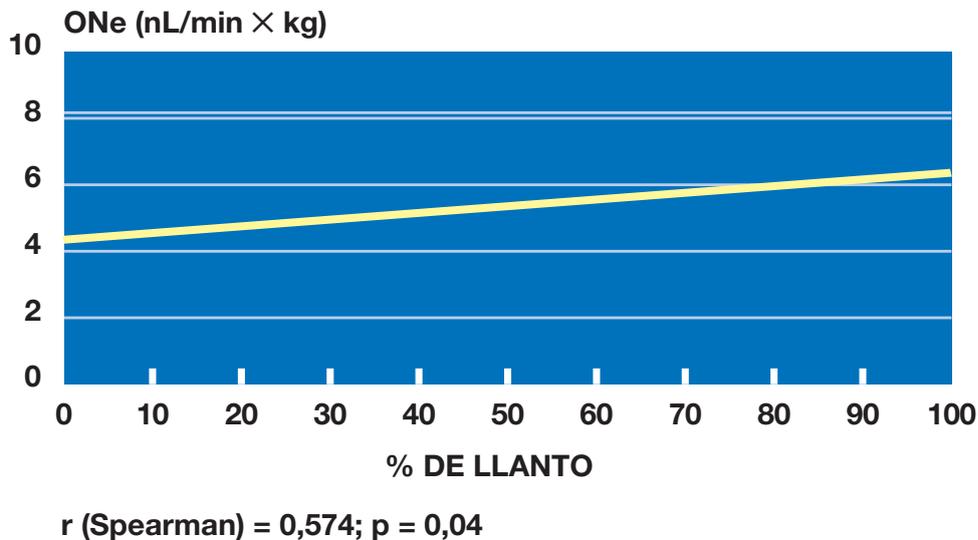


Figura 10. Correlación entre concentración de ON espirado y porcentaje de llanto.

Por tanto, el ONe total disminuye en el neonato sedado debido a la reducción del volumen minuto respiratorio. En consecuencia la sedación no debe ser usada y, además, no suele ser necesaria si la recogida se efectúa en la primera hora tras la ingesta.

Aparato de quimioluminiscencia:

Existen diferentes aparatos de quimioluminiscencia. Nosotros utilizamos el CLD 700 AL. ECHO Physiscs AG. Dürntern.

Características:

- Requiere una muestra mínima de 330 mL/min.
- El límite inferior detectable es de 0.001 ppm.
- Las escalas de ON son de 0.1 y 100 ppm.
- El tiempo de respuesta es de 7 segundos.

El aparato se calibró con una mezcla de ON de 0.420 ppm antes de iniciar las determinaciones de las concentraciones de ON de los casos de cada día.

Análisis de los nitritos y nitratos en sangre y orina:

El análisis de los nitritos y nitratos en sangre se efectuó con una modificación de la técnica fluorimétrica. Se basa en la reacción del 2,3-diaminonaftaleno con los nitritos que, en condiciones ácidas, origina el compuesto fluorescente designado como 1-H-naftotriazoleno. Se requiere una filtración como primer paso para evitar interferencias con otros componentes del suero que se realiza en la Ultrafree MC colum (UFCH LGC, Millipore Corp. Bedford Ma).

El límite de detección es de 0,01-50 micromol/mL.

Se requiere 1 mL de sangre para realizar la determinación.

En la mayoría de los casos se aprovechó el pinchazo del talón del tercer día de vida para el diagnóstico precoz, para la extracción del mililitro necesario. En otros casos se practicó coincidiendo con determinaciones analíticas por otras causas (ictericia, hemograma control por riesgo de infección o hipoglucemia).

Variables recogidas:

Las variables recogidas en la hoja de datos (*Anexo 2*) fueron las siguientes:

- Filiación.
- Antecedentes maternos: fumadora, ingesta alcohol.
- Antecedentes personales: tipo de parto, edad gestacional.
- Antecedentes patológicos: ictericia, riesgo infección, antibioticoterapia, otra patología.
- Edad cronológica en el momento de la recogida.
- Frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y tensión arterial en el momento de la determinación.

- Peso al nacimiento y peso actual en el momento de la recogida.
- Duración de la recogida.
- Porcentaje de llanto.
- Volumen espirado en ml.
- Volumen / min \times kg en mL / min \times kg
- ON y O₂N ambiental en ppm.
- ON y O₂N espirado en ppm.
- ON y O₂N espirado total en nL / min \times kg.
- Nitritos y nitratos en micromol /L.
- Valores medios de las dos o tres determinaciones realizadas en las unidades descritas:
 - ONe
 - Volumen / min \times kg
 - ONe total
 - Coeficiente de variación en porcentaje.

■ Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos tras la realización de las determinaciones descritas, así como el resto de variables mencionadas, han sido registradas en las hojas de datos correspondientes, diseñadas a tal efecto.

VARIABLES DEPENDIENTES:

La principal variable considerada dependiente ha sido el ONe total por minuto y kilogramos de peso en el momento de la determinación.

En diferentes partes del estudio, otras variables consideradas dependientes han sido los nitritos y nitratos en sangre (micromol/L) u orina (micromol/L o micromol/mol creatinina).

Variables independientes:

La principal variable de clasificación fue la presencia o no de riesgo de infección perinatal (sin riesgo en los neonatos sanos, bajo riesgo y alto riesgo).

La edad gestacional, el peso de nacimiento, las horas de vida, el tipo de parto y el ON ambiental durante la determinación han sido consideradas otras variables independientes.

Tratamiento estadístico:

Dado que en algunos subgrupos las muestras eran pequeñas, los resultados fueron dados como mediana (rango intercuartil).

El análisis estadístico se ha realizado mediante test no paramétricos: el test U de Mann-Whitney para determinar las diferencias entre los recién nacidos pretérmino y a término, y el test de Kruskal-Wallis para las diferencias en el ONe total entre los recién nacidos sanos y los recién nacidos con bajo o alto riesgo de infección.

La correlación lineal se utilizó para reconocer las dependencias entre el ONe total y otras variables cuantitativas independientes.

El análisis de la varianza fue el que permitió analizar las diferentes influencias de algunos factores y covariables con las cifras totales de ONe.

El test de Wilcoxon fue usado para analizar longitudinalmente la evolución del ONe total a lo largo de la primera semana de vida en un subgrupo de neonatos sanos y en otro subgrupo de neonatos con alto riesgo de infección perinatal.

Una p inferior a 0,05 se consideró como significativa.

RESULTADOS

Del total de los 166 recién nacidos recogidos en el estudio, 108 fueron neonatos sanos, 30 tuvieron bajo riesgo de infección y 28 tuvieron alto riesgo de infección perinatal y fueron tratados con antibióticos. De estos últimos, ninguno presentó un hemocultivo positivo y no fueron catalogados de sepsis.

■ Validación de la técnica:

Sellado del sistema de recogida:

El ONe no se correlacionó con las cifras ambientales de ON ($n = 166$, $r = 0,047$, $p = 0,052$), lo que indica que el sistema de recogida es válido en el sentido de que no se contamina por el aire ambiental.

Reproductibilidad intrasujeto:

El coeficiente de variación de cada determinación de ONe osciló entre 0 y 27,3%, con una mediana de 6,8% y un rango intercuartil entre 3,1 y 12,7%. El percentil 90 fue 17,3% y el percentil 95 alcanzó 19,6%.

■ Oxido nítrico espirado:

Recién nacidos sanos: relación ONE con tipo de parto, edad gestacional y horas de vida:

De los 108 recién nacidos sanos, 63 (58.33%) fueron a término y 45 pretérmino (41.66%). Cincuenta y tres nacieron por cesárea (49.07%). Se distribuyeron, según el parto fuera de tipo vaginal o por cesárea, de la siguiente manera. *TABLA 6:*

SANOS		Parto vaginal	Parto cesárea
A término	n = 63	n = 31	n = 32
Pretérmino	n = 45	n = 24	n = 21
Total		n = 55	n = 53

Tabla 6. Distribución de los recién nacidos sanos.

Como resultados generales, las cifras de ONE total en recién nacidos pretérmino [n = 45; 4.17 (3.74 - 4.99) nL / min × kg] y en los a término [n=63; 4.50 (3.56 - 4.99) nL / min × kg] no fueron significativamente diferentes y no hubo correlación entre el ONE total y la edad gestacional (n = 108, r = 0.020, p = 0.838).

Tampoco existió correlación entre el ONE total y el peso de nacimiento (n = 108, r = -0.095, p = 0.327).

El ONE total también fue similar en los recién nacidos de parto vaginal que en los nacidos por cesárea, [n = 55; 4.51 (3.67 - 5.16) nL / min × kg versus n= 53; 4.26 (3.64 - 4.77) nL / min × kg] respectivamente.

Es decir, los resultados globales de las concentraciones de ONE total (nL/min × kg), en los diferentes subgrupos de recién nacidos sanos no mostraron diferencias significativas respecto al hecho de ser pretérmino o a término ni tampoco respecto a la variable parto vaginal o por cesárea. *TABLAS 7 y 8.*

Sin embargo, se constató una correlación significativa entre el ONe total y las horas de vida ($n = 108$, $r = 0.309$, $p = 0.001$). Esto obligó a estratificar los grupos de estudio según las horas de vida (< 36 horas, 37-72 horas).

El ONe total en el grupo global ($n = 108$) fue de 4.37 (3.65 - 4.98) nL / min \times kg.

	n	ONe total < 72 h.	
Término	63	4.50 (3.56-4.99)	NS
Pretérmino	45	4.17 (3.74-4.99)	
Vaginal	55	4.51 (3.67-5.16)	NS
Cesárea	53	4.26 (3.64-4.77)	

Tabla 7. Resultados de las determinaciones de ONe total respecto al tipo parto y edad gestacional.

	Pretérmino (n=45)	A término (n=63)	P U Mann-Whitney
Peso nacimiento (gramos)	2435 (2180-2695)	3200 (2840-3440)	< 0.001
Edad gestacional (semanas)	36 (35-36)	39 (38-40)	< 0.001
Horas de vida (horas)	39 (22-53)	28 (19-48)	NS
Frecuencia resp. (respiraciones/min)	45 (40-57)	50 (42-58)	NS
Volumen tidal/kg (mL/kg)	11.3 (9.3-13.7)	10.0 (7.9-11.9)	0.017
Volumen minuto/kg (mL/Kg x min)	547.8 (443.4-640.1)	514.0 (443.0-560.0)	NS
ON (ppb)	8.5 (7-10)	9.0 (7.5-10)	NS
ONe total (nL/min \times kg)	4.17 (3.74-4.99)	4.50 (3.56-4.99)	NS

Tabla 8. Comparación de variables con la edad gestacional en recién nacidos sanos.

Recién nacidos con bajo o alto riesgo de infección perinatal:

Los resultados globales de las concentraciones de ONe (nL / min × kg), en los diferentes subgrupos de recién nacidos con riesgo de infección estratificado según las horas de vida fueron los descritos a continuación. *TABLA 9.*

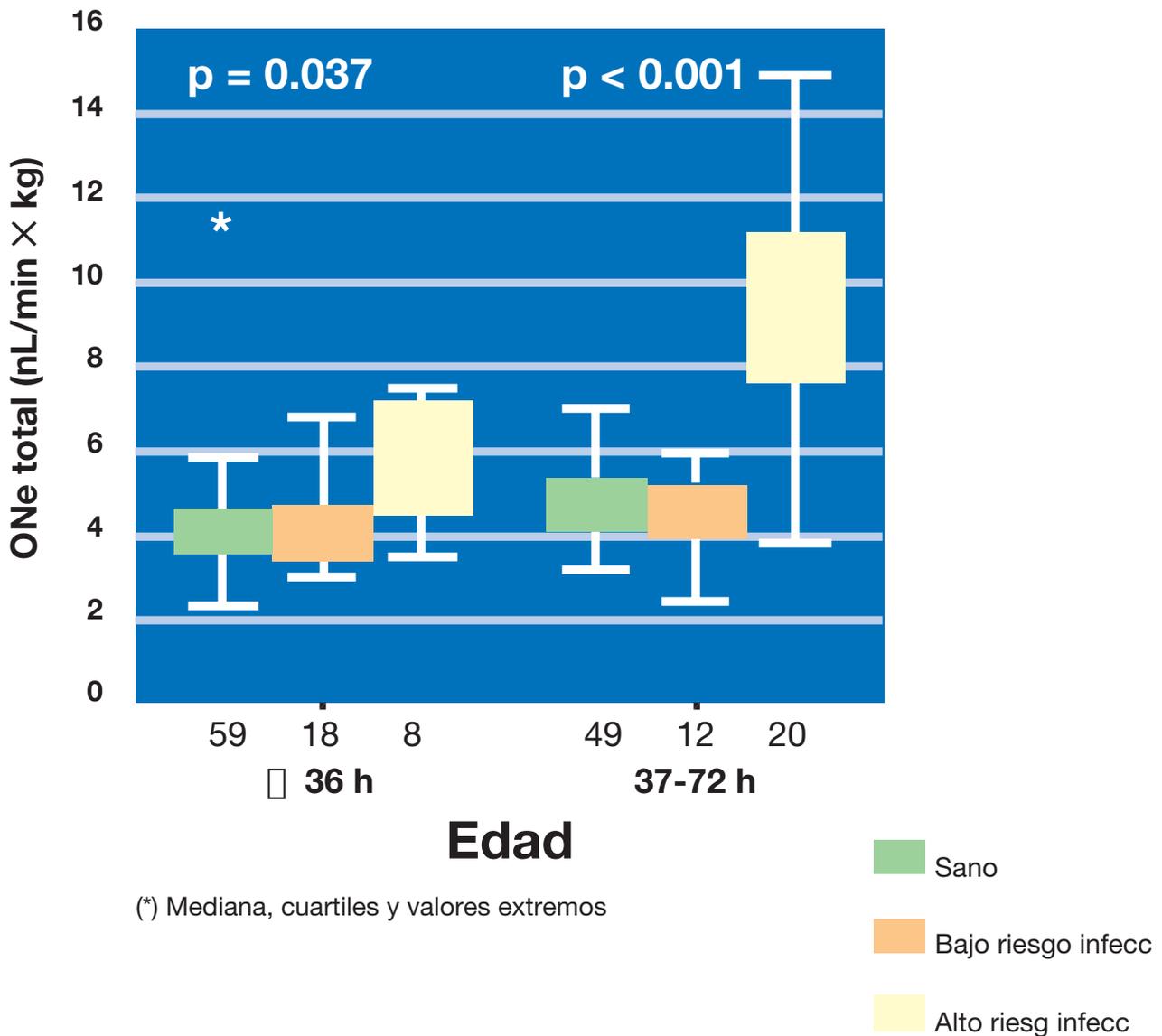
Horas de vida		Neonato sano (1)	Bajo riesgo infección (2)	Alto riesgo infección (3)	Kruskal-Wallis
< 36 horas	Casos (n)	59	18	8	
	H. vida en la determinación	20 (10-26)	18.5 (15-23)	24 (14-27.5)	NS
	ON (ppb)	8.5 (7.0-9.5)	9.7 (8.7-11.6)	10 (8.1-13.9)	0.026 1-2*
	ONe total (nL/min x Kg)	4.13 (3.5-4.7)	3.99 (3.4-4.7)	5.33 (4.5-7.2)	0.037 1-3, 2-3*
37-72 horas	Casos (n)	49	12	20	
	H. vida en la determinación	56 (42-69)	54 (43.5-67)	59 (47.5-68.5)	NS
	ON (ppb)	9.0 (7.5-10.5)	10.5 (8.1-13.1)	18.2 (14.6-20.3)	< 0.001 1-3, 2-3*
	ONe total (nL/min x Kg)	4.68 (4.1-5.3)	4.55 (3.9-5.2)	9.69 (7.6-11.1)	< 0.001 1-3, 2-3*

Mediana (rango intercuartil)

(*) Post-hoc: U Mann-Whitney

Tabla 9. Diferencias en los valores de ONe total en neonatos sanos, con bajo riesgo de infección y con alto riesgo de infección, según horas de vida.

Los resultados obtenidos en comparación con los recién nacidos sanos, después de estratificar todos los grupos en función de las horas de vida y mediante el test de Kruskal-Wallis, muestran que los recién nacidos sanos, los de bajo riesgo de infección perinatal y los de alto riesgo, presentan diferencias significativas, tanto si se examinan antes de las 36 horas de vida como después, y tanto en las cifras de ONe en ppb ($p = 0.026$) como respecto a las cifras de ONe total ($p = 0.037$). Las diferencias son especialmente significativas entre los recién nacidos sanos o con bajo riesgo de infección frente a los neonatos con alto riesgo de infección (*Figura 11*).



(*) Mediana, cuartiles y valores extremos

Figura 11. ONE total en recién nacidos sanos y con bajo o alto riesgo de infección perinatal, según las horas de vida.

El análisis univariado de la varianza de las cifras de ONE total en relación a dos factores (nivel de riesgo de infección y horas de vida) y tres covariables (peso al nacimiento, edad gestacional y ON ambiental) mostró que el modelo era adecuado (R^2 corregida = 0.530, $p < 0.001$) y que el único factor con significación fue el nivel de riesgo de infección (sano, bajo riesgo, alto riesgo; $p < 0.001$).

Influencia de las horas de vida en el ONe total:

Al llevar a cabo un estudio longitudinal en 29 neonatos sanos nacidos por cesárea, se observó un aumento significativo del ONe total en la segunda determinación después de las 72 horas de vida (6.18 (5.11-7.67) nL / min × kg) versus 5.52 (3.69-5.03) nL / min × kg; $p < 0.001$ mediante el test de Wilcoxon). (Tabla 10).

	n	ONe total	n	ONe total	Test Wilcoxon
		<72 h.		72-168 h.	
Recién nacidos sanos	29	5.52 (3.69-5.03)	29	6.18 (5.11-7.67)	$p < 0.001$

Tabla 10. Aumento de las cifras de ONe total en la segunda determinación en el estudio longitudinal de recién nacidos sanos.

Otro estudio longitudinal en neonatos con alto riesgo de infección perinatal mostró también un aumento en las cifras de ONe total con las horas de vida, que no llegó a ser significativo (Tabla 11).

	n	ONe total	n	ONe	Test Wilcoxon
		< 72 h.		72-168 h.	
Alto riesgo de infección	28	7.95 (6.18-10.82)	28	10.2 (6.49-12.33)	NS

Tabla 11. Resultados de las determinaciones evolutivas del ONe total según horas de vida en el alto riesgo de infección.

■ Nitritos y nitratos en sangre:

Recién nacidos sanos:

No existieron diferencias significativas en las cifras de nitritos y nitratos en sangre en cuanto a la edad gestacional entre los a término (n= 56; 34 (22.3 – 50.0) micromol / mL) versus los pretérmino (n= 33; 34 (24.3 - 43.5) micromol / mL) respectivamente.

Tampoco existieron diferencias en cuanto al tipo de parto vaginal (n=46; 34.5 (22.9-43.25) micromol/mL) o por cesárea (n=43; 29 (24.1 – 53.0) micromol/mL).

TABLA 12.

	n	Nitritos sangre (micromol/L)	P
Término	56	34 (22.3-50.0)	
Pretérmino	33	34 (24.3-43.25)	NS
Vaginal	46	34.5 22.9-43.25	
Cesárea	43	29 24.1 – 53.0	NS

Tabla 12. Nitritos y nitratos en sangre (micromol/L) en los recién nacidos sanos.

No existió correlación entre los nitritos en sangre y las horas de vida del recién nacido sano (n = 89, r = 0.045, p = 0.673).

Recién nacidos con bajo o alto riesgo de infección perinatal:

Los valores de nitritos y nitratos en sangre mostraron diferencias significativas entre el global de los grupos (sano, bajo riesgo de infección y alto riesgo), con $p = 0.043$, a expensas de diferencias entre el grupo de alto riesgo y los otros dos ($p = 0.038$ entre sano y alto riesgo de infección y $p = 0.016$ entre bajo y alto riesgo de infección).

TABLA 13.

	n	Nitritos sangre	P
Sano	89	34.0 (24.1-48.0)	NS
Bajo Riesgo infección	28	29.5 (21.1-42.5)	
Alto riesgo infección	22	45.5 (31.7-68.0)	0.016
Kruskal-Wallis		P= 0.043	0.038

Tabla 13. Nitritos y nitratos en sangre (micromol/L) en los recién nacidos sanos y con bajo o alto riesgo de infección.

Relación nitritos y nitratos en sangre y ONe total:

El ONe total tampoco correlacionó con los niveles de nitritos y nitratos en sangre ($n = 89$, $r = -0.114$, $p = 0.285$).

■ Nitritos y nitratos en orina:

El estudio de los nitritos y nitratos en orina de los recién nacidos sanos, así como los nitritos y nitratos en orina corregidos por la creatinina (nitritos y nitratos/creatinina orina) dieron los siguientes resultados. TABLA 14.

	n	Mediana	Intervalo intercuartil
Nitritos y nitratos orina	21	226.0	134.4-279.6
Nitritos/creatinina orina	21	0.592	0.242-0.860

Tabla 14.- Resultados nitritos y nitratos en orina y nitritos y nitratos/creatinina en orina.

No existió diferencia significativa respecto a los nitritos y nitratos en orina entre los recién nacido a término [n = 14; 253.5 (150.75-302.6)] y los pretérmino [n = 7; 161.0 (91-230)] con una p= 0.067, ni tampoco respecto a los nitritos y nitratos/creatinina en orina en los a término [n= 14; 0.561 (0.193-1.012)] versus [n= 7; 0.70 (0.28-0.72)] en los pretérmino.

Existió una muy escasa correlación entre los nitritos y nitratos/creatinina en orina y las horas de vida (n= 21; r= 0.489; p= 0.024).

No existió correlación entre los nitritos y nitratos en sangre y los nitritos y nitratos/creatinina en orina (n = 21, r = 0.092, p = 0.690), ni entre nitritos y nitratos en sangre y nitritos y nitratos en orina (n = 21, r = 0.120, p = 0.604).

DISCUSIÓN

■ Pacientes:

Uno de los primeros criterios de selección de pacientes fue las horas de vida en que se debía realizar la determinación. Inicialmente se estableció en tres días, dado que es el tiempo universalmente aceptado para diagnosticar la sepsis neonatal precoz.

Dado que se observaron diferencias en las determinaciones de ONe total en función de las horas de vida, tuvieron que estratificarse los grupos de estudio en < 36 horas y 37-72 horas. Existió sin embargo un subgrupo de neonatos sanos y otro con alto riesgo de infección en los que se realizó una segunda determinación entre los 5 y 7 días de vida. Para estos casos se escogieron recién nacidos por cesárea, ya que su estancia hospitalaria por causa materna se sitúa en este rango de tiempo, o recién nacidos por parto vaginal en que se demoró el alta por motivos menores (pérdida de peso, dificultades en la alimentación...) o por causa materna.

Para determinar los valores de normalidad del ONe total, hubo que diferenciar entre los pretérmino y los a término. El hecho de establecer el nivel de corte de la prematuridad en las 34 semanas de edad gestacional fue debido a varios motivos. En primer lugar, la patología asociada a edades gestacionales menores se incrementa significativamente, siendo éste uno de los factores de exclusión de nuestro estudio. Por otra parte, la mascarilla utilizada para nuestras determinaciones no hubiera sido la apropiada para una edad gestacional menor. Además, el menor peso asociado a la prematuridad hubiera condicionado un tiempo de recogida mucho mayor para conseguir el volumen de gas espirado suficiente para realizar las determinaciones, con el consiguiente aumento de la dificultad para la recogida.

Se decidió distinguir entre los recién nacidos por parto vaginal y los por cesárea, dada la hipótesis de que la colonización en las fosas nasales sería mayor en los primeros, por los datos que existían de la bibliografía previa^{4,6}.

Inicialmente, se consideró como muestra estadísticamente suficiente un número de casos de unos 30 para cada grupo de recién nacidos sanos ($n = 120$ ya que se estratificaron en 4 grupos). Sin embargo, el hecho de hallar diferencias significativas respecto a la variable horas de vida, obligó a realizar un subestudio longitudinal en 29 recién nacidos, a fin de observar como variaban los niveles de ONe total en función de las horas de vida en el momento de la recogida.

Por lo que respecta al grupo de recién nacidos con riesgo de infección, la clasificación inicial tampoco se mostró útil. Se diferenciaba entre los que tenían el antecedente de bajo o alto riesgo de infección y en función de ello se consideraba si recibían tratamiento antibiótico o no. Sin embargo, esto implicaba la existencia de subgrupos en los que pese al alto riesgo de infección o corioamnionitis no debían llevar antibioticoterapia, lo cual hubiera sido éticamente inaceptable.

El hecho de no aceptar la existencia de otras patologías que no fueran las relacionadas con la infección, fue debido a que el ON está implicado en un sinnúmero de procesos fisiopatológicos por lo que debía evitarse dicho sesgo.

Tampoco se aceptaron los recién nacidos sometidos a ventiloterapia por el tipo de metodología que utilizamos en la recogida de la muestra, así como por implicar otros estados de enfermedad.

Los neonatos que recibieron oxigenoterapia ambiental también se excluyeron ya que el oxígeno tiene la capacidad de realizar fenómenos de oxidación a nivel pulmonar que pueden inducir la actividad de la ON sintasa. En el estudio de Arkovitz⁶⁷ se demostró que la hiperoxia aumentaba los nitritos y nitratos en el lavado broncoalveolar, representando la producción de ON a este nivel. En sentido contrario, la hipoxia disminuye la producción de ONe⁶⁸.

■ Material y metodología:

En el momento de la determinación del ONe total nuestra metodología permite conocer el tiempo de recogida y el volumen total espirado, por lo tanto ni el espacio muerto del sistema de recogida, ni los pequeños cambios en el flujo espiratorio son importantes, dado que la baja concentración de ONe debida a la dilución es contrarrestada por el alto volumen total recolectado.

En el trabajo de Schedin y col^{43, 44} el sistema de recogida del ONe se basa en un tubo con pequeños orificios y una llave de tres pasos que permite una aspiración continua o interrumpida del gas de una de las fosas nasales (mientras el recién nacido respira a través de la otra). Los autores miden los picos de ON después de diferentes tiempos de oclusión y de distintas concentraciones basales de ON y para ello utilizan un sistema de corto tiempo de respuesta. A partir de las concentraciones basales de ON y de la determinación del flujo en una fosa nasal, ellos estiman la tasa nasal de excreción de ON. Sin embargo nuestra metodología trata de determinar con mayor exactitud la producción total de ON, eliminando la contaminación del ON ambiental (superior a 0.013 ppm en nuestra maternidad).

Recientemente, Artlich et al^{46, 58} han descrito una nueva tecnología en recién nacidos que permite separar el ON procedente de la vía aérea superior del de la inferior, tanto en neonatos a término como en pretérmino. Sin embargo, la producción de ON en la vía inferior puede estar alterada por la inhalación previa de altas cifras de ON autoinhalado, al producirse picos de dicho ON. Por lo tanto, la determinación exclusiva mediante dicha tecnología del ON de producción en la vía aérea inferior sólo puede ser aceptada en casos de respiración regular, sin picos previos de ON y con determinaciones normales del ON autoinhalado. Aún teniendo en cuenta estas premisas, la mejor forma de calcular el ON espirado total broncoalveolar sería conocer la concentración

de ON de la vía aérea inferior pero también considerando el volumen de gas espirado por minuto.

En el caso de la producción de ON en la vía aérea superior sería incorrecto despreciar los picos de ON autoinhalado, a no ser de estar seguro de un posible origen gástrico. Dichos picos de ON son debidos, probablemente, ó a una respiración bradipnéica o superficial (originaría una acumulación del ON producido en la vía aérea superior que podría ser autoinhalado con la siguiente respiración) o a una acumulación nasal por una oclusión nasal transitoria o por obstrucción de los orificios del catéter del sistema de recogida. Por lo tanto se deben recoger las determinaciones de todo el ON autoinhalado, integrarlas, y a partir de aquí calcular el “ON total autoinhalado”.

Estamos de acuerdo con Schedin et al⁴⁴ en que el ON espirado total expresado en $nL / \text{min} \times \text{kg}$ parece más adecuado que dar las determinaciones de ON como concentraciones en ppm o ppb⁶⁹⁻⁷¹.

Existen otros estudios en niños en los que se utiliza una técnica similar a la nuestra. Visser⁷² analizó en niños con edades entre los 4 y los 14 años el ONe en la mezcla de gas espirado durante 5 minutos de respiración normal. Sus resultados en controles sanos son de 7 ppm de media con un rango entre 2 y 10 ppm y estos valores aumentan de forma significativa en el caso de los niños asmáticos. Sus resultados fueron superiores a los nuestros pero concordantes con el hecho de que las cifras de ONe aumentan progresivamente con la edad⁷³⁻⁷⁴. Hadjikoumi, sin embargo, que utilizó una técnica similar y la comparó con la técnica de exhalación contra resistencia, no obtuvo valores discriminativos entre los controles y los asmáticos con la técnica de análisis de la mezcla de aire⁷⁵.

En el cálculo de las mediciones de ONe influye el volumen minuto del paciente por lo que a mayor peso del recién nacido las cifras finales de ONe podrían verse falsamente incrementadas. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los pretérmino y los a término, pese a ser estadísticamente significativa la diferencia de peso entre uno y otro. Esto es debido a que hemos analizado el ONe total, que incluye en la determinación la variable peso, con lo que evita ese sesgo.

Para conseguir que el aire inspirado no contenga óxido nítrico de la contaminación ambiental, de las dos modalidades mencionadas se escogió la de introducir aire medicinal a través del tubo inspiratorio de una mascarilla facial, dado que era una metodología bien tolerada por el paciente y que permitía mantener la temperatura correcta en el interior de la incubadora, sin riesgos de contaminación externa.

En la metodología de exhalación contra resistencia, utilizada en niños, también se han hecho estudios al respecto. El respirar un aire libre de ON a través de un circuito cerrado disminuía las cifras de ONe en niños asmáticos en comparación con si respiraban aire ambiental⁷⁶. En trabajos epidemiológicos sobre el ONe se recomienda la utilización de bolsas de aire libre de ON, de entre 1.000-2.000 ml según la edad, para respirar en ellas previa a la determinación de ONe y evitar el sesgo de la contaminación por ON ambiental⁷⁷.

La estanqueidad del sistema de recogida se comprobó mediante la oclusión del sistema con pinza y posterior aspiración, metodología sencilla y segura si se verifica siempre previamente a la determinación, como nosotros hicimos.

Las concentraciones de ON utilizadas para determinar si existía interacción del óxido nítrico con el material fueron las más frecuentemente comercializadas, como las de 420 ppm y 800 ppm, aunque a cualquier otra concentración la metodología sería válida. En cuanto al tiempo de llenado de las bolsas, se estableció inicialmente de forma arbitraria hasta constatarse empíricamente que con 3-4 minutos era suficiente. En el caso de utilizar la variante de administrar 0.033 ppm la muestra se consiguió diluyendo el ON de la botella original con aire medicinal.

Se ha evidenciado que el material utilizado no interacciona con el óxido nítrico: no se degrada ni se genera ON en el circuito.

La limpieza del óxido nítrico ambiental de dentro del sistema de recogida antes de su aplicación al recién nacido se realizó con aire medicinal. El flujo de aire medicinal utilizado era lo suficientemente alto para un llenado rápido de las bolsas y a la vez adecuado, para que la presión de llenado no fuera excesiva y lesionara a las mismas

produciendo escapes o contaminaciones. Se consideró que las cifras de ON de 0.002-0.004 ppm, a la salida del circuito, eran despreciables y que no alterarían los resultados de las determinaciones de ONe.

Para permitir el transporte interhospitalario de las bolsas de recogida, era importante demostrar la estabilidad de las concentraciones de ON y O₂N con el tiempo la mezcla introducida en las bolsas pretendía reproducir lo que sucede en el momento de la determinación en el recién nacido: por una parte se introduce ON (el que generaría el individuo pero a concentración mayor) y por la otra el flujo de aire medicinal que recibe de forma continua el neonato. Los resultados mostraron que las concentraciones permanecían estables dentro del tiempo indicado. A partir de los 90 minutos las bolsas se “arrugaban” al perder presión y volumen y las determinaciones se invalidan.

La estabilidad de las concentraciones permitió la recogida de casos fuera del recinto dónde teníamos ubicado el aparato de quimioluminiscencia. El hecho de que algunas bolsas se “arrugaran” con el tiempo y, por tanto, dejaran de ser válidas, se debió probablemente a algún defecto del material del sistema utilizado: poros en la pared de las bolsas o deterioro de las mismas, o fugas no visibles en algún tubo del circuito.

Los sistemas de recogida del aire espirado, mediante un sistema de tubuladuras con válvulas unidireccionales que conducen a un reservorio para ser transportado, también se ha realizado en muestras de ONe de adultos⁷⁸.

La reproductibilidad intrasujeto de la nueva metodología ya se había demostrado en un estudio experimental de tipo clínico con 24 pacientes. La estimación de los resultados en diferentes días de vida obedeció simplemente al hecho de que el recién nacido estuviera en situación basal. Se realizaron dos determinaciones o tres consecutivas a fin de constatar si se mejoraba la reproductibilidad intrasujeto. En el estudio experimental la variabilidad fue de 13.9% con una desviación estándar de 7.53%.

A fin de analizar la influencia del llanto y de la sedación del neonato en las cifras del óxido nítrico espirado se escogió el midazolam como sedante dado que es un fármaco con eficacia y seguridad demostradas en neonatología. La vía sublingual se

eligió dado que al tratarse de recién nacidos en situación basal no se disponía de ninguna vía IV. La vía intranasal es más molesta y además su administración coincide con la vía de recorrido y producción del ONe por lo que se desestimó. Con la sedación disminuyó el llanto pero también el volumen minuto y con ello el ONe total, falseando los resultados. Además, la sedación no es necesaria si la determinación se realiza una hora después de la ingesta en que el neonato está más relajado. Por todo ello se deben rechazar todas las recogidas con un tiempo de llanto superior al 20% así como aquellas recogidas de aire espirado realizadas con sedación.

El aparato de quimioluminiscencia utilizado se trata de un aparataje de fácil manejo y aprendizaje aunque con algunos inconvenientes. Por su tamaño no es fácilmente transportable, por lo que se investigó sobre el transporte de las bolsas de recogida como se ha comentado. Requiere una calibración continua, que en nuestro trabajo fue siempre previa a las determinaciones para eliminar cualquier interferencia en los resultados. El sistema utilizado CLD 700 AL. ECHO Physics AG - Postfach. CH - 8635. DÜRTEN) es lento pero es muy sensible y con un límite de detección (0.001 ppm) apto para las cantidades de ONe que esperábamos encontrar pese a que se necesitaría mayor resolución para la determinación de otros tipos de ON como el de producción alveolar.

Existen otros aparatos de quimioluminiscencia todavía más sensibles y rápidos como el LR-200. Logan Research Ltd. Rochester UK con un límite inferior detectable también de 0.001 ppm pero tan sólo necesitan una muestra mínima de 50 mL/min con unas escalas de detección de ON de 0.05, 0.5 y 5 ppm con un tiempo de respuesta inferior a 0.5 segundos.

El detector Luminol/H₂O₂ por quimioluminiscencia⁷⁹ es una nueva técnica para la detección del ONe. Se basa en la oxidación del ON a O₂N utilizando el trióxido de cromo y la posterior reacción de éste O₂N con una solución alcalina de luminol/H₂O₂ capaz de ser detectada por quimioluminiscencia. La presencia de H₂O₂ aumenta la sensibilidad de la detección de ON en unas 20 veces. El límite de detección es de 0.3 ppb con un tiempo de respuesta de 2 segundos y tiene un menor tamaño.

Se han descrito otro tipo de metodologías para el análisis del ONe distintas de la quimioluminiscencia como la espectroscopia por resonancia magnética laser. Esta técnica se basa en la determinación del ON mediante isótopos selectivos y es capaz de determinar concentraciones mínimas de gas en breves períodos de tiempo. No tiene aplicación clínica por el momento⁸⁰.

El análisis de los nitritos y nitratos en sangre y orina se efectuó con la técnica disponible en nuestro centro de análisis (laboratorio de análisis hormonales del Hospital Clínico) que además resulta ser la de mejor sensibilidad y relación coste-beneficio. El hecho de precisar solamente de 1 ml de sangre para la determinación supuso que se pudieran aprovechar las muestras de sangre practicadas con otras finalidades. Con esto se evitó pinchar expresamente al recién nacido sólo para realizar la medición de los nitritos y nitratos.

En el caso de las muestras de orina se tuvo en cuenta la corrección de los resultados con el cociente de creatinina a fin de afinar al máximo las mediciones.

■ RESULTADOS

Se ha demostrado que el resultado del sistema de recogida es validable ya que no se contamina por el aire ambiental, al no existir correlación entre las concentraciones de ON de ambos. Si existiera contaminación, especialmente en lugares con cifras ambientales tan elevadas como donde se realizó el estudio, invalidaría de entrada el sistema.

La metodología utilizada³⁵ muestra una variabilidad intrasujeto en las cifras de ONe total inferior a los de los experimentos previos. En el presente estudio la media fue sólo de 6.8% (IQR: 3.1%-12.7%) y una máxima de 28.96%⁶⁷. Nuestra variabilidad es similar a la recogida en otras mediciones de mecánica pulmonar en recién nacidos sanos, mediante sistemas computerizados⁸¹. Dichas variaciones pueden ser, como ya hemos mencionado, por el procedimiento, o por los cambios fisiopatológicos del recién nacido. Por esta razón es conveniente repetir la determinación si el coeficiente de variación es superior al 29%⁶⁶, siendo obligada la práctica de una doble o triple recogida. Como cifra válida de ONe se aceptará la media de las mediciones practicadas. Sin embargo, el entrenamiento facilita la realización de dichas determinaciones.

Nuestro estudio mide el ON total eliminado por el recién nacido a través de la boca y de la nariz, por lo que representa principalmente el sintetizado por la nasofaringe y, en menor proporción, el del tracto respiratorio inferior, dado que la producción bucal es escasa²⁴. En los recién nacidos, ya ha sido previamente mencionado que el llanto incrementa el ONe total⁶⁵. El paso de ON de la cavidad gástrica podría también incrementar las determinaciones cuando se produce en grandes cantidades (0.8-6 ppm) en medio ácido²⁹. Quizás este fenómeno pudiera explicar los picos de ON cuando el recién nacido llora o deglute⁴⁵. Sin embargo, como ya hemos comentado, la sedación del recién nacido reduce las cifras de ONe total⁶⁶ falseando los resultados.

Es conocido⁸²⁻⁸⁵ que los recién nacidos pretérmino tienen el mismo volumen tidal por kilogramo que los recién nacidos a término. En nuestro estudio, el volumen tidal (volumen minuto dividido por la frecuencia respiratoria) por kilogramo resultó estar en el límite alto de la normalidad en ambos grupos (11.8 mL/kg en los recién nacido pretérmino y 10.2 mL/kg en los a término) y esto en los dos grupos diferenciados por el tiempo en que se recogió la muestra (menos y más de 36 horas de vida). Estas cifras elevadas podrían corresponderse a la estimulación de quimiorreceptores por parte del CO₂ retenido en el espacio muerto de la máscara que se va reinhalando.

Los valores de ONe, –como ya señaló Schedin–²⁷ son sin embargo mayores que los descritos en adultos (69 ± 14 nL/min¹⁷).

Esto explicaría el aumento significativo del ONe total comparando entre el grupo de recién nacidos de menos de 36 horas de vida y el de más de 36 horas de vida. Estos hallazgos obligaron a estratificar el estudio de acuerdo con las horas de vida para descartar que la causa no fuera que la mayoría de las determinaciones practicadas después de las 36 h de vida se realizaban en neonatos con alto riesgo de infección sometidos a antibioterapia. Schedin y col describieron con anterioridad un aumento del 30% de las cifras de ONe en el primer día de vida⁴³ y posteriormente a los 4-7 días de vida⁴⁴.

En nuestro estudio, el ONe fue similar en recién nacidos pretérmino (8.5 ppm; IQR: 7-10) y a término (9.0 ppm; IQR: 7.5-10), tal y como había descrito Schedin con anterioridad y con cifras prácticamente idénticas a las descritas por Biban et al⁸⁴ durante las primeras 48 horas de vida. Su estimación de la tasa de excreción de ON nasal en recién nacidos a término a los 4-7 días de vida en 23 recién nacidos (6 a término y 17 pretérmino) fue de 0.11 nmol/min × kg, que equivaldría a 2.64 nL / min × kg. Se ha de considerar que esta determinación de ON se obtiene solamente del análisis de una fosa nasal. Para calcular el ONe total esta cifra debería, como mínimo, ser doblada, suponiendo que la producción de ON es similar en ambas fosas nasales. El resultado que se obtendría de dicha suma sería de 5.28 nL / min × kg, cifra ligeramente inferior a nuestros resultados en el grupo de más de 36 horas de vida (media de 6.3 nL / min × kg). Sin embargo, hemos de tener en cuenta que en nuestras determinaciones existe una parte de ON que procede de la producción bucal (aunque sea mínima, existe) y otra de la vía respiratoria baja, proporciones que incrementarían ligeramente las cifras de ONe en nuestro caso.

Existe un estudio muy reciente de Aikio⁸⁵ en que se realizó la recogida de ON en recién nacidos con patología respiratoria (distrés respiratorio y enfermedad pulmonar crónica). La importancia del trabajo reside en que se analizó el ON exhalado (determinación de las cifras de ON prodecentes de las vías respiratorias inferiores, a través de un tubo de intubación situado a nivel orotraqueal) además de las cifras del ON espirado (mediante la recogida de ON a través de la fosa nasal que quedaba libre). Comprobó que el ON nasal era significativamente superior al ON procedente de las vías respiratorias altas como era de esperar. También evidenció que en el

grupo de análisis del ON exhalado las cifras dependen del flujo espiratorio: en las respiraciones que eran asistidas, y por tanto producían volúmenes tidales mayores, las determinaciones de ON eran superiores, dato a considerar en posteriores análisis mediante este sistema de recogida. Analizando las cifras de ON con respecto a las horas de vida resultó que aquéllas aumentaban durante la primera semana de vida, en el grupo de recién nacidos a término, y durante las 24-48 horas de vida en los neonatos pretérmino, coincidiendo con los estudios de otros autores comentados anteriormente y con los nuestros. Otro dato importante fue que las cifras de ON correlacionaban positivamente con la gravedad de la enfermedad pulmonar crónica, confirmando una vez más la utilidad de la determinación del ON en los procesos inflamatorios.

Nuestro estudio mostró que en las situaciones de riesgo de infección perinatal y en los tres primeros días de vida, las cifras de ONe total se incrementaban, con una tendencia a ser aún mayores en el caso de existir un antecedente de alto riesgo de infección. Probablemente esto sea debido a una mayor contaminación de las vías respiratorias superiores, especialmente de las fosas nasales y senos paranasales, causada por una contaminación o infección del líquido amniótico, del canal del parto o de la zona perineal materna. Actualmente no es posible cuantificar la colonización bacteriana de acuerdo con las diferentes partes de las fosas nasales y de la vía respiratoria inferior, y aún menos de los senos paranasales donde se produce el ON²⁴⁻²⁶.

El estudio longitudinal, en los recién nacidos con alto riesgo de infección perinatal, mostró que las cifras de ONe total tendían a aumentar pese al tratamiento antibiótico. Lundbeg²⁵ y col tampoco encontraron cambios en las cifras de ONe después de una semana de antibioticoterapia en adultos.

No se han demostrado diferencias entre los niveles de nitritos y nitratos entre los pretérmino y a término en recién nacidos sanos ni tampoco en función del tipo de parto. Endo⁸⁶ observó, en un grupo de recién nacidos sanos, que no existían diferencias en las cifras de nitritos y nitratos respecto el tipo de parto (vaginal o cesárea) en el momento del nacimiento. Sin embargo, a los 5 días el aumento en los niveles de nitritos y nitratos era significativamente superior en los recién nacidos por parto espontáneo que en los procedentes de una cesárea.

Estos datos podrían obedecer a que el factor aparentemente determinante para la elevación de los nitritos y nitratos es la vasodilatación⁸⁷, que conlleva una estimulación de la ONs, y por tanto de sus productos de degradación. Quizás en los neonatos nacidos por parto espontáneo los fenómenos de vasodilatación sean superiores, pero éste fenómeno tardaría un tiempo en mostrarse y nosotros no lo hemos podido constatar al realizar la determinación de los nitritos y nitratos antes de las 72 horas de vida.

Inversamente a lo encontrado por nosotros, Endo y col⁹⁵ describieron un aumento de la síntesis endógena de ON (nitritos y nitratos en suero) desde el nacimiento hasta los cinco días de vida.

Tampoco se ha demostrado relación entre las cifras de ONe total y las de nitritos y nitratos en sangre de recién nacidos con riesgo de infección como se ha podido constatar en el estudio de Biban⁸⁴. Sin embargo, ninguno de nuestros recién nacidos se catalogó de sepsis, la cual podría incrementar el ON endógeno, expresado por un aumento de las cifras en sangre de nitritos y nitratos⁸⁸. En el estudio de Biban⁸⁴, con resultados parecidos a los nuestros, los pacientes también eran recién nacidos sanos y por tanto, no sépticos.

Neilly⁸⁹, Wong⁹⁰ y Carcillo⁹¹ sin embargo, demostraron que las cifras de nitritos y nitratos en los pacientes con septicemia eran significativamente superiores a las de los controles sanos, especialmente en los que presentaban hipotensión. Doughty⁹² también observó un aumento en los niveles de nitritos y nitratos en sangre en relación con los procesos sépticos que se acompañan de fallo multiorgánico y Baines¹⁷ comprobó un aumento de los nitritos y nitratos en pacientes con sepsis meningocócica, y de forma significativamente superior cuanto más grave era el proceso infeccioso y mayor repercusión hemodinámica tenía.

La ausencia de correlación en nuestro estudio entre las cifras totales de ONe y los nitritos y nitratos en sangre podrían sugerir, en primera instancia, que la síntesis de ONe no está relacionada con la producción endógena de ON, probablemente por ser debido a una producción independiente, secundaria a una colonización progresiva de la vía aérea respiratoria superior con el tiempo, tal y como postulaba Biban. Sin embargo

ya se ha comentado como podrían actuar los fenómenos de vasodilatación en el apartado anterior.

También podría ser debido a la falta de casos de sepsis neonatal en nuestra serie: de la misma manera que hemos comentado para la falta de correlación entre los nitritos y nitratos en sangre y el riesgo de infección, podría ocurrir que sólo en los casos de sepsis como tal existiera un aumento importante del ON endógeno y de sus productos de degradación (nitritos y nitratos) y quizás también del ONe total.

Las cifras determinadas de nitritos y nitratos en orina coinciden con las publicadas en la literatura pese a la dispersión de los valores⁹⁴⁻⁹⁶. La causa de la dispersión de valores fue probablemente secundaria a que la orina de los recién nacidos se recogió mediante bolsa urinaria. Esta metodología es poco fiable debido a las pérdidas urinarias que pueden ocurrir por fuga del sistema recolector, especialmente en neonatos de sexo femenino por su anatomía uretral.

No encontramos diferencias significativas entre los pretérmino y los a término, si bien existió una tendencia ($p = 0.067$) a un mayor nivel en los a término. Tsukahara⁹⁴ halló diferencias significativas en las cifras de nitritos y nitratos en orina con respecto a la edad gestacional, pero con resultados mayores en los pretérmino. El mismo autor detectó que a medida que aumentaba la edad (población entre 1 y 17 años) disminuían las cifras de nitritos y nitratos en orina⁹⁵. Del mismo modo Dzik⁹⁶ encontró cifras en orina significativamente mayores en los pretérmino que en los a término. Estos datos podrían sugerir una activación del circuito del ON en los neonatos prematuros.

Honold⁹⁷ atribuyó sus resultados (equiparables a los ya mencionados) a la mayor metabolización del ON en los eritrocitos del neonato que en el adulto.

En la misma línea Tsukara^{98,99} determinó las cifras de nitritos y nitratos en orina durante los primeros 4 días de vida en pretérminos y a término y encontró que la excreción estaba significativamente aumentada en los pretérmino, atribuible al papel que jugaría el óxido nítrico en la adaptación de la circulación en la vida extrauterina. En

nuestro estudio no recogimos la variable horas de vida en el momento de la determinación de los nitritos y nitratos en orina por lo que no podemos ofrecer datos sobre la evolución de los nitritos y nitratos en orina con el tiempo.

Debido a la dispersión de los valores de nitritos y nitratos en orina, se suspendió la recogida de más casos dada la poca fiabilidad de la recogida por bolsa como ya se ha comentado. No se pudo establecer, por tanto, relación entre las cifras de nitritos y nitratos en orina y riesgo de infección. Sin embargo, Ergenekon²⁰, en un estudio realizado con recién nacidos sanos y otros con alto riesgo y diagnóstico de infección, concluyó que los nitritos y nitratos en orina eran un marcador muy específico de infección, aunque poco sensible. Uzuner¹⁹ también describió, en recién nacidos de bajo peso, un aumento de las cifras de nitritos y nitratos en orina en el grupo de neonatos sépticos (18.35 ± 11.16 micromol/mmol creatinina) vs el grupo control (4.01 ± 1.12 micromol/mmol creatinina).

La dispersión de los valores, pese a estar corregidos mediante el cociente nitritos y nitratos/creatinina en orina pudo provocar que no correlacionaran dichas cifras con las de los nitritos y nitratos en sangre. En el estudio de Tsukara sí existió correlación pero la recogida se realizaba mediante sondaje. En nuestro estudio no nos pareció ético realizar este tipo de recogida ya que se trató de neonatos sanos y éste es un método invasivo y no exento de complicaciones.

Con la metodología utilizada para determinar el ONE total probablemente estamos analizando indirectamente el nivel de colonización de la vía aérea superior¹⁰⁰. Esto podría ser aplicado a diferentes estudios, particularmente en aquellas situaciones en las que existe una alta contaminación o infección en la vía respiratoria alta del recién nacido. Permitiría también el análisis que tienen sobre el neonato ciertas terapias aplicadas a la madre en caso de infección/contaminación (antibioticoterapia local o sistémica) antes o durante el parto.

CONCLUSIONES

1. La nueva metodología utilizada para determinar el óxido nítrico espirado en el recién nacido es útil, válida y reproducible.
2. La edad gestacional y el tipo de parto (vaginal o cesárea) no influyen en las cifras de ONe total.
3. El ONe total aumenta proporcionalmente a las horas de vida del recién nacido, por lo que existirán diferentes intervalos de normalidad en recién nacidos de menos de 36 horas de vida [4.13 (3.5-4.7) nL/min × kg] respecto a los de 37 a 72 horas de vida [4.68 (4.1-5.3) nL/min × kg].
4. Los recién nacidos con alto riesgo de infección tienen valores elevados de ONe total en las primeras 36 horas de vida ($p = 0.037$). Lo mismo sucede si se analizan los de 37 a 72 horas de vida ($p < 0.001$).
5. El único factor con influencia independiente en las cifras de ONe total fue el nivel de riesgo de infección ($p < 0.001$).
6. La edad gestacional, el tipo de parto (vaginal o cesárea) y las horas de vida no influyen en las cifras de nitritos y nitratos en sangre.
7. Los neonatos con alto riesgo de infección presentan cifras elevadas de nitritos y nitratos en sangre ($p = 0.043$).
8. No se ha encontrado relación entre el ONe total y los nitritos y nitratos en sangre.

BIBLIOGRAFÍA

1. Weston JT, Liebow AA, Dixon MG, Rich TG. Untoward effects of exogenous inhalants on the lung. *J Forensic Sci*, 1972;17:199-279.
2. Halstead CJ, Nation GH, Turner L. The determination of nitric oxide and nitrogen dioxide in flue gases. II. Continuous instrumental methods. *Analyst* 1972;97:64-69.
3. Dmitriev MT. Chemiluminescent determination of nitric oxide in the atmosphere. *Gig Sanit* 1976;1:79-82.
4. Koch-Weser J. Vasodilator drugs in the treatment of hypertension. *Arch Intern Med* 1974;133:1017-1027.
5. Ahearn DJ, Grim CE. Treatment of malignant hypertension with sodium nitroprusside. *Arch Intern Med* 1974;133:187-191.
6. Freeman G, Dyer RL, Juhos LT, St John GA, Anbar M. Identification of nitric oxide (NO) in human blood. *Arch Environ Health* 1978;33:19-23.
7. Anónimo. Oxides of nitrogen and health. *Lancet* 1981;10:81-82.
8. Davidson D, Eldemerdash A: Endothelium-derived relaxing factor. Presence in pulmonary and systemic arteries of the newborn guinea pig. *Pediatr Res*, 1990;27:128-132.
9. Busija DW, Leffler CW, Wagerle LC. Mono-L-arginine containing compounds dilate piglet pial arterioles via an endothelium-derived relaxing factor-like substance. *Circ Res*, 1990;67:1374-1380.

10. Beckman JS. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 1991;15:53-59.
11. Chaudhuri G, Buga GM, Gold ME, Wood KS, Ignaro LJ. Characterization and actions of human umbilical endothelium derived relaxing factor. *Br J Pharmacol* 1991;102:331-336.
12. Chaudhuri G, Heymann MA, Ignaro LJ, Longo LD, McNellis D, Mitchell MD, Vanhoutte PM. Research recommendations and conclusions from the National Institutes of Child Health and Human Development Conference on Endothelium-Derived Vasoactive Substances in Perinatal Research. *Semin Perinatol* 1991;15:2-3.
13. Journois D, Pouard P, Mauriat P, Malhere T, Vouhe P, Safran D. Inhaled nitric oxide as a therapy for pulmonary hypertension after operations for congenital Heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1129-1235.
14. Kozlov IA, Poptsov VN. Clinical use of nitric oxide inhalation. Review of the literature and initial clinical experiences. *Anesteziol Reanimatol* 1997;5:80-88.
15. Doughty LA, Kaplan SS, Carcillo JA. Inflammatory cytokine and nitric oxide responses in pediatric sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1996;24:1137-1143.
16. Doughty L, Carcillo JA, Kaplan S, Janosky J. Plasma nitrite and nitrate concentrations and multiple organ failure in pediatric sepsis. *Crit Care Med* 1998;26:157-162.
17. Baines PB, Stanford S, Bishop-Bailey D, Sills JA, Thomson AP, Mitchell JA, Fear SC, Hart CA, Pedtros AJ. Nitric oxide production in meningococcal disease is directly related to disease severity. *Crit Care Med* 1999;27:1187-1190.

18. Spack L, Havens PL, Griffith OW. Measurements of total plasma nitrite and nitrate in pediatric patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1997;25:1071-1078.
19. Uzuner N, Islekel H, Oxkan H, Sen A, Yenice S, Cevik N. Urinary nitrite excretion in low birth weight neonates with systemic inflammatory response syndrome. *Biol Neonate* 1997;71:362-366.
20. Ergenekon E, Gucuyener K, Erbas D, Koc E, Ozturk G, Atalay Y. Urinary nitric oxide in newborns with infections. *Biol Neonate* 2000;78:92-97.
21. Kobkiz L, Brecht DS, Lowenstein CJ. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:371-377.
22. Roger N, Barberá JA. Óxido nítrico: una molécula importante en las enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol* 1994;9:454-461.
23. Persson MG, Friberg SG, Hedqvist P, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide counteracts antigen-induced bronchoconstriction. *Eur J Pharmacol* 1993;249:78.
24. Gerlach H, Rossaint R, Pappert D, Knorr M, Falke KJ. Autoinhalation of nitric oxide after endogenous synthesis in nasopharynx. *Lancet* 1994;343:518-519.
25. Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuylenstierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 1994;7:1501-1504.
26. Lundberg JON, Rinder J, Witzberg E, Lundberg JM, Alving K. Nasally exhaled nitric oxide in humans originates mainly in the paranasal sinuses. *Acta Physiol Scand* 1994;152:431-432.
27. Schedin U, Frostell C, Persson MG, Jakobson J, Anderson G, Gustafsson LE.

- Contribution from upper and lower airways to exhaled endogenous nitric oxide in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995;39:327-332.
- 28.** Lum LCS, Tan PSK, Venkataraman ASST, Pinsky MR. Occult nitric oxide inhalation improves oxygenation in mechanically ventilated children. *J Pediatr* 1998;133:613-616.
- 29.** Lundberg JO, Witzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994;35:1543-1546.
- 30.** Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1210-1214.
- 31.** Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, Hjelm M, Barnes PJ. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin Sci* 1995;88:1543-1546.
- 32.** Persson MG, Agvald P, Gustafsson LE. Detection of nitric oxide in exhaled air during administration of nitroglycerin in vivo. *Br J Pharmacol* 1994; 111:825-828.
- 33.** Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne E, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-135.
- 34.** Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LS. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994;343:146-147.
- 35.** Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair RB, Barnes PJ. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1889-1993.

36. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995;8:295-297.
37. Matsumoto A, Ogura K, Hirata Y, Yakoki M, Watanabe F, Takenaka K, Shiratori Y, Momomura S, Omata M. Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis. *Ann Inter Med* 1995;123:110-113.
38. Kharitonov SA, Rajakulasingman K, O'Connor BJ, Durham SR, Barnes PJ. Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticosteroids. *J Allerg Clin Immunol* 1997;99:58-64.
39. Schilling J, Holzer P, Guggenbach M, Gyurech D, Marathia K, Geroulanos S. Reduced endogenous nitric oxide in the exhaled air of smokers and hypertensives. *Eur Respir J* 1994;7:467-471.
40. Persson MG, Cederqvist B, Wiklund CU, Gustafsson LE. Ethanol causes decrements in airway excretion of endogenous nitric oxide in humans. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol Section* 1994;270:273-278.
41. Morris NH, Carroll S, Nicolaidis KH, Steer PJ, Warren JB. Exhaled nitric oxide concentration and amniotic fluid nitrite concentration during pregnancy. *Eur J Clin Invest* 1995;25:138-141.
42. Balfour-Lynn IM, Lavery A, Diswiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996;75:319-322.
43. Schedin U, Norman M, Gustafsson LE, Herin P, Frostell C. Endogenous nitric oxide in the upper airways of healthy newborn infants. *Pediatr Res* 1996;40:148-151.
44. Schedin U, Norman M, Gustafsson LE, Jonsson B, Frostell C. Endogenous nitric

- oxide in the upper airways of premature and term infants. *Acta Paediatr* 1997;86:1229-1235.
45. Arlich A, Busch T, Lewandowski K, Schaible T, Falke KJ, Gortner L. Exhaled nitric oxide in preterm infants. *Respir Physiol* 1998;114:195.
46. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vascular biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 1999;41:765-772.
47. MacKenzie IM, Garrad CS, Young JD. Indices of nitric oxide synthesis and outcome in critically ill patients. *Anaesthesia* 2001;56:326-330.
48. Krafte-Jacobs B, Brillì R, Szabo c, Denenberg A, Moore L, Salzman AL. Circulating methemoglobin and nitrite/nitrate concentrations as indicators of nitric oxide in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med* 1997;25:1588-1593.
49. El Menyawi I, Looareesuwan S, Knapp S, Thalhammer F, Stoiser B, Burgmann H. Measurement of serum nitrite/nitrate concentrations using high-performance liquid chromatography. *Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;706:347-351.
50. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998;274:177-188.
51. Bories PN, Scherman E, Dziedzic L. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by capillary electrophoresis. *Clin Biochem* 1999;32:9-14.
52. Monaghan JM, Cook K, Gara D, Crowther D. Determination of nitrite and nitrate in human serum. *J Chromatogr A* 1997;770:143-149.
53. Casey TE, Hilderman RH. Modification of the cadmium reduction assay for detec-

tion of nitrite production using 2,3-diaminonaphthalene. *Nitric oxide* 2000; 4:67-74.

54. Misko PT, Schilling RJ, Salvemini DM, Moore WM, Cunie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Ann Biochem* 1993;214:11.
55. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. ERS Task Force Report: Exhaled and nasal nitric oxide measurements recommendations. *Eur Respir J* 1997;10:1683-1693.
56. Silkoff PE, Mc Lean PA, Slutsky AR, et al. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J respir Crit Care Med* 1997;155:260-267.
57. Gabbay E, Fisher AJ, Small T, Leonard AJ, Corris PA. Exhaled single-breath nitric oxide measurements are reproducible, repeatable and reflect levels of nitric oxide found in the lower airways. *Eur Respir J* 1998;11:467-472.
58. Arlich A, Jónsson B, Bhiladvala M, Lönnqvist PA, Gustafsson LE. Single breath analysis of endogenous nitric oxide in the newborn. *Biol Neonate* 2001;79:21.
59. Ho LP, Wood FT, Robson A, Innes JA, Greening AP. The current single exhalation method of measuring exhaled nitric oxide is affected by airway calibre. *Eur Respir J* 2000;15:1009-1013.
60. Cobos N, Reverte C, Garthner S, Lian S Quinto LL. Óxido nítrico espirado y nasal en niños normales y asmáticos. *An Esp Pediatr* 1998;49:241-247.
61. Byrnes CA, Dinarevic S, Busst C, Bus A, Shinebourne EA. Is nitric oxide in exhaled air produced at airway or alveolar level? *Eur Respir J* 1997;10:1021-1025.
62. Kharitonov SA, Barnes PJ. Nasal contribution to exhaled nitric oxide during exhalation against resistance or during breath holding. *Thorax* 1997;52:540-544.

63. Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, Alving K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Resp J* 1999;13:327-333.
64. American Thoracic Society and ATS Board of Directors. Practice Guideline: Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2104-2117.
65. Figueras J, Rodríguez-Miguélez JM; Moliner E, Botet F, Moreno J, Jiménez R. Exhaled nitric oxide in newborns. Prenatal and Neonatal Medicine. Abstracts of the XVth European Congress of Perinatal Medicine. Glasgow, September 1996. Parthenon Publishing, pp 234.
66. Figueras J, Rodríguez-Miguélez JM; Moliner E, Botet F, Moreno J, Jiménez R. Exhaled nitric oxide in newborns. Hot Topics 96 in Neonatology. Washington. December 1996, pp 507.
67. Arkovitz MS, Szabo C, Garcia VF, Wong HR, Wispe JR. Differential effects of hyperoxia on the inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the lung. *Shock* 1997;7:345-50.
68. Haight JS, Qian W, Daya H, Chalmers P, Zamel N. Hypoxia depresses nitric oxide output in the human nasal airways. *Laryngoscope* 2000;110:429-33.
69. Figueras J, Jordan Y, Rodríguez-Miguélez JM, Botet F, Moreno J, Jiménez R. Óxido nítrico espirado en el recién nacido. *An Esp Pediatr* 1999;129:121-126.
70. Figueras J, Rodríguez-Miguélez JM, Jordan Y, Botet F, Moreno J, Jiménez R. A different methodology for evaluating exhaled endogenous nitric oxide in newborns. *Acta Paediatr* 1999;88:471.
71. Figueras J, Jordan I, Rodríguez-Miguélez JM. Valoración del óxido nítrico endógeno espirado en el recién nacido. *RELAN* 2000;1:159-162.

72. Visser MJ, de Wit MC, van Aalderen WM, Postma DS, Brand PL. Exhaled nitric oxide in children measured by tidal breathing method: differences between asthmatics and nonasthmatic controls. *Pediatr Pulmonol* 2000;29:434-437.
73. Dinarevic S, Byrnes CA, Bus A, Shinebourne EA. Measurement of expired nitric oxide levels in children. *Pediatr Pulmonol* 1996;22:396-401.
74. Baraldi E, Azzolin NM, Cracco A, Zacchello F. Reference values of nitric oxide for healthy children 6-15 years old. *Pediatr Pulmonol* 1999;27:54-58.
75. Hadjikoumi I, Hasan A, Milner AD. Exhaled nitric oxide measurements in childhood asthma: comparison of two sampling techniques. *Pediatr Res* 2002;52:745-749.
76. Baraldi E, Azzolin NM, Dario C, Carra S, Ongaro R, Biban P, Zacchello F. Effect of atmospheric nitric oxide (NO) on measurements of exhaled NO in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol* 1998;26:30-34.
77. Steerenberg PA, Nierkens S, van Loveren H, van Amsterdam JG. A simple method to sample exhaled NO contaminated by ambient NO from children and adults in epidemiological studies. *Nitric Oxide* 2000;4:168-174.
78. Djupesland PG, Qian W, Haight JS. A new method for the remote collection of nasal and exhaled nitric oxide. *Chest* 2001;120:1645-1650.
79. Murtz P, Menzel L, Bloch W, Hess A, Michel O, Urban W. LMR spectroscopy: a new sensitive method for on-line recording of nitric oxide in breath. *Appl Physiol* 1999;86:1075-1080.
80. Robinson JK, Bollinger MJ, Birks JW. Luminol/H₂O₂ chemiluminescence detector for the analysis of nitric oxide in exhaled breath. *Anal Chem* 1999;71:5131-5136.

81. Gupta SK, Wagener JS, Erenberg A. Pulmonary mechanics in healthy term neonates: variability in measurements obtained with a computerized system. *J Pediatr* 1990;117:603-606.
82. Gastiasoro E, López de Heredia J, Valls A. Estudio de la mecánica pulmonar en recién nacidos pretérmino sin problemas respiratorios. *An Esp Pediatr* 1992;36:363-366.
83. Valls A, Gastiasoro E, López de Heredia J. Estudio de la mecánica pulmonar en recién nacidos a término sin problemas respiratorios. *An Esp Pediatr* 1990;33:511-514.
84. Biban P, Zangardi T, Baraldi E, Dussini N, Chiandetti L, Zacchello F. Mixed exhaled nitric oxide and plasma nitrites and nitrates in newborn infants. *Life Sci* 2001;68:2789-2797.
85. Aikio O, Pokela ML, M Halman. Exhaled and nasal NO in mechanically ventilated preterm and term newborns. *Acta Paediatr* 2002;91:1078-1086.
86. Endo A, Izumi H, Ayusawa M, Minato M, Takahashi S, Harada K. Spontaneous labor increases nitric oxide synthesis during the early neonatal period. *Pediatr Int* 2001;43:340-342.
87. Szabo C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz* 1995;3:2-32.
88. Shi Y, Li HQ, Schen CK, Wang JH, Qin SW, Liu R, Pan J. Plasma nitric oxide levels in newborn infant with sepsis. *J Pediatr* 1993;123:435.
89. Neily IJ, Copland M, Haj M, Adey G, Benjamin N, Bennet B. Plasma nitrate concentrations in neutropenic and non-neutropenic patients with suspected septicaemia. *BJ Haematol* 1995;89:199-202.

90. Wong H, Carcillo JA, Burckart G, Shah N, Janosky J. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. *Crit Car Med* 1995;23:835-842.
91. Carcillo JA. Nitric oxide production in neonatal and pediatric sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1063-1065.
92. Doughty L, Carcillo JA, Kaplan S, Janosky J. Plasma nitrite and nitrate concentrations and multiple organ failure in pediatric sepsis. *Crit Care Med* 1998;26:157-162.
93. Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K: Endothelium-derived relaxing and contracting factors during the early neonatal period. *Acta Paediatr* 1997;86:834.
94. Tsukahara H, Hiraoda M, Hori C, Tsuchida S, Hata I, Nishida K, Kikuchi K, Sudo M. Urinary nitrite/nitrate excretion in infancy: comparison between term and preterm infants. *Early Hum Dev* 1997;47:51-56.
95. Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Miyanomae T, Kikuchi K, Sudo M. Age-related changes of urinary nitrite/nitrate excretion in normal children. *Nephron* 1997;76:307-309.
96. Dzik J, Dobrzan A, Gruszfild D, Walajtys-Rode. Nitric oxide metabolites in the urine of full-term and preterm infants. *Pediatrics International* 2002; 44:368-372.
97. Honold J, Pusser NL, Nathan L, Chaudhuri G, Ignarro LJ, Sherman MP. Production and excretion of nitrate by human newborn infants: neonates are not little adults. *Nitric oxide* 2000;4:35-36.
98. Tsukahara H, Takeuchi M, Hata I, Hiraoka M, Kotsuji F, Sudo M, Mayumi M. Assessment of endogenous nitric oxide formation in newborns: mea-

surement of urinary nitrite and nitrate concentrations. *Biol Neonate* 1997;72:322-326.

99. Tsukahara H, Hata I, Sudo M. Urinary nitrite versus nitrate excretion in children. *J Pediatr* 1997;130:161.
100. Figueras – Aloy J, Jordan Y, Rodríguez-Miguélez JM, Jiménez W, Botet F, Carbonell X, Jiménez R. Expired nitric oxide in the newborn with high risk of perinatal infection. *Am J Perinatol* 2002;20:137-145.

MODELO A FIRMAR POR LOS PADRES DANDO SU CONFORMIDAD PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

En el Hospital Clínic se está llevando a cabo un estudio para determinar el óxido nítrico espirado en recién nacidos. Además de la evaluación clínica, deberá efectuarse la recogida del aire espirado durante 2 minutos y una extracción de 1 ml de sangre a cada niño sujeto al estudio.

Puesto en antecedentes de las características del estudio, acepto que mi hijo

.....
forme parte del mismo.

Firma del padre/madre

Fecha:

Nombre:

Dirección:

Teléfono:

NO ESPIRADO (NO_e) EN EL RECIEN NACIDO

Nombre y apellidos _____

Edad gestacional _____ semanas Peso nacimiento _____ g Talla _____ cm

Fecha nacimiento ____ / ____ / ____ Hora _____ Superficie corporal _____ m²

Tabaquismo (no pasivo < 10 cig. > = 10 cig. Alcoholismo sí no

Patología _____

GRUPO 1 (1 = sano, 2 = riesgo infección) _____ GRUPO 2 (1 = término, 2 = pretérmino) _____

GRUPO 3 (1 = vaginal, 2 = cesárea) _____ GRUPO 4 (1 = sin coriam., 2 = con corlo.) _____

GRUPO 5 (1 = sin atibi., 2 = con anti.) _____ GRUPO 6 (1 = < 48 horas, 2 = 4-5 días) _____

1.^a EXPLORACION Día ____ / ____ / ____ Hora _____ Horas vida _____

Día semana _____ Antibioterapia sí no Intubación sí no

Medicación _____

FR: ____ /min. FC ____ /min. TA: ____ / ____ (_____) Temperatura axilar ____ ° C

Peso actual ____ g FIO₂ ____ % Fototerapia sí no

Tipo de leche: materna artificial kCal / kg / Día _____ Horas desde toma _____

Resultados

Ambiente, 5 minutos: NO amb. = _____ NO₂ amb. = _____ Recién nacido: NO_e - 1 = _____ NO_{2e} - 1 = _____

Volúmen espirado ____ ml Tiempo recogida _____ min. Llanto _____ segundos Volumen/min × kg _____ ml/min × kg

NO_e total = _____ nl/min *kg Nitritos = _____ nmol/ml

2.^a EXPLORACION Día ____ / ____ / ____ Hora _____ Horas vida _____

Día semana _____ Antibioterapia sí no Intubación sí no

Medicación _____

FR: ____ /min. FC ____ /min. TA: ____ / ____ (_____) Temperatura axilar ____ ° C

Peso actual ____ g FIO₂ ____ % Fototerapia sí no

Tipo de leche: materna artificial kCal / kg / Día _____ Horas desde toma _____

Resultados

Ambiente, 5 minutos: NO amb. = _____ NO₂ amb. = _____ Recién nacido: NO_e - 1 = _____ NO_{2e} - 1 = _____

Volúmen espirado ____ ml Tiempo recogida _____ min. Llanto _____ segundos Volumen/min × kg _____ ml/min × kg

MO_e total = _____ nl/min *kg Nitritos = _____ mol/ml

2.^a EXPLORACION Día ____ / ____ / ____ Hora _____ Horas vida _____

Día semana _____ Antibioterapia sí no Intubación sí no

Medicación _____

FR: ____ /min. FC ____ /min. TA: ____ / ____ (_____) Temperatura axilar ____ ° C

Peso actual ____ g FIO₂ ____ % Fototerapia sí no

Tipo de leche: materna artificial kCal / kg / Día _____ Horas desde toma _____

Resultados

Ambiente, 5 minutos: NO amb. = _____ NO₂ amb. = _____ Recién nacido: NO_e - 1 = _____ NO_{2e} - 1 = _____

Volúmen espirado ____ ml Tiempo recogida _____ min. Llanto _____ segundos Volumen/min × kg _____ ml/min × kg

NO_e total = _____ nl/min × kg Nitritos = _____ mol/ml

VALORES MEDIOS:

NO_e = _____ ppm Volúmen / min./kg = _____ ml/min × kg

NO_e total = _____ ml / min. × kg DS = _____ CV = _____ %