

Infancia y Medio Ambiente

PROTOCOLO 12-13 AÑOS

Cohorte de Ribera d'Ebre

Indice

1. Introducción
2. Esquema de la visita
3. Cuestionarios (niño/a y padres)
4. Exploración física del niño
 - 4.1 Valoración antropométrica
 - 4.1.1 Peso, talla y cintura
 - 4.1.2 Bioimpedancia
 - 4.2 Tensión arterial
 - 4.3 Función respiratoria
 - 4.3.1 Espirometría
 - 4.3.2 Prueba broncodilatadora
5. Valoración neuropsicológica del niño (TESTS y AUTOCUMPLIMENTADOS)
6. Muestras biológicas
 - 6.1 Orina
 - 6.2 Pelo
 - 6.3 Sangre
7. Material necesario

Anexo 1. Información y consentimiento 12-13 años

Anexo 2. Formulario espirometría

Anexo 3. Formulario antropometría

Anexo 4. Hoja de monitorización

Anexo 5. Hoja corrección de datos

1. Introducción

La cohorte de nacimientos de Ribera d'Ebre se creó entre marzo de 1997 y diciembre de 1999 con el objetivo principal de estudiar los efectos de la exposición a compuestos organoclorados en la salud de los niños, principalmente a nivel de neurodesarrollo. Al nacer y a la edad de 2-3 meses, 1-1.5 años y 4-4.5 años se hizo el seguimiento de la cohorte con pruebas de neurodesarrollo, obtención de muestras biológicas y cuestionarios, datos a partir de los cuales se han escrito 23 artículos. En la actualidad los niños que forman parte de la cohorte y que nacieron en 1997 han alcanzado la edad de 12-13 años y es importante continuar con el trabajo iniciado en 1997. El proyecto para poder continuar con el seguimiento de la cohorte a esta edad está aprobado y financiado. Además de los 102 niños iniciales se pretende añadir sus compañeros de clase en el estudio (alrededor de 60) con el objetivo de tener más información para estudiar no sólo neurodesarrollo, sino también obesidad, desarrollo sexual, asma y atopia.

Para realizar todo el trabajo y por motivos de logística es esencial la colaboración del doctor y enfermeras del Centro de Atención Primaria (CAP) de Flix, ya que allí es donde se van a realizar las diferentes pruebas:

- ❖ Cuestionarios
- ❖ Exploración física del niño/a
- ❖ Espirometrías
- ❖ Bioimpedancia
- ❖ Valoración neuropsicológica del niño/a
- ❖ Muestras biológicas (orina, cabello y sangre)

Dichos objetivos se cumplirán en dos visitas al CAP de Flix. En la primera, con la colaboración del personal del CAP, se realizará la exploración física, la espirometría y la obtención de sangre. En la segunda visita, conducida por investigadores del CREAL, se realizarán las pruebas de bioimpedancia y neurodesarrollo y se contestarán los cuestionarios para recolectar datos demográficos (padres y niño/a), de salud, consumo de alcohol y tabaco, uso de telecomunicaciones, grado de actividad física y dieta (tipo "24h recall") del niño. También se tomará una muestra de cabello y de orina. Finalmente, se pedirá la colaboración del instituto donde estudian los niños para que durante dos días puedan contestar, dos veces más, el cuestionario de dieta tipo "24h recall".

2. Esquema de la visita

Primera Visita (madre/padre e hijo/a):

- 1- Firmar los consentimientos informados (Anexos 1)
- 2- Revisión médica general y exploración física (medidas antropométricas, presión arterial y estadios de Tanner)
- 3- Espirometría (más prueba bronco dilatadora, en caso de que el niño sea asmático y no haya tomado medicación ese día).
- 4- Extracción sangre en ayunas

Segunda Visita (madre/padre e hijo/a):

- 1- Recoger muestra de orina
- 2- Recoger muestra de pelo
- 3- Prueba de bioimpedancia
- 4- El niño/a contesta los cuestionarios de información general y dieta (24h recall, primera vez).
- 5- Realización de las pruebas de neurodesarrollo (CPT, N-back, Go-no-go y WISC-IV Vocabulario) y contestación del cuestionario de comportamiento (Child Behaviour Checklist para niños).
- 6- Madre/Padre contestan el cuestionario General (datos demográficos, ambiente en casa, embarazo) y el de comportamiento (Child Behaviour Checklist para padres).
- 7- Hacer alícuotas de sangre y orina (agitación, centrifugación, alicuotación...).
- 8- Guardar las muestras biológicas en el lugar que les corresponda.
- 9- Rellenar la hoja de monitorización (Anexo 4)

3. Cuestionarios

Los cuestionarios que se van a realizar son:

- Cuestionario general para los padres (10 mins).
- Cuestionario general para los niños (incluye datos demográficos, actividad física y tiempo libre, consumo de alcohol y drogas, uso de telecomunicaciones y salud, 20 mins.)
- Cuestionario sobre dieta, tipo 24h recall (niños, 15 mins).
- Child Behaviour Checklist, sobre comportamiento del niño (niño y padres). Duración de 15-20 mins.

Instrucciones generales para la aplicación de cuestionarios:

Todos los cuestionarios se contestaran via ordenador, que estará instalado en el CAP de Flix. Además, dos de los 3 registros del cuestionario de dieta (24h recall) se realizarán en el instituto.

· Los cuestionarios generales para padres y niños son un archivo Access, de modo que toda la información quedará registrada en una base de datos directamente. Los padres contestaran solos los cuestionarios. Para el cuestionario a los niños/as habrá un investigador dirigiendo el cuestionario. Sólo en la parte de consumo de drogas y alcohol el niño/a contestará sólo el cuestionario, pero siempre tendrá el investigador cerca por cualquier duda que pueda tener.

- Existen **preguntas cerradas** con respuestas de tipo **Sí, No**, y algunas además, pero son minoría, incluyen la respuesta **No Sabe/No Contesta** (Ns/Nc).
- Así mismo existen otras preguntas cerradas con **diversas opciones**. En el caso de que ninguna de las opciones se adecue a las características del entrevistado, existe la **opción "otros"**, cuando se seleccione dicha opción se le pedirá que especifique, anotándose su respuesta en el espacio reservado para ello.
- El cuestionario está diseñado de forma que los participantes no puedan dejarse campos clave sin contestar.
- Toda **corrección** de un dato debe permitir **leer el registro original**. Los datos corregidos deben estar justificados, por lo que se registrará en una hoja aparte el ID del niño/a, nombre del cuestionario, nombre de la variable, el motivo de la corrección y nombre del corrector (Anexo 5).

· Para el cuestionario de dieta tipo "24h recall" se utilizará el programa YANA-C, utilizado en otras cohortes y validado en España para niños de 12-13 años. Para tener un buen registro de la dieta del niño hacen falta 3 días de dieta registrados. Para ello el niño, sin la presencia de los padres, contestará en el CAP el primer registro con la ayuda de una persona entrenada. Las dos siguientes veces se realizaran en el instituto, con todos los niños de la clase participantes a la vez en el aula de informática. En las dos ocasiones habrá la misma persona experta guiando a los niños en el cuestionario.

4. Exploración física del niño

La exploración física se enmarcará dentro de la revisión médica general que los niños de 12-13 años ya tienen programada con el pediatra a esa edad. Es en esta visita cuando se explicará a las familias el proyecto y se les pedirá su participación en éste. La exploración médica a los 12-13 años en la cohorte de Ribera d'Ebre consta de: valoración antropométrica, medición de la tensión arterial, valoración de la maduración sexual,

extracción de sangre y las pruebas de función respiratoria. Todas las pruebas se llevarán a cabo por una enfermera entrenada.

4.1 Valoración antropométrica

Consta de la medición de peso, talla y perímetro abdominal.

Cada mañana, antes de las mediciones se debe:

- Comprobar la báscula utilizando un peso conocido. Debe estar colocada en un área de suelo plano.
- Asegurar que el tallímetro está recto y colocado en un área de suelo plano.
- ANOTAR TODO EN LA HOJA DE ANTROPOMETRIA (Anexo 3)

4.1.1 Peso, talla y cintura



La **báscula** utilizada para medir el peso es el **modelo SECA 770**. Se utilizará un objeto de peso conocido para calibrarlo mensualmente. Peso máximo: 200 Kg. (<https://www.seca-online.com/seca-770.1998.0.html?&L=2&C=es>)

Se debe pesar sin zapatos y con ropa ligera. Pisar ligeramente para arrancar la báscula. Tomar dos mediciones (después de una pequeña pausa) con pies juntos y, hombros relajados, brazos a los lados, mirando al frente, columna recta y cabeza recta en el plano de Frankfurt.

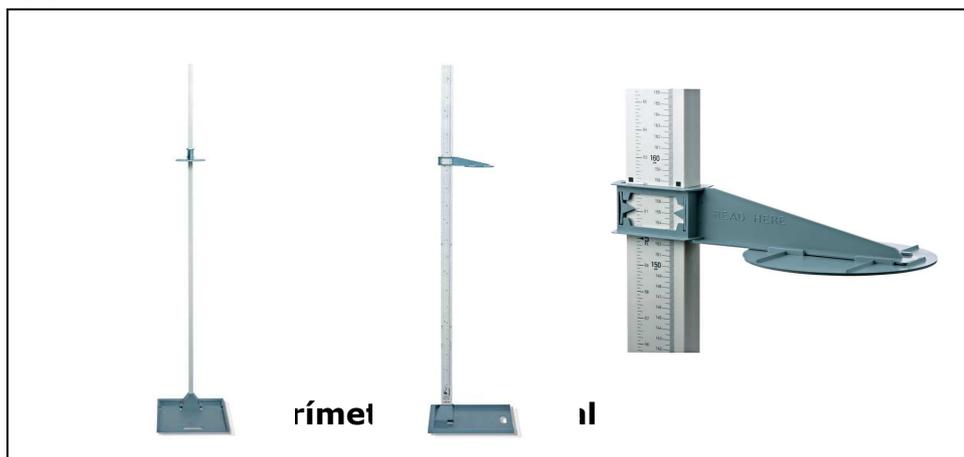
Seca modelo 770

Apuntar el peso en un kg con una precisión de 0,1 kg. Si hay una diferencia mayor de 0,5 kg entre las dos mediciones, tomar una tercera medición.

El **tallímetro** utilizado es el **modelo SECA 214**. Mide desde 20 hasta 207 cm de longitud. Merece destacarse, que previo a cada medición se deberá llevar la barra móvil hasta el tope y comprobar que la lectura es de 14,7 cm para asegurarse que el equipo se encuentra perfectamente calibrado para su uso. Se recomienda mover con suavidad el dispositivo móvil para evitar su descalibración (<https://www.seca-online.com/seca-214.2011.0.html?&L=2&C=es>).

Para realizar la medición de la talla el sujeto deberá ir sin zapatos, pies juntos y brazos a los lados, columna recta, mirando al frente, cabeza recta en el plano de Frankfurt. Tomar dos mediciones y apuntar la talla con una precisión de 0,1 cm. Si hay una diferencia mayor de 0,5 cm tomar una tercera medición.

Seca modelo 214



El perímetro abdominal se mide a nivel del ombligo. El sujeto debe estar relajado con la columna recta, los brazos a los lados, después de una ligera expiración. La cinta se coloca de manera horizontal y recta/nivelada por todos los lados.

La **cinta métrica** utilizada es el **modelo SECA 201**. Mide desde 15 hasta 205 cm y tiene divisiones de 1 mm. Permite hacer lectura sin superposición de ambos extremos de la cinta.

<https://www.seca-online.com/seca-201.2795.0.html?&L=2&C=es>



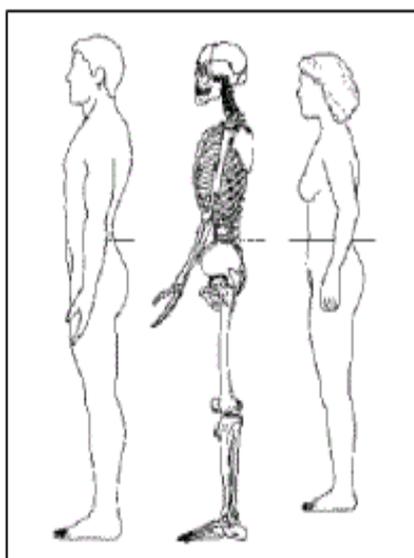
Seca modelo 201

Descubre la cintura apartando la ropa. Niño de pies, brazos a los lados, abdomen

relajado y pies separados unos 25cm (un palmo).

En el lado derecho, medir la distancia entre justo debajo de la costilla inferior y justo encima de la cresta ilíaca. Es importante estar en frente del niño. Usar un bolígrafo para marcar ligeramente la piel en el punto intermedio. Colocar la cinta alrededor del nivel del punto marcado sin comprimir la piel y después de una expiración suave, colocando bien el trucito. Pedir a otra entrevistadora de mirar que la cinta esta horizontal por todos lados. Tomar dos mediciones con una precisión de 0,25 cm. Si hay una diferencia mayor de 0,5 cm se deberá tomar una tercera medición.

Figure 1: Measuring tape position for waist circumference



4.1.2 Bioimpedancia

Semanalmente: comprueba que la maquina BIA funciona bien utilizando el electrodo de prueba (reactancia entre 495 y 505, resistencia entre -003 y 003).

Antes del examen: Deben vaciar la vejiga antes de empezar.

Modelo Quantum II de RJL systems

Explicar que es una manera de estimar la composición corporal. Pedir al niño que se descubra los pies y que se tumben con los pies separados y los brazos apartados del cuerpo. No debe tener contacto con una superficie metálica. Después de limpiar las zonas con un poco de alcohol, colocar un par de los electrodos en la mano derecha y el pie derecho de la manera indicada en la foto. Encender la maquina y apuntar las mediciones

de reactancia y resistencia. Introducir las mediciones en la hoja de Excel para estimar el % de grasa corporal.

Importante: colocar y descolocar el cable con cuidado, estirando un poco la parte con piel de cocodrilo para retirarla.

4.2 Tensión arterial

Sistólica, diastólica y ritmo cardíaco -> se mide 2 veces cada uno.

Aparato de tensión arterial: OMROM 705-CPII

<http://www.omron-healthcare.com/sitepreview.php?SiteID=594>

4.3 Función respiratoria

4.3.1 Espirometría

Antes y después de hacer la prueba se deberá rellenar el formulario de espirometría (Anexo 2).

Preparación del aparato:

- Mirar que tenemos todas las piezas. (easyone, screen connector, boquillas)
- Encender el portátil

Calibración del aparato:

- Poner una boquilla al espirómetro.
- En la parte final de la boquilla, introducir la boquilla de calibración y luego un adaptador.
- Utilizar una jeringa de 3L.
- Encender el espirómetro. (ON/OFF unos segundos)
- Con las flechas movernos por el menú hasta llegar a Control Calibrac.
- Apretar enter.
- En la pantalla saldrá LISTO, apretar ENTER.
- Tocar la superficie de la jeringa el mínimo posible.
- Con un movimiento suave pero rápido, hacemos mover el embolo de la jeringa. (Escucharemos un pitido)
- Salir del programa calibración.

Montar el aparato:

- Introduciremos al Easyone una espireta nueva, con cuidado sin tocar la boquilla de la espireta con las manos.
- Encenderemos el portátil. Abriremos el programa easyware. Conectaremos a un puerto USB el screenconector.
- Encenderemos el Easyone.
- Introduciremos los datos del paciente. (icono: hoja con una estrella roja en una esquina).
- Conectaremos el portátil con el easyone. (icono: ordenador y aparato conectados por un cable).

Cosas que decir/hacer al niño:

- Antes de empezar la prueba tenemos que pasar 2 preguntas a la madre (si tiene asma o no y si ha tomado el día de la prueba alguna medicación para el asma)
- Se introduce el peso y la talla del niño.

Explicación al niño de cómo realizar la prueba:

- Se le explica al niño que debe soplar soltando el aire de una sola vez y fuerte.

Empieza la prueba:

- Apuntaremos la fecha y la hora que comienza la prueba.
- Se comprueba que el niño esté tranquilo, sentado con la espalda recta (tocando el respaldo), y sin cruzar brazos y piernas.
- Escogemos la primera opción (ENTER), rellamada (ENTER) ya empezamos la prueba.
- Cada vez que empiece la prueba tendremos que decir enérgicamente que empiece a dejar el aire y seguir animándolo a que continúe, aunque él crea que no tiene más aire.
- En easyone nos indicará que las pruebas son correctas o incorrectas y donde falla el paciente. (poco aire, a titubeado...)
- Es posible que ninguna de las pruebas sean dadas como correctas por el aparato. Se guardan igualmente.
- No haremos más de 8 pruebas por paciente.
- Retiraremos la boquilla.

4.3.2 Prueba broncodilatadora

En los niños que tengan asma y no hayan tomado ninguna medicación el día de la prueba, se les repetirá la espirometría tras 15-20 minutos de la administración de 400 mg. de salbutamol inhalado.

5. Valoración neuropsicológica del niño

- El protocolo será administrado por un psicólogo profesional o un entrevistador entrenado.
- El entrenamiento deberá ser supervisado por el neuropsicólogo responsable del proyecto y deberán ser implementados diversos controles de calidad, para confirmar la fiabilidad del entrevistador.
- El orden de aplicación de los tests es estricto y debe cumplirse. El orden será el siguiente:
 - N-back
 - SDQ para el niño
 - Función semántica y fonética
 - Trail Making Test (TMT) - Part B
 - Fingertapping
- Las normas de aplicación del subtest de vocabulario deben cumplirse según se especifica en el manual del test. Nunca debe alterarse el orden de los ítems.
- La sala de aplicación de las pruebas informatizadas debe ser silenciosa y tranquila, ya que todas las pruebas lo exigen. En caso de no ser así, la validez de las pruebas será inferior.
- Para todas las pruebas computerizadas (N-back y TMT B) debe cumplirse lo siguiente: el examinador debe dar instrucciones precisas del procedimiento del test. Después debe permanecer atento a la fase de entrenamiento del test, para corroborar que el sujeto ha entendido la prueba. Una vez hecha la comprobación, se puede iniciar la prueba. El examinador debe permanecer en segundo plano sin intervención.

TESTS:

- **N-Back:**
 - Se trata de una tarea experimental y mide la capacidad de memoria de trabajo del sujeto.
 - Duración aproximada: 15-20 mins.
- **SDQ:**
 - Cuestionario sobre capacidades y dificultades del niño.
 - Duración aproximada: 5 mins.

- **Función semántica y fonética:**
 - El niño tiene que decir en 1 minuto todos los animales que le pasan por la cabeza, y en un minuto todas las palabras que empiecen con "p". La persona encargada de realizar los test deberá apuntar todas las palabras en una hoja.
 - Duración aproximada: 2 mins.

- **Trail Making Test (TMT)- Part B:**
 - Es un test neuropsicológico de atención visual y tarea de cambio. El test consiste en que el sujeto debe conectar 25 puntos conectados. EN la parte B, la usada en esta cohorte, los sujetos deben conectar letras y números alternados (1, A, 2, B, etc.). La idea es terminar lo antes posible, ya que el tiempo es la medida usada principalmente.
 - Duración aproximada: 3 mins.

- **Fingertapping:**
 - El test mide la velocidad motora y ayuda a determinar si hay daños en particulares áreas del cerebro. El niño debe apretar tantas veces como pueda el botón del "mouse", primero con la mano "buena" (la que usa para escribir, comer, etc) y luego con otra.
 - Duración aproximada: 1 mins.

6. Muestras biológicas

6.1 Orina (al final se decide no tomar muestra en Ribera d'Ebre)

En la segunda visita el investigador entregará un bote de orina al niño para que el mismo día le entregue la muestra. En la hoja de monitorización (Anexo 4) se deberá apuntar día y hora de entrega, hora de la última orina.

Visita 2:

- 1) Recoger el bote con la orina del niño
- 2) Apuntar a la base de datos el día y la hora de la recogida
- 3) Etiquetar el bote con el ID del niño
- 4) Hacer 5 alícuotas de 10 ml (al menos una de las alícuotas debe ser en un tubo de polipropileno). En caso de que haya menos de 50 ml, repartir equitativamente el

volumen en las 5 alícuotas (por ejemplo, si sólo se recogen 40 ml, se ponen 8ml en cada una de las 5 alícuotas).

- 5) Etiquetar los tubos
- 6) Congelar las muestras a -20° en posición vertical (Conservación en el CAP de Flix hasta su traslado con nieve carbónica al CREAL)

6.2 Pelo

Se cogerá una muestra de pelo a los niños en la segunda visita.

Protocolo de recogida: **(millor seguir el protocol de la URV)**

- Se recoge un mechón de pelo (unos 10mg aproximadamente).
- Se intentará que sea lo más próximo posible a la raíz y en la zona occipital de la cabeza (la parte de atrás).
- Se guarda todo el mechón cortado. En el caso de que el niño/a tenga el cabello corto se cortará lo que se pueda (de varios lugares intentando que no quede marca), hasta llegar al volumen aproximado de 10mg.
- Se guardará en una bolsita de polietileno tipo zip de cierre hermético.
- Se identificará con una etiqueta con la fecha y el idnum del niño/a
- Se guardará a temperatura ambiente en un lugar cerrado para evitar contaminaciones.

6.3 Sangre

Ver esquema a continuación.

Sangre del niño (volumen estimado de extracción: 10 ml)

5 ml → No anticoagulante (vacutainer con gel separador) – TUBS TARONGES



Invertir el tubo suavemente 6 veces inmediatamente después de la extracción.
Mantener el tubo al menos 30 minutos antes de la centrifugación en un lugar oscuro.

→ Centrifugar a 3000rpm durante 10-15 minutos.

→ Alícuotas de **suero** (total:4)

- 2 * 0,5 ml (nunc plástico)
- 2 * 0,5 ml (tubo vidrio) (uno para organoclorados)

5 ml → EDTA – TUBS LILES



Mantener el tubo en el agitador, preferiblemente protegido de la luz, al menos durante 30 minutos antes de la centrifugación.

→ Centrifugar a 3000rpm durante 10-15 minutos.

→ Alícuotas de **plasma** (total:3)

- 3 * 0,5 ml (nuncs plástico)

- **Congelar todas las alícuotas a -20°C hasta su traslado al CREAL**
- **En el caso de que sólo se disponga de menos de 3 ml de plasma o suero, no hacer alícuota de 0,5 de plástico, o hacerla con menos volumen. Indicarlo a comentarios en la hoja de monitorización**

7. Material necesario

Para la extracción de sangre:

- Tubos plasma
- Tubos de suero
- Criotubos 2ml (para alícuotas sangre)
- Cajas para los criotubos de 2ml
- Viales de 2ml de vidrio (para la alícuota de suero para organoclorados)
- Tapones para los viales de vidrio
- Micropipeta 200-100ul (para hacer las alícuotas)*
- Puntas pipeta
- Contenedor para las puntas de la pipeta

Para la orina:

- Pipetas Pasteur plástico (para hacer las alícuotas de orina)
- Potes de orina de polipropileno
- Tubos de 10ml (para hacer las alícuotas)
- Tubos de 10ml de polipropileno (para hacer una alícuota de orina)

Para la Espirometría:

- Espirómetro
- pinzas para la nariz
- Boquillas espirómetro

Para otras muestras biológicas:

- bolsitas zip (para recoger pelo)

Para la antropometría:

- bioimpedancia
- báscula
- tallímetro
- cinta métrica

Otros:

- Etiquetas
- Regalo para los niños
- Zumos y Galletas (para dar a los niños después de la extracción)

ANEXOS:

- Anexo 1. Información y consentimiento 12-13 años
- Anexo 2. Formulario espirometría
- Anexo 3. Formulario antropometría
- Anexo 4. Hoja de monitorización
- Anexo 5. Hoja corrección de datos