

Sepsis Neonatal. Nuevas estrategias terapéuticas

Dr. José Luis Orfali

Servicio de Neonatología, Hospital San José

Resumen

La sepsis neonatal sigue siendo un desafío para el neonatólogo. A pesar del uso de terapias más agresivas, antibióticos de amplio espectro y la creación de unidades de cuidados intensivos neonatales, la mortalidad sigue siendo inaceptablemente alta, sobretodo en el prematuro. Esta revisión pretende revisar las evidencias actuales respecto al uso de nuevas terapias en la sepsis del neonato. Lamentablemente, la casi total ausencia de estudios controlados y randomizados en recién nacidos, hacen difícil obtener conclusiones para utilizarlos como una terapia en la práctica clínica actual.

Palabras Clave: Sepsis, inmunoterapia, recién nacidos.

Introducción

El éxito del tratamiento de la sepsis neonatal requiere del reconocimiento precoz de la infección, de una terapia antimicrobiana apropiada y de un soporte respiratorio, quirúrgico y cardiovascular agresivo. Sumado al manejo convencional, se han descrito varias terapias coadyuvantes en la sepsis neonatal. Éstas incluyen el uso de inmunoglobulina inmune endovenosa, transfusión de neutrófilos, exsanguineotransfusión, plasmáferesis, bloqueadores de endo/exotoxinas, bloqueadores de la cascada séptica y fármacos que disminuyen el daño tisular, entre otros. Este artículo intentará abordar las evidencias actuales que apoyan o desmienten el uso de estas terapias en neonatos.

Importancia y epidemiología de la sepsis

A pesar de los avances en terapia antibiótica, de las medidas de soporte y del conocimiento de los factores de riesgo infeccioso, la sepsis sigue siendo causa importante y quizás inaceptablemente alta de mortalidad y morbilidad en las unidades neonatales. La sepsis de inicio temprano o perinatal afecta a 1-2 de 1000 recién

nacidos de término y llega a afectar hasta 19 de 1000 prematuros menores de 1000 grs. La sepsis tardía o intrahospitalaria a su vez afecta a un 2 a 5% de todos los recién nacidos hospitalizados y hasta un 15% de los RN ingresados en la UTI por más de 48 horas. Los prematuros son los más afectados, desarrollando sepsis nosocomial un 25-50% de los menores de 29 semanas y un 50 a 80% de los menores de 25 semanas. Por otra parte, las tasas de mortalidad en recién nacidos son aún tan altas como un 30% a 50% (1, 2, 3, 4)

Definiciones

Se define a la sepsis como la respuesta inflamatoria sistémica frente a la infección. La enfermedad y sus secuelas se manifiestan como estadios progresivos de un mismo proceso en la cual esta respuesta sistémica puede generar una reacción inflamatoria generalizada en órganos distantes a la lesión inicial y eventualmente inducir disfunción multiorgánica (5).

En 1992 una conferencia de expertos planteó un nuevo conjunto de definiciones para la sepsis y cuadros similares (infección, bacteremia, hipotensión, síndrome séptico, sepsis, shock séptico y falla multiorgánica), acuñándose también el término de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS). El SIRS se define como la respuesta clínica frente a insultos no específicos. En esta Conferencia se definió la sepsis como el SIRS con infección comprobada. Un hecho importante de esta nueva terminología es que reconoce el rol fundamental que la inflamación sistémica juega en la sepsis, aceptando que las manifestaciones clínicas no están causadas solamente por factores relacionados a la patogenicidad microbiana. Implica una modificación conceptual en la evaluación de los pacientes críticos con infección, un cambio de perspectiva y no una nueva entidad clínica.

La identificación de un cuadro de SIRS no confirma el diagnóstico de infección o sepsis, dado que puede producirse en otras situaciones clínicas no infecciosas como pancreatitis aguda,

politraumatismos, grandes quemaduras o postoperatorio de cirugía mayor.

El Consenso definió sepsis severa como al cuadro séptico al que se le agrega una disfunción orgánica, hipoperfusión y/o hipotensión arterial y definió además el shock séptico como al cuadro de sepsis severa con hipotensión arterial que no responde a expansión adecuada con líquidos. A la secuela del cuadro de SIRS-Sepsis se la denominó Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (MODS). Entendemos disfunción como la imposibilidad de mantener la homeostasis sin intervención terapéutica. Debe quedar claro que el MODS es la evolución continua de la inflamación sistémica a la sepsis, el shock séptico y la disfunción orgánica. Tendremos que acostumbrarnos a usar más esta clasificación en nuestras unidades neonatales.

Factores de Riesgo en el Recién Nacido

El riesgo de desarrollar sepsis se debe en parte a la mayor vulnerabilidad de las barreras naturales y en parte al compromiso del sistema inmune:

- La transferencia placentaria materna de IgG al feto recién comienza a las 32 semanas de gestación.
- IgA secretora está muy disminuida tanto en los pulmones como en el sistema gastrointestinal. Además las barreras físicas naturales son inmaduras, especialmente piel, cordón umbilical, pulmón e intestino.
- Hay una disminución de la actividad de la vía alterna del complemento (C3). Existe una deficiencia en la opsonización de los gérmenes con cápsula polisacárida.
- Rápido agotamiento de los depósitos de neutrófilos maduros medulares cuando hay exposición a una infección. Estos neutrófilos tienen menor capacidad de adherencia y fagocitosis y menor capacidad bactericida.
- La inmunidad mediada por linfocito T helper y linfocito natural killer está alterada y la memoria inmunológica es deficiente.
- A mayor prematuridad hay más inmadurez inmunológica y mayor frecuencia de infecciones.

Fisiología de la inflamación

La inflamación es una respuesta rápida, humoral y celular amplificada. Las citocinas son los mensajeros fisiológicos de la respuesta inflamatoria. Son pequeñas moléculas proteicas o glicoproteicas cuya función fundamental es

intervenir en la transmisión de información (señales) de una célula a otra. Se unen a receptores específicos de sus células blanco, provocando en estas células modificaciones que llevan a la síntesis y liberación de mediadores secundarios. En el proceso séptico inducen la liberación de otras citocinas, óxido nítrico (NO) o metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leukotrienos). Su efecto se ejerce fundamentalmente sobre las células que rodean a la célula emisora (efecto paracrino). Las principales citocinas proinflamatorias son el factor de necrosis tumoral (TNF- α), las interleukinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) y los interferones. La infección es el mayor estímulo para la liberación de citocinas por la acción de moléculas bacterianas, como la endotoxina (LPS), que son reconocidas por células del sistema inmune innato.

Los polimorfonucleares, monocitos - macrófagos y las células endoteliales son los efectores celulares de la respuesta inflamatoria. La activación leucocitaria lleva a la agregación de leucocitos en la microcirculación con liberación de mediadores. Las células endoteliales, expuestas a este medio de factores humorales y leucocitarios, también se activan y comienza la expresión de diversas moléculas de adhesión y receptores en su superficie que favorecen el paso de polimorfonucleares a los tejidos injuriados junto con la síntesis y secreción de citocinas y otros mediadores inflamatorios secundarios como las prostaglandinas, leukotrienos, tromboxanos, factor activador de plaquetas (PAF), radicales libres de oxígeno, óxido nítrico (NO) y proteasas. Muchos de estos mediadores secundarios son producidos también por los leucocitos. Las células endoteliales activadas y el incremento de citocinas en el medio activan la cascada de la coagulación provocando fenómenos trombóticos locales.

En la mayoría de los casos, el efecto benéfico de los mediadores proinflamatorios supera sus efectos negativos. Eliminan los tejidos dañados, promueven el crecimiento de los tejidos y combaten organismos patógenos, células neoplásicas y antígenos extraños. Para evitar que esos mediadores desarrollen efectos nocivos por sobrestimulación, el organismo rápidamente desarrolla una respuesta antiinflamatoria. En esta reacción compensatoria intervienen citocinas antiinflamatorias, como las interleukinas 4 (IL-4), 10 (IL-10) y 11 (IL-11), receptores solubles y antagonistas de receptores. Su efecto es menos conocido que el de los mediadores proinflamatorios, pero parece que alteran la función de los monocitos

y reducen la capacidad de las células de producir citocinas proinflamatorias.

Otro componente fundamental del sistema es el endotelio. Normalmente las células endoteliales expresan un fenotipo anticoagulante, anti-adhesión celular y vasodilatador. Cuando son activadas, como en la inflamación, expresan propiedades procoagulantes y pro-adhesión celular.

En ocasiones la homeostasis no se restablece, iniciándose una respuesta sistémica masiva. El efecto de las citocinas se transforma en deletéreo y los mediadores inflamatorios disparan distintas cascadas con activación sostenida del sistema reticuloendotelial, pérdida de la integridad microvascular y disfunción de órganos distantes del sitio de la injuria inicial.

Las fuerzas antagónicas entre la inflamación y la antiinflamación pueden tender a un estado de equilibrio o desequilibrio. El desequilibrio con un mayor insulto inflamatorio produce un estado de shock profundo, con gran mortalidad, que se presenta en forma fulminante, ej: sepsis por meningococo. El predominio de la antiinflamación, lleva al paciente luego de los primeros días de la sepsis a un estado de anergia o "parálisis inmunológica". Esta situación define un cuadro llamado, en inglés, compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS), que explica el aumento de sobreinfecciones, como las producidas por catéteres o heridas.

Fisiopatología de la sepsis y el shock séptico en neonatos

En los últimos años se han ampliado de manera impresionante los conocimientos sobre la fisiopatología de la sepsis en neonatos. Hoy se sabe que el fenómeno de cascada séptica, que lleva a la falla orgánica múltiple, se debe más a una inadecuada respuesta autoinmunitaria que al daño tisular directo de la bacteria.

Como se mencionó, la evidencia clínica y experimental indica que la fisiopatología de esta reacción inflamatoria es mediada por citocinas que aparecen en la circulación sistémica. Esta evidencia se desprende de tres elementos esenciales:

- Existe un incremento de las citocinas plasmáticas en todos los síndromes sépticos.
- La infusión endovenosa de citocinas resulta en un estado similar al séptico.
- Los bloqueadores de citocinas abortan algunos de los efectos fisiológicos de la sepsis.

Aunque muchas citocinas juegan un posible rol en la patogénesis y todas estas han sido

aisladas y caracterizadas, sólo cuatro citoquinas tienen un rol clínicamente importante: factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleuquina 1 beta, IL-6 e IL-8. Estas citoquinas se secretan secuencialmente en los modelos experimentales de sepsis. Además se encuentran en estos modelos moléculas naturales y específicas que neutralizan las citoquinas, que se dividen en receptores solubles y antagonistas de receptores. La interacción entre estas citoquinas y las moléculas neutralizantes se cree define la presentación clínica y el pronóstico de la reacción séptica.

La endotoxina de los gram-negativos, que entra a la circulación sistémica, es el principal inductor primario de la reacción séptica, pero en los recién nacidos los gérmenes causales de la sepsis son gram-positivos y sus exotoxinas.

A diferencia de adultos y niños mayores, en los que coexisten y se superponen dos fenómenos hemodinámicos llamados shock frío y shock caliente, los recién nacidos sépticos se presentan clínicamente más parecidos al shock frío, con disminución del gasto cardíaco, mal perfundidos, vaso contraídos e hipotensos, agregándose además un fenómeno de aumento de la resistencia vascular pulmonar, que deriva en hipertensión pulmonar. Esto probablemente tenga relación, en el recién nacido, con inhibición del factor de relajación del endotelio (óxido nítrico) y con un importante aumento del tromboxano A₂, ampliamente demostrado en modelos animales.

Uso de terapias inmunes en la sepsis del neonato

Probablemente ningún aspecto de la sepsis neonatal ha sido tan estudiado y controversial como la utilización de terapias que interfieran o bloqueen la cascada infamatoria sistémica de la sepsis. A pesar de la aparición de múltiples terapias en modelos experimentales en animales -tanto de uso profiláctico como terapéutico- con resultados alentadores, no existe una correlación satisfactoria con estudios clínicos en seres humanos. Además la mayoría se realiza en adultos y niños, existiendo muy pocos estudios randomizados en recién nacidos.

Técnicas de biología molecular han permitido desarrollar citoquinas recombinantes, anticuerpos específicos con alta afinidad y receptores de citoquinas que se transfectan como vectores en modelos experimentales. Las estrategias para bloquear las citoquinas incluyen moléculas neutralizantes que se unen a las citoquinas y

bloqueo de los receptores donde interactúan las citoquinas en el órgano blanco. Los posibles sitios de intervención en la cascada séptica incluyen los siguientes:

- Bloqueadores de la endotoxina y la exotoxina.
- Bloqueadores de mediadores próximos: IL-1 β y TNF-alfa.
- Bloqueadores de otras citoquinas pro-inflamatorias, inducidas por mediadores próximos: IL-6, TX, PAF, IL-8, interferón gamma, leucotrienos, eucosanoides, fibrinolíticos, etc.
- Citoquinas antiinflamatorias: IL-10, IL-4.
- Factores de crecimiento del sistema inmune: G-CSF y GM-CSF.
- Uso de transfusiones de neutrófilos para potenciar respuesta celular del huésped.
- Uso de inmunoglobulinas exógenas para potenciar defensa humoral del huésped.
- Fármacos que disminuyan el daño en el órgano blanco. antioxidantes, inhibidores de radicales libres y de proteasas, inhibidores del óxido nítrico.
- Fármacos antiinflamatorios generales (corticoides, pentoxifilina, etc.) y antiinflamatorios específicos (linfocitos Th1/Th2).
- Remoción de citoquinas de la circulación: exsanguíneo transfusión, hemofiltración, plasmaféresis.

Estrategias para bloquear endotoxinas

Como se dijo, la liberación bacteriana de la endotoxina (cápsula lipopolisacárida) es el fenómeno más proximal de la cascada séptica, y su infusión puede remedar todos los fenómenos presentes en la sepsis. Se han desarrollado anticuerpos contra la endotoxina (LPS) y su principal componente, el Lípido A, por ingeniería genética (Anticuerpos monoclonales) y otros murinos. Las aproximaciones iniciales estaban dirigidas a bloquear el LPS con antisuero de *E. coli* (Anticuerpos policlonales humanos J5). Estudios iniciales mostraron reducción de la mortalidad en adultos con bacteremia por Gram-negativos, lo que no se confirmó en estudios posteriores (17, 18). Dos anticuerpos monoclonales tipo IgM han sido ampliamente estudiados. Dos estudios grandes con E5 (compuesto murino) no mostraron mejorar la sobrevida en septicemia por gram-negativos. Otros extensos estudios con un anticuerpo humano contra la endotoxina (HA-1A) mostraron resultados contradictorios. Mientras que en el estudio inicial no se mostró beneficio en reducir la mortalidad global en pacientes con sepsis, cuando se analizó el

subgrupo con hemocultivos positivos a gram-negativos hubo una significativa reducción de la mortalidad. Pero en 1993 se suspendió un estudio con este anticuerpo (HA-1A) porque el grupo con sepsis no tratada tenía una mayor mortalidad que el grupo de tratamiento cuando la sepsis no era por gram-negativos. No se encontró respuesta a esta situación y se abandonó (19).

Otras aproximaciones potenciales son: bloquear el LPS con neutralizantes endógenos o naturales (proteínas catiónicas-CAP-7 y 18 y la proteína que aumenta la permeabilidad-BPI), bloquear la interacción del LPS con su receptor celular (CD14) y utilizar agonistas del lípido A que compiten con el receptor. Ninguna de estas terapias se ha probado en recién nacidos (16).

Estrategias para bloquear citoquinas

El TNF-alfa y la IL-1 son considerados los principales mediadores proximales de la sepsis porque sus niveles plasmáticos se elevan tempranamente en el curso del síndrome séptico. Su infusión provoca fiebre, catabolismo, síntesis hepática de reactantes de fase aguda, hipotensión y taquicardia, además de una disminución transitoria de los granulocitos. El incremento del TNF se ha asociado a mayor mortalidad (10-14).

Dos ensayos en adultos con anticuerpos monoclonales contra TNF-alfa no mostraron beneficio en pacientes sépticos con o sin shock. Otros dos estudios, más recientes, también en un pequeño número de adultos, usando anticuerpos monoclonales de la fracción F(ab')₂ del anticuerpo contra TNF-alfa (altamente específicos), mostraron reducción de la mortalidad cuando se usaba la IL-6 como marcador de sepsis grave (13,15). También se han ensayado receptores solubles de superficie para TNF, sin resultados (15).

La pentoxifilina, una xantina con efecto inhibitorio de TNF-alfa en monocitos/macrófagos (inhibidor de fosfodiesterasa), ha demostrado reducir el riesgo de sepsis tardía (mayor a 7 días) en neonatos prematuros en dos estudios randomizados de uso profiláctico, sin efectos adversos demostrables. Faltan estudios con mayor número de pacientes para tener una conclusión (22).

El uso de anticuerpos monoclonales contra IL-6 y de INF gamma no ha mostrado beneficios en los estudios realizados (15).

Otras anticitoquinas naturales como TNF soluble y el anticuerpo IL-1ra, mostraron efectos beneficiosos en animales, pero en un gran estudio

en adultos no se demostró beneficio en reducir mortalidad (20).

El uso de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 se ha usado en modelos animales con resultados promisorios por su efecto inmunomodulador, pero aún no hay ensayos publicados en recién nacidos o niños (20).

Los antagonistas de la PAF reducen la mortalidad en modelos de ovejas y en al menos un estudio en adultos con sepsis por Gram-negativos. También falta evaluación en neonatos o niños (20).

La sepsis neonatal habitualmente se asocia a coagulación intravascular diseminada por estimulación de la cascada fibrinolítica. El uso de antitrombina III, heparina y plasma fresco congelado ha mostrado ser beneficioso en adultos, pero sus efectos en RN no están corroborados.

Antiinflamatorios generales

El rol de inhibidores de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos como tratamiento de la sepsis aún no está establecido

Los corticoides han sido ensayados en la sepsis desde 1951. Su utilidad se discute en varios meta-análisis recientes en niños con sepsis (más de 40 estudios). De los 10 estudios bien realizados sólo uno mostró beneficios, por lo tanto se concluye que los corticoides no reducen la mortalidad (26). No hay meta-análisis de estudios con corticoides en recién nacidos y no deben usarse por los importantes efectos adversos, excepto quizás en la insuficiencia suprarrenal demostrada.

La adición de glutamina como suplemento nutricional demostró reducir la sepsis nosocomial en prematuros con aporte vía enteral, pero otro estudio también controlado y randomizado con aporte parenteral no mostró reducción del riesgo.

Inmunoglobulinas en pacientes con sepsis

Los niveles de inmunoglobulinas en el prematuro son un 40% de los del recién nacido de término. Aparentemente hay una inmadurez de los linfocitos B, de las células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas y de los linfocitos T facilitadores (helper). Además los anticuerpos tipo-específicos de la cápsula polisacárida son deficientes, lo que hace atractivo el uso exógeno de gammaglobulina hiperinmune. Se han realizado múltiples estudios en recién nacidos pretérmino para prevención de sepsis. La administración de inmunoglobulina humana intravenosa en recién nacidos como profilaxis demostró, en un completo y

reciente meta-análisis, una pequeña pero significativa reducción en la incidencia de sepsis (reduce la aparición de sepsis en un 6%), pero ¿justifica el costo? (25).

Sin embargo, aún faltan estudios que demuestren que el uso de inmunoglobulina -tanto en prematuros como en recién nacido de término- como terapia en sepsis demostrada, reduzca la mortalidad, por lo que no se puede recomendar el uso rutinario como tratamiento de un recién nacido séptico (pocos estudios, resultados heterogéneos). Pero la discusión persiste dado el efecto positivo en algunos de estos estudios bien realizados (25). Además se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos para *Streptococo* grupo B y para Epstein Barr virus, con buenos resultados preeliminares.

Factores estimulantes de colonias y transfusiones de granulocitos

La tendencia del neonato séptico a la neutropenia y a la depleción de los depósitos medulares de neutrófilos, hace atractivo el uso de transfusiones de células blancas y de factores estimulantes de colonias de granulocitos y de granulocito-macrófagos. Los factores estimulantes de colonias de granulocitos y de granulocito-macrófagos son citoquinas naturales que estimulan la producción y la acción antibacteriana de los neutrófilos. Su uso en sepsis es discutible ya que tres estudios bien realizados, con 359 neonatos como profilaxis y 7 estudios en sepsis sospechada con 257 pacientes, no mostraron para ninguna de las dos citoquinas una reducción en la incidencia ni en la mortalidad por sepsis (24). Ambas incrementan significativamente los recuentos de neutrófilos sin efectos adversos demostrables y se deben usar para tratamiento de la neutropenia severa (RAN <1000) debido a hipertensión arterial materna o secundaria a neutropenias congénitas, pero su uso en sepsis no está aún respaldado como para recomendar su uso.

Tampoco hay evidencias concluyentes respecto al uso de transfusiones de granulocitos en neonatos sépticos como tratamiento de rutina. Cuatro pequeños estudios randomizados y controlados, pero muy heterogéneos, en un meta-análisis no mostraron diferencias respecto al grupo control en reducir morbilidad ni mortalidad por sepsis (RR 0.89, 95% CI 0,43-1,86) (23). En este mismo análisis, cuando se comparó transfusiones de granulocitos con inmunoglobulina, se demostró

una reducción marginal de la mortalidad (RR 0.06, 95% CI 00-1,04, con NNT 2.7, 95% CI 1,6-9,1).

Hemofiltración, plasmaféresis y exanguineotransfusión

La remoción de mediadores proinflamatorios por diferentes técnicas extracorpóreas, como la hemofiltración continua, hemodiafiltración, hemodiálisis, plasmaféresis, o exanguineotransfusión, tiene efecto sobre la mortalidad de pacientes adultos con sepsis o shock séptico. La hemofiltración elimina por convección moléculas de pequeño tamaño del tipo 30 kD. El balance teórico que produce la HF entre los mediadores inflamatorios y antiinflamatorios es desconocido, dado que no todas las moléculas se depuran por igual. Su rol en el recién nacido no está demostrado. La exanguineotransfusión es un método que elimina gran cantidad de mediadores en un período de tiempo corto, al igual que la plasmaféresis, por lo que ha sido reportada como de utilidad en algunos casos de shock. Estas técnicas no alteran el balance pro-antiinflamatorio ya que eliminan todas las moléculas en un período corto de tiempo, pero su aplicación en un recién nacido enfermo (séptico) tiene alta mortalidad y no debe intentarse hasta que se concluyan las investigaciones (20).

Estrategias de inmunomodulación en el órgano blanco

Existe mucha evidencia clínica y experimental de la participación del óxido nítrico (un potente vasodilatador) en los fenómenos hemodinámicos del shock séptico (25). Investigaciones en perros tratados con L-arginina (un inhibidor de la síntesis del NO), mostraron buenos resultados iniciales, con una mejoría de la resistencia vascular pulmonar y del gasto cardíaco, pero posteriormente se produjo mayor mortalidad tardía, lo que se repitió en dos pequeños estudios en adultos. También hay evidencias respecto al rol de los neutrófilos en el daño directo tisular por producción de radicales libres, proteasas y la liberación de lisozimas y oxidantes directamente en el tejido blanco, especialmente en el tejido endotelial y a nivel alveolar pulmonar. Estudios que usaron CD18 (potente receptor que promueve la adherencia de neutrófilos) mostraron reducción de la mortalidad y del daño tisular en modelos de conejos. El uso de antioxidantes y de inhibidores de proteasas se ha intentado con resultados variables en animales. Ninguna de estas terapias se ha

probado en recién nacidos, pero están en evaluación.

Conclusiones

Hemos avanzado notablemente en el conocimiento de la sepsis, pero la casi total ausencia de estudios en recién nacidos y los desalentadores resultados en adultos hacen pensar que aún estamos lejos de una terapia potente y sustentable como coadyuvante en nuestros pequeños pacientes.

Bibliografía.

1. Avery M.E., Tooley W.H., Sèller J.B., et al. Is chronic lung disease in low birth weight infants preventable? A survey of eight centers. *Pediatrics* 1987; 79: 26-30.
2. Gregory G.A., Kitterman J.A., Phibbs R.H., et al. Treatment of the idiopathic respiratory distress syndrome with continuous positive airway pressure. *N Engl J Med* 1971; 284: 1333-40.
3. Barrie H. Simple method of applying continuous positive airway pressure in respiratory distress syndrome. *Lancet* 1972, 1: 776-777.
4. Ahlstrom H., Jøson B., Svenningsen N.W. Continuous positive airway pressure with a face chamber in early treatment of idiopathic respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1973; 62: 433-436.
5. Ackermann B.D., Stein M.P., Sommer J.S., Schumacher M. Continuous positive airway applied by means of a tight-fitting mask. *J Pediatr* 1974; 85: 408-411.
6. Vert P., Andre M., Sibout M. Continuous positive airway pressure and hydrocephalus. *Lancet* 1973; 2: 319.
7. Pape K.E., Armstrong D.L., Fitzhardinge P.M.. Central nervous system pathology associated with mask ventilation in the very low birth weight infant: a new etiology for intracerebellar hemorrhages. *Pediatrics* 1976; 58: 473-483.
8. Gregory G.A., Kitterman J.A., Phibbs R.H., Tooley W.H., Hamilton W.K. Treatment of the idiopathic respiratory distress syndrome with continuous positive airway pressure. *N Engl J Med* 1971; 284: 133.
9. Saunders R.A., Milner A.D., Hopkin I.E. The effects of continuous positive airway pressure on lung mechanics and lung volumes in the neonate. *Biol Neonate* 1976; 29: 178-186.
10. Schaffer T.H., Koen P.A., Moskowitz G.D., Ferguson J.D., Delivoria-Papadopoulos M.

- Positive end expiratory pressure effects on lung mechanics of premature lambs. *Biol Neonate* 1978; 34:1-10.
11. Martin R.J., Nearman H.S., Katona P.G., Klaus M.H. The effect of a low continuous positive airway pressure on the reflex control of respiration in the preterm infant. *J Pediatr* 1977; 90:976-981.
 12. Miller M.J., Carlo W.A., Martin R.J. Continuous positive airway pressure selectively reduces obstructive apnea in preterm infants. *J Pediatr* 1985; 106:91-94.
 13. Annat G., Viale J.P., Bui Xuan B., Hadj Aissa O., Benzoni D., Vincent M., Gharib C., Motin J. Effect of PEEP ventilation on renal function, plasma renin, aldosterone, neurophysins and urinary ADH and prostaglandins. *Anesthesiology* 1983; 58:136-141.
 14. Kamper J., Ringsted C. Early treatment of idiopathic respiratory distress syndrome using binasal continuous positive airway pressure. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:581-586.
 15. Wung J.T., Driscoll J.M., Epstein R.A., Hyman A.I. A new device for CPAP by nasal route. *Critical Care Medicine* 1975;3:76-78.
 16. Lee K.S., Dunn M.S., Fenwick M., Shennan A.T. A comparison of underwater bubble continuous positive airway pressure with ventilator derived continuous positive airway pressure in premature neonates ready for extubation. *Biol Neonate* 1998;73:69-75.
 17. Courtney S.E., Pyon K.H., Saslow J.G. et al. Lung recruitment and breathing pattern during variable versus continuous flow nasal continuous positive airway pressure in premature infants: an evaluation of three devices. *Pediatrics* 2001;107:304-308.
 18. Benveniste D., Berg O., Pedersen J.E. A technique for delivery of continuous positive airway pressure to the neonate. *J Pediatr* 1976;88:1015-1019.
 19. Gittermann M.K., Fusch C., Gittermann A.R., Regazzoni B.M., Moessinger A.C. Early nasal continuous positive airway pressure treatment reduces the need for intubation in very low birth weight infants. *European Journal of Pediatrics* 1997;156:384-388.
 20. Lindner W., Vossbeck S. Humler H., Pohland F. Delivery room management of extremely low birth weight infants spontaneous breathing or intubation? *Pediatrics* 1999;103:961-967.
 21. Gerard ., Fox W.W., Outerbridge E.W., Beaudry P.H. Early versus late introduction of continuous positive airway pressure in the management of the idiopathic respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1975;87:591-595
 22. Krouskop R.W., Brown E.G., Sweet A.. The early use of continuous positive airway pressure in the treatment of idiopathic respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1975;87:263-267.
 23. Verder H., Robertson B., Greisen G. et al. Surfactant therapy and nasal continuous positive airway pressure for newborn with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1994;331:1051-1055.
 24. Verder H., Albertsen P., Ebbesen F., Greisen G. et al. Nasal continuous positive airway pressure and early surfactant therapy for respiratory distress syndrome in newborns of less than 30 weeks' gestation. *Pediatrics* 1999;103(2):e24.
 25. Thomson M.A. Early CPAP + prophylactic surfactant at risk of RDS. The IFDAS trial (abstract) *Pediatr Res* 2001;50:304A.